

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.024

慢粒灵制剂中青黛定性鉴别和红花3种黄酮类成分含量测定*

贾 勇, 赵金秀

(河北省廊坊市中医医院, 河北 廊坊 065000)

摘要:目的 建立鉴别慢粒灵颗粒(胶囊)中青黛的薄层色谱(TLC)法及同时测定红花中羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷和红花黄色素 B 含量的超高效液相色谱(UPLC)法。方法 采用 TLC 法鉴别青黛。色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.01% 三氟乙酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 380 nm, 进样量为 10 μL。结果 羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷和红花黄色素 B 的进样量分别在 25.04~5 008.0 ng, 21.36~4 272.0 ng, 19.92~3 984.0 ng 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 9$), 平均回收率分别为 96.43%, 95.88%, 95.25%, RSD 分别为 1.48%, 0.66%, 1.06% ($n=6$)。结论 该方法分析速度快, 灵敏度高, 结果准确, 可用于慢粒灵颗粒(胶囊)中青黛的鉴别和红花药材中 3 种黄酮类成分的含量测定。

关键词:慢粒灵颗粒(胶囊); 青黛; 红花; 薄层色谱法; 超高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)17-0090-04

Qualitative Identification of *Indigo Naturalis* and Content Determination of 3 Flavones of *Flos Carthami* in Manliling Granules(Capsules)

JIA Yong, ZHAO Jinxiu

(Langfang TCM Hospital, Langfang, Hebei, China 065000)

Abstract: Objective To establish a thin layer chromatography(TLC) method for the identification of *Indigo naturalis* and ultra performance liquid chromatography(UPLC) method for the determination of hydroxy safflor yellow A(HSYA), 6-hydroxy kaempferol-3-O-glucoside(6-HK3-O-G) and safflower yellow B(SYB) in Manliling Granules(Capsules). **Methods** The TLC method was used to identification of *Indigo naturalis*, the ACQUITY UPLC BEH C₁₈ chromatographic column(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was used with acetonitrile(A)-0.01% TFA(B) as the mobile phase of gradient elution at flow rate of 0.3 mL/min, detection wavelength was maintain at 380 nm, column temperature was maintained at 30 ℃ and the injection volume was 10 μL. **Results** Hydroxysafflor yellow A, 6-hydroxykaempferol-3-O-glucoside and safflower yellow B showed good linear relationship with the peak area when the injection volume was in the ranges of 25.04~5 008.0 ng, 21.36 ng~4 272.0 ng, and 19.92 ng~3 984.0 ng($r \geq 0.999 9$), respectively. The average recoveries were 96.43%, 95.88% and 95.25% within RSDs of 1.48%, 0.66% and 1.06% ($n=6$). **Conclusion** The method is rapid, sensitive and reproducible, which can be used for qualitative identification of *Indigo naturalis* and determination of three flavones of *Flos carthami* in Manliling Granules(Capsules).

Key words: Manliling Granules(Capsules); *Indigo naturalis*; *Flos carthami*; thin layer chromatography; ultra performance liquid chromatography; content determination

慢粒灵颗粒由三棱、莪术、青黛、山豆根、桃仁、红花、黄药子 7 味中药组方, 具有活血化瘀、散结消癥的作用, 临床主要用于治疗瘀血阻滞证慢性粒细胞白血病^[1]。方中三棱有消积止痛、破血行气作用^[2]; 红花有散瘀止痛、活血通经作用, 其活血成分为黄酮类成分^[3-4], 包括羟基红花黄色素 A、山柰素、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷和红花黄色素 B 等。目前, 质量标准中仅见青黛和山豆根的薄层色谱鉴别。青黛和山豆根主要是发挥清热解毒、消肿利咽的作用^[5]。青黛中的靛玉红有治疗慢性粒细胞白血病作用^[6], 且根据中药质量标志物基于性-效-药(Q-Marker)的概念^[7-8], 中药质量标志物主要是指能与中药功能密切相关的成分, 可作为反映中

药安全性和有效性的标志性物质进行质量控制。因此, 该质量标准的控制与中药质量标志物的概念关系不紧密, 具有一定缺陷。本研究中对处方中青黛采用薄层色谱(TLC)法进行鉴别, 采用超高效液相色谱(UPLC)法测定慢粒灵颗粒(胶囊)中羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷和红花黄色素 B, 对其红花药材进行质量控制, 可为提高和完善慢粒灵颗粒(胶囊)的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Water ACQUITY H-Class 型超高效液相色谱仪, 包括 Empower 3 工作站(美国沃特世仪器公司); Sartorius

*基金项目: 河北省廊坊市科技局自筹经费项目[2012013018]。

第一作者: 贾勇, 男, 大学本科, 主管中药师, 研究方向为中药制剂质量, (电子信箱)wqx2018@yeah.net。

BT124 型电子天平(北京赛多利斯仪器公司,精度为万分之一);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz);Mili-Q 型超纯水机(美国密理博公司)。

