

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.016

# 乳癖平颗粒质量标准研究

胡斌, 胡婧<sup>△</sup>, 邓莉, 马攀

(中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院药剂科, 重庆 400038)

**摘要:**目的 建立乳癖平颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对乳癖平颗粒中鸡血藤、山楂进行定性鉴别。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对乳癖平颗粒中的表儿茶素进行含量测定, 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(11:89, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。结果 鸡血藤、山楂的 TLC 特征斑点清晰, 阴性对照无干扰; 表儿茶素质量浓度在 8.216~41.080 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.9999$ ), 平均加样回收率为 102.50%, RSD 为 1.91% ( $n=6$ )。结论 该方法操作简单、快速、准确, 可用于乳癖平颗粒的质量控制。

**关键词:** 乳癖平颗粒; 表儿茶素; 山楂; 鸡血藤; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)19-0057-04

## Quality Standard of Rupiping Granules

HU Bin, HU Jing, DENG Li, MA Pan

(Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing, China 400038)

**Abstract: Objective** To establish the quality standard of Rupiping Granules. **Methods** Thin layer chromatography(TLC) method was employed to identify *Caulis spatholobi*, *Fructus crataegi*, and the content of epicatechin in Rