

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.19.011

柴黄清胰活血颗粒质量控制*

赵剑,李志[△],李静,罗群,李能源

(西南医科大学附属中医医院,四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨柴黄清胰活血颗粒的质量控制方法。方法 采用薄层色谱法对柴黄清胰活血颗粒中大黄、黄芪、栀子、黄芩和延胡索进行定性鉴别,采用高效液相色谱法同时测定柴黄清胰活血颗粒中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。结果 薄层色谱斑点清晰,分离效果较好,且阴性无干扰;5种有效成分在一定范围内线性关系良好($R^2 > 0.999$),平均回收率为99.66%~102.90%,RSD均低于3%($n=9$)。结论 该方法准确可靠、专属性强、重复性好,可作为控制柴黄清胰活血颗粒质量的有效方法。

关键词:柴黄清胰活血颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;芦荟大黄素;大黄酸;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)19-0036-04

Quality Control of Chaihuang Qingyi Huoxue Granules

ZHAO Jian, LI Zhi, LI Jing, LUO Qun, LI Nengyuan

(Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: **Objective** To investigate the quality control method of Chaihuang Qingyi Huoxue Granules. **Methods** The *Rhei Radix et Rhizoma*, *Astragalus membranaceus*, *Fructus Gardeniae*, *Scutellaria baicalensis* and *Rhizoma Corydalis* in Chaihuang Qingyi Huoxue Granules were identified by TLC method. The contents of aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion in Chaihuang Qingyi Huoxue Granules were simultaneously determined by HPLC method. **Results** The TLC spots were clear and had good separation without interference of the negative control. The linear relationship of the five effective constituents was good in a certain range ($R^2 > 0.999$), the average recovery was in the range of 99.66% - 102.90% and $RSD < 3\%$ ($n=9$). **Conclusion** The method is accurate, reliable, specific and reproducible, which can be used as an effective method to control the quality of Chaihuang Qingyi Huoxue Granules.

Key words: Chaihuang Qingyi Huoxue Granules; TLC; HPLC; aloe emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion

柴黄清胰活血颗粒是西南医科大学附属中医医院脾胃病科协定处方,由生大黄、柴胡、延胡索、栀子、黄芩、黄芪等14味中药组方,具有清热解毒、活血消肿、通腑泄热、理气止痛的功效,用于治疗急性胰腺炎。前期研究中已确定了柴黄清胰活血颗粒的最佳提取工艺,为了进一步控制其质量,根据处方中中药所含化学成分的理化性质,采用薄层色谱法对该制剂中的大黄、黄芪、黄芩、栀子、延胡索5味中药进行定性鉴别^[1],采用高效液相色谱法同时测定处方中君药大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量,为制订柴黄清胰活血颗粒的质量标准提供试验依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括SPD-20A型紫外可见检测器LCsolution色谱工作站;JPGT0328型超声提取器(武汉嘉鹏电子有限公司);HH型数显电热恒温水浴箱(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);AUW120D型电子天平(日本岛津公司);薄层色谱硅胶G、硅胶G薄层板(青岛海洋化工分厂)。

1.2 试药

羧甲基纤维素钠(安徽山河药用辅料股份有限公司);药用大黄对照药材(批号为120984-201202),黄芪甲苷(批号为110781-200613),黄芩苷(批号为110715-201318),延胡索乙素(批号为110726-201616),栀子苷(批号为110749-201309),芦荟大黄素(批号为110795-201508),大黄酸(批号为110757-200206),大黄素(批号为110756-200110),大黄酚(批号为110796-201621),大黄素甲醚(批号为110758-201415),均购于中国食品药品检定研究院;生大黄、柴胡、延胡索、丹参等14味中药购于泸州市宝光中药饮片公司,经泸州市药检所中药室袁常珍主任鉴定为正品,均符合2015年版《中国药典》项下规定;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯;怡宝纯净水;柴黄清胰活血颗粒(医院制剂,批号分别为20170516,20170517,20170518)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