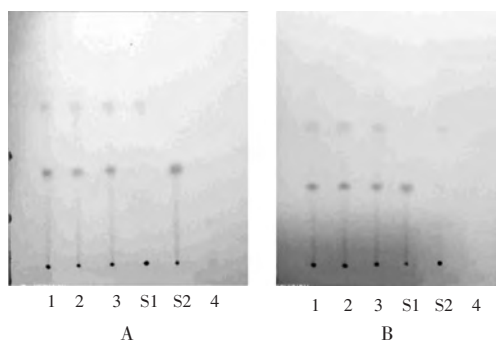
1.2 试药

慢粒灵颗粒(医院制剂室自制,批号分别为 20190320,20190706,20180516,规格为每袋 15 g);慢粒灵胶囊(医院制剂室自制,批号分别为 20190704,20190730,20190801,规格为每粒 0.45 g);羟基红花黄色素 A 对照品(批号为 111637-201308,含量为 96.5%),靛蓝对照品(批号为 110716-201612),靛玉红对照品(批号为 110717-201805),购自中国食品药品检定研究院;6-羟基山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷对照品(批号为 MUST-19041506,含量 99.72%),红花黄色素 B 对照品(批号为 MUST-19041507,含量 99.68%),均购自成都曼斯特公司;乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);三氯甲烷、丙酮、甲苯、三氟乙酸、磷酸二氢铵、磷酸,均为分析纯,均购自上海国药集团化学试剂公司;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 青黛 TLC 鉴别

取 3 批慢粒灵颗粒各 1 袋,研细,称取粉末各 10 g;取胶囊 20 粒,研细,分别置具塞锥形瓶中,加三氯甲烷 20 mL,超声处理(功率为 350 W,频率为 50 kHz)10 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取靛蓝、靛玉红对照品,加氯仿制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。再取缺青黛的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法试验,吸取上述 4 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-三氯甲烷-丙酮(5:4:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置日光下检视。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。色谱图见图 1。



1-3. 供试品溶液 S1. 靛蓝对照品溶液 S2. 靛玉红对照品溶液
4. 缺青黛的阴性对照品溶液
A. 慢粒灵颗粒 B. 慢粒灵胶囊

图 1 薄层色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相:乙腈(A)-0.01% 三氟乙酸水溶液(B),梯度洗脱,0~5.5 min 时 2% A~5% A, 5.5~8.4 min 时 5% A~9% A, 8.4~19.8 min 时, 9% A~20% A, 19.8~22 min 时 20% A;流速:0.3 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长:380 nm;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液制备

取羟基红花黄色素 A 对照品 12.52 mg、6-羟基山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷 10.08 mg 和红花黄色素 B 9.96 mg,精密称定,置同一 25 mL 容量瓶中,加 25% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。取慢粒灵颗粒(批号为 20190320)10 袋,研细;取慢粒灵胶囊 20 粒,研细。精密称取上述粉末各 1.0 g 置 150 mL 具塞锥形瓶中,分别加 25% 甲醇 50 mL,超声处理(功率为 350 W,频率为 50 kHz)30 min,取出,放冷,加 25% 甲醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取慢粒灵颗粒处方量的 1/10,制备缺红花药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备红花阴性对照品溶液。

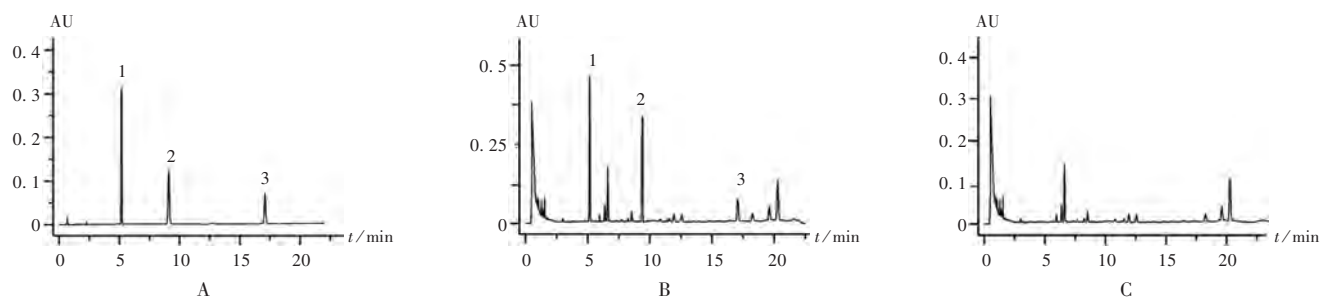
2.2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。详见图 2。可见,红花阴性样品对 3 种成分的测定无干扰。

线性关系考察:取上述对照品贮备溶液作为 5 号对照品溶液,分别精密吸取 50, 100, 1 000, 2 000 μ L,分别置 10 mL 容量瓶中,依次作为 1~4 号对照品溶液。分别取上述 1~5 号对照品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,以进样量(X, ng)为横坐标、相对应峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