大黄:取本品10g,加甲醇50mL,浸泡1h,滤过,滤液蒸干,残渣加水10mL使溶解,加盐酸1mL,加热回流30min,立即冷却,用乙醚振摇,提取2次,每次

*基金项目:2015年四川省泸州市人民政府·四川医科大学科技战略合作项目[2015LZCYD-S09(1/8)]。

第一作者:赵剑,男,大学本科,主任中药师,研究方向为中药制剂开发,(电话)0830-3162253(电子信箱)562701410@qq.com。

[△]通信作者:李志,男,博士研究生,主任中医师,研究方向为中西医结合诊治胃食管反流病等消化内科疾病,(电子信箱)724232536@qq.com。

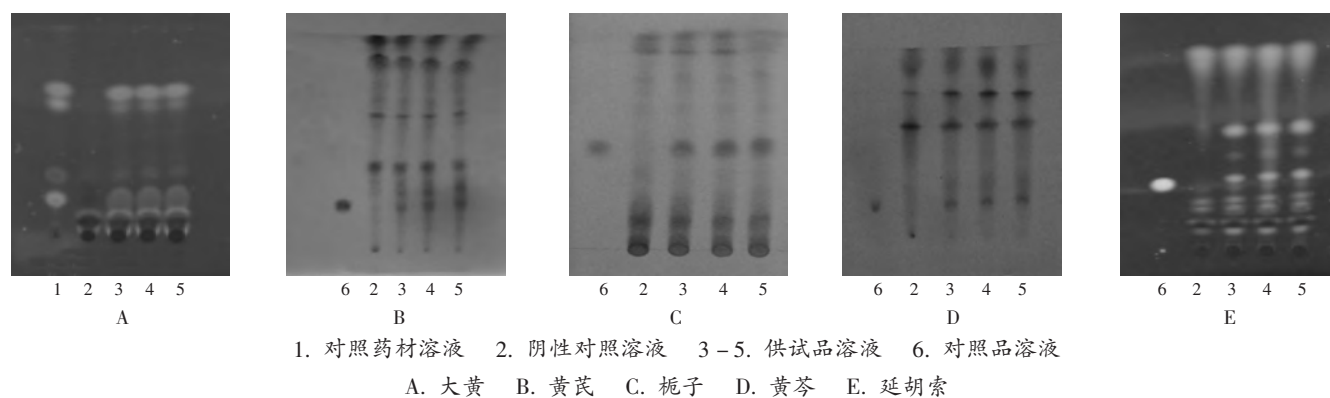


图1 薄层色谱图

20 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。按处方工艺制成不含大黄的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液。取大黄对照药材 0.3 g, 加甲醇 30 mL, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 取上述溶液各 10 μ L, 分别点于以同一羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(6:2:0.1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果见图 1 A。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰^[2-3]。

黄芪: 取本品 10 g, 加甲醇 50 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30 mL 使溶解, 用水饱和和正丁醇振摇, 提取 2 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 用 1% NaOH 溶液洗涤 2 次, 每次 20 mL, 用正丁醇饱和的水洗至中性, 分取正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。按处方工艺制成不含黄芪的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液。取黄芪苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 将上述取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(20:40:22:10, V/V/V/V)在 10 $^{\circ}$ C 以下放置 12 h 的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 以 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。见图 1 B。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰^[4-5]。

栀子: 取本品 10 g, 加水 20 mL 使溶解, 加乙醇 30 mL, 充分振摇, 静置 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用水饱和正丁醇振摇, 提取 2 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加乙醇 5 mL 使溶解, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。按处方工艺制成不含栀子的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液。取栀子苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(2015 年