精密度试验:分别精密收取线性关系考察项下的 1 号、3 号和 5 号对照品溶液,按拟订色谱条件连续进样 6 次。结果 1 号对照品溶液中羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷、红花黄色素 B 峰面积的 RSD 分别为 1.98%, 2.03%, 1.65% ($n=6$); 3 号对照品溶液中羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷、红花黄色素 B 峰面积的 RSD 分别为 1.37%, 1.55%, 1.12% ($n=6$); 5 号对照品中羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O- β -葡萄糖苷、红花黄色素 B 峰面积的 RSD 分别为 0.62%, 1.05%, 0.88% ($n=6$)。结果表明,仪器精密度良好。

稳定性试验:取上述供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定,连续考察 24 h,



1. 羟基红花黄色素 A 2. 6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷 3. 红花黄色素 B

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 红花药材阴性对照品溶液

图2 慢粒灵颗粒中3种黄酮类成分高效液相色谱图

表1 3种成分线性关系考察结果(n=3)

成分	线性方程	线性范围(ng)	相关系数(r)
A	$Y = 2.8213X - 9.4537$	25.04 ~ 5008.0	1.0000
B	$Y = 2.1783X + 1.9997$	21.36 ~ 4272.0	0.9999
C	$Y = 0.7194X - 5.9588$	19.92 ~ 3984.0	1.0000

注: A 为羟基红花黄色素 A; B 为 6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷; C 为红花黄色素 B。下表同。

记录色谱峰面积。结果羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷和红花黄色素 B 峰面积的 RSD 分别为 1.98%、2.32%、2.56% (n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取慢粒灵颗粒(批号为 20190320), 依法制备供试品溶液 6 份, 按拟订色谱条件分别进样测定。结果羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷和红花黄色素 B 的平均含量分别为 6.08、0.66、2.16 mg/g, RSD 分别为 2.01%、1.52%、1.36% (n=6), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取羟基红花黄色素 A 28.62 mg、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷 9.73 mg, 精密称定, 置同一 10 mL 容量瓶中, 加 25% 甲醇溶解稀释至刻度, 作为待加溶液 1; 取红花黄色素 B 8.28 mg, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加 25% 甲醇溶解并稀释至刻度, 作为待加溶液 2; 取已知含量的慢粒灵颗粒 6 份, 精密称定, 每份 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 向上述 6 份样品中分别加入上述待加溶液 1 和待加溶液 2 各 1 mL, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 并计算回收率。结果见表 2。

2.2.4 样品含量测定

取 3 批慢粒灵颗粒/胶囊, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 指标成分选择

预试验中, 首先采用 TLC 法对方中君药莪术和三棱进行薄层鉴别, 结果发现二者相同成分较多, 阴性成分互相有干扰, 通过调整展开剂比例和不同的供试品制备方法均未能排除干扰, 因此未将君药列入本研究。方中

表2 加样回收试验结果(n=6)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
A	0.5026	3.0558	2.8620	5.8621	98.05	96.43	1.48
	0.5012	3.0473	2.8620	5.7823	95.56		
	0.5046	3.0680	2.8620	5.7916	95.16		
	0.5038	3.0631	2.8620	5.7792	94.90		
	0.5029	3.0576	2.8620	5.8637	98.04		
	0.5015	3.0491	2.8620	5.8219	96.88		
B	0.5026	0.3317	0.3312	0.6502	96.16	95.88	0.66
	0.5012	0.3308	0.3312	0.6489	96.05		
	0.5046	0.3330	0.3312	0.6469	94.76		
	0.5038	0.3325	0.3312	0.6488	95.50		
	0.5029	0.3319	0.3312	0.6511	96.37		
	0.5015	0.3310	0.3312	0.6503	96.41		
C	0.5026	1.0856	0.9730	2.0285	96.90	95.25	1.06
	0.5012	1.0826	0.9730	1.9992	94.20		
	0.5046	1.0899	0.9730	2.0116	94.72		
	0.5038	1.0882	0.9730	2.0082	94.55		
	0.5029	1.0863	0.9730	2.0124	95.18		
	0.5015	1.0832	0.9730	2.0167	95.94		

表3 慢粒灵颗粒/胶囊中3种黄酮类成分含量测定结果(mg/g)

制剂	批号	A	B	C
颗粒	20190320	6.08	0.66	2.16
	20190706	5.63	0.72	1.85
	20180516	5.02	0.49	1.74
胶囊	20190704	6.29	0.85	2.67
	20190730	6.45	0.93	2.81
	20180801	6.68	1.01	3.19

青黛的主要成分靛玉红具有消炎、抗肿瘤等药理活性, 故选择 TLC 法进行鉴别控制; 红花有活血化瘀、消炎、抗肿瘤的功效, 其中以黄酮类成分羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O-β-葡萄糖苷和红花黄色素 B 含量较高, 因此, 选择上述 3 种成分为指标成分进行含量测定。

3.2 供试品溶液制备方法选择

首先考察不同提取溶剂(水、25% 甲醇、75% 甲醇和甲醇)的影响, 结果发现甲醇作为提取溶剂时, 羟基红花