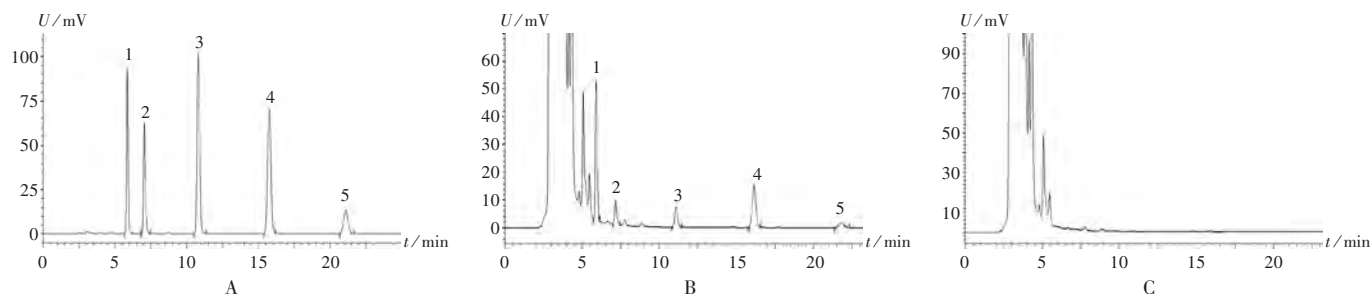
版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇(7:2, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果见图 1 C。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰^[6-7]。

黄芩: 取本品 10 g, 加甲醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用稀盐酸调 pH 至 2, 用乙酸乙酯振摇, 提取 2 次, 每次 30 mL, 合并提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。按处方工艺制成不含黄芩的阴性样品, 同法制成阴性对照溶液。取黄芩苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一含 4% 醋酸钠的羧甲基纤维素钠溶液粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1, V/V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% FeCl_3 乙醇溶液。结果见图 1 D。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰^[8-9]。

延胡索: 取本品 5 g, 加甲醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 加浓氨调碱性(pH 约为 9), 用乙醚提取 3 次, 每次 10 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。按处方工艺制成不含延胡索的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液。取延胡索乙素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-二氯甲烷-甲醇(12:8:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置碘缸中 3~5 min 后取出, 挥尽板上吸附的碘后, 在紫外灯(365 nm)下检视。结果见图 1 E。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰^[10-11]。

表1 方法学考察结果

成分	回归方程	R^2 ($n=7$)	线性范围(μg)	RSD(%)			
				精密度($n=5$)	稳定性($n=6$)	重复性($n=6$)	耐用性
芦荟大黄素	$Y=5\,182\,418.26X-1\,497.69$	0.999 8	0.015 2~0.304 0	1.44	1.20	1.49	1.32
大黄酸	$Y=3\,188\,722.9095X+9\,662.0478$	0.999 5	0.019 6~0.392 0	1.41	0.66	1.49	0.99
大黄素	$Y=5\,902\,286.9517X+7\,910.4654$	0.999 4	0.023 2~0.464 0	1.41	1.70	1.80	1.23
大黄酚	$Y=9\,003\,377.2391X+4\,669.4477$	0.999 7	0.013 6~0.272 0	1.47	1.19	1.41	1.19
大黄素甲醚	$Y=2\,662\,267.7243X-18\,757.4308$	0.999 9	0.016 4~0.328 0	0.62	1.91	1.48	1.05



1. 芦荟大黄素 2. 大黄酸 3. 大黄素 4. 大黄酚 5. 大黄素甲醚
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Inertsil ODS-SP C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15, V/V); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μL ; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按各主峰计算均应不低于 4 000^[12-16]。

2.2.2 溶液制备

取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量, 精密称定, 分别置相应容量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容至刻度, 制成质量浓度分别为 0.076, 0.098, 0.116, 0.068, 0.082 g/L 的溶液, 作为对照品贮备液。取本品 10 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 浸泡 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 加盐酸 1 mL, 加热回流 30 min, 立即冷却, 用乙醚振摇, 提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按处方量并以相同工艺制备不含大黄的阴性对照样品, 同供试品溶液制备方法制备, 得阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察: 精密量取对照品贮备液 1 mL, 置 5 mL 容量瓶中混合, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 再分别量取混合液 1, 3, 6, 10, 13, 16, 20 μL 注入高效液相色谱仪, 按拟定色谱条件测定, 以峰面积(A)对进样量(C)进行线性回归, 绘制标准曲线。结果见表 1。

专属性试验: 精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪测定。结果阴性对照品溶液中其他组分对测定无干扰, 结果见图 2。

精密度试验: 精密吸取对照品混合溶液, 连续进样

5 次, 每次 10 μL , 按 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积。结果见表 1, 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 时进样 10 μL , 测定峰面积。结果见表 1, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

重复性试验: 取同一批样品(批号为 20170516)6 份, 每份约 10 g, 依法制备供试品溶液, 按拟定色谱条件进样分析。结果见表 1, 表明方法重复性好。

加样回收试验: 取已知含量的柴黄清胰活血颗粒 9 份, 每份约 5 g, 精密称定, 分别按其中所含各成分含量的 50%, 100%, 150% 加入相应对照品, 依法制备供试品溶液, 按拟定色谱条件分别进样测定, 计算回收率。结果见表 2。

耐用性试验: 取样品适量, 依法制备供试品溶液, 调整色谱条件为流速(0.8 $\pm$ 0.2) mL/min, 波长(254 $\pm$ 2) nm, 柱温(40 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$, 测定。结果见表 1, 表明流速、波长、柱温小的变动时耐用性合适, 满足系统适应性要求。

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品(批号分别为 20170516, 20170517, 20170518), 精密称定, 制备供试品溶液, 利用外标法测定, 计算。结果见表 3。

3 讨论

薄层色谱法是中药鉴定的基本方法, 也是快速分离和定性分析的一种重要技术手段。本试验中对柴黄清胰活血颗粒处方中大黄、黄芪、黄芩、栀子、延胡索 5 味中药进行薄层色谱鉴别。结果表明, 系统专属性强, 色谱特征斑点清晰, 分离良好, 无拖尾现象, 可作为柴黄清胰活血颗粒的定性鉴别标准。

因芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲

表2 加样回收试验结果($n=9$)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加样量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
芦荟大黄素	5.3440	0.1764	0.0819	0.2604	102.56	102.08	2.84
	5.3453	0.1764	0.0819	0.2607	102.93		
	5.3472	0.1765	0.0819	0.2627	105.25		
	5.5262	0.1824	0.1666	0.3553	103.90		
	5.5269	0.1824	0.1666	0.3555	103.78		
	5.5270	0.1824	0.1666	0.3550	103.60		
	5.5261	0.1824	0.2498	0.4238	96.64		
	5.5269	0.1824	0.2498	0.4378	102.24		
	5.5271	0.1824	0.2498	0.4268	97.84		
大黄酸	5.3440	0.0476	0.0224	0.0706	102.68	101.23	2.25
	5.3453	0.0476	0.0224	0.0703	101.34		
	5.3472	0.0476	0.0224	0.0699	99.55		
	5.5262	0.0492	0.0502	0.0999	101.00		
	5.5269	0.0492	0.0502	0.0979	97.01		
	5.5270	0.0492	0.0502	0.1013	103.78		
	5.5261	0.0492	0.0648	0.1167	104.17		
	5.5269	0.0492	0.0648	0.1137	99.54		
	5.5271	0.0492	0.0648	0.1153	102.01		
大黄素	5.3440	0.0337	0.0135	0.0468	97.04	101.23	2.25
	5.3453	0.0337	0.0135	0.0473	100.74		
	5.3472	0.0337	0.0135	0.0469	97.78		
	5.5262	0.0348	0.0338	0.0693	102.07		
	5.5269	0.0348	0.0338	0.0706	105.92		
	5.5270	0.0348	0.0338	0.0706	105.92		
	5.5261	0.0348	0.0412	0.0752	98.06		
	5.5269	0.0348	0.0412	0.0776	103.88		
	5.5271	0.0348	0.0412	0.0750	97.57		
大黄酚	5.3440	0.0668	0.0471	0.1139	100.00	102.90	2.22
	5.3453	0.0668	0.0471	0.1135	99.15		
	5.3472	0.0668	0.0471	0.1167	105.94		
	5.5262	0.0691	0.0647	0.1358	103.09		
	5.5269	0.0691	0.0647	0.1369	104.79		
	5.5270	0.0691	0.0647	0.1347	101.39		
	5.5261	0.0691	0.1110	0.1835	103.06		
	5.5269	0.0691	0.1110	0.1849	104.32		
	5.5271	0.0691	0.1110	0.1849	104.32		
大黄素甲醚	5.3440	0.0438	0.0214	0.0654	100.93	99.66	2.66
	5.3453	0.0438	0.0214	0.0661	104.21		
	5.3472	0.0438	0.0214	0.0647	97.66		
	5.5262	0.0453	0.0410	0.0852	97.32		
	5.5269	0.0453	0.0410	0.0846	95.85		
	5.5270	0.0453	0.0410	0.0861	99.51		
	5.5261	0.0453	0.0624	0.1094	102.72		
	5.5269	0.0453	0.0624	0.1071	99.04		
	5.5271	0.0453	0.0624	0.1075	99.68		

醚的极性均较小,考虑采用有机相比比例较大的流动相,且这5种成分都含有酚羟基略显酸性,故加入少量酸抑

表3 样品含量测定结果($n=5$)

批号	平均含量(mg/g)					RSD(%)				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
20170516	0.0331	0.0085	0.0067	0.0126	0.0083	1.72	1.96	2.33	1.85	1.92
20170517	0.0297	0.0078	0.0058	0.0118	0.0075	1.86	2.11	2.41	1.94	2.05
20170518	0.0325	0.0094	0.0071	0.0129	0.0086	1.71	1.85	2.24	1.82	1.88

注:A为芦荟大黄素,B为大黄酸,C为大黄素,D为大黄酚,E为大黄素甲醚。

制拖尾现象。本试验中分别考察0.1%、0.3%、0.6%磷酸及乙酸,结果选择0.1%磷酸峰形良好,故选择0.1%磷酸溶液作为无机相。同样考察了有机相甲醇及乙腈,两者都能较好地分离各成分,但甲醇比乙腈经济且毒性较小,故选甲醇为有机相。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:23-24,139-140,248,301-303.
- [2] 叶强,余葱葱. 大黄全成分薄层色谱条件研究[J]. 亚太传统医药,2013,9(3):15-16.
- [3] 赵剑,陈玉兰,蒲清荣,等. 茵陈四苓颗粒质量标准研究[J]. 中成药,2014,36(4):763-768.
- [4] 郝冰冰,陈军丽,刘红莉,等. 芪术痹湿颗粒中黄芪检验方法的建立[J]. 中国药房,2015,26(18):2562-2563.
- [5] 刘薇. 益气固摄浓缩丸中黄芪及陈皮的薄层色谱法定性鉴别[J]. 湖北医药学院学报,2014,33(2):163-164.
- [6] 刘颖,胡琴,史文凤,等. 红花清肝十三味丸质量标准研究[J]. 中成药,2013,35(6):1230-1236.
- [7] 曾利娜,谢耀轩,王淑红,等. 茵陈消黄丸质量标准提高研究[J]. 今日药学,2016,26(7):468-471.
- [8] 许佳楠. 中药复方NZ制剂中黄芩苷薄层鉴别及含量测定[J]. 亚太传统医药,2017,13(7):41-43.
- [9] 张大勇,邵大志,张聪,等. 急肝退黄胶囊薄层鉴别方法研究[J]. 中国实用医药,2010,5(27):170.
- [10] 谢若男,杨满琴,徐玥玮,等. 十一味活血酊质量标准研究[J]. 安徽医药,2012,16(6):768-769.
- [11] 冯景辉. 止痛化癥颗粒中延胡索质量标准研究[J]. 山东化工,2017,46(12):96-97.
- [12] 岳淑梅,冯玲玲,齐潇潇,等. 肝宁颗粒中大黄所含5种蒽醌苷元的HPLC测定[J]. 中成药,2008,30(8):1155-1158.
- [13] 崔佳丽,山丽梅,赵艳玲,等. 治疗乙肝相关性肾炎新药大黄甘草胶囊提取工艺优选[J]. 中成药,2013,35(6):1333-1336.
- [14] 周燕霞,毛坤军,周慧云,等. 大黄通便胶囊中5种蒽醌类化合物的含量测定[J]. 广州化工,2018,46(22):79-81.
- [15] 宋文惠,边军昌,刘勤社. 中药大黄不同储存时期内的有效成分含量研究[J]. 陕西中医,2014,35(7):913-914.
- [16] 冯素香,李晓玉,周梯强,等. HPLC-UV与HPLC-FLED对比分析大黄药材中蒽醌类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):70-74.

(收稿日期:2019-01-08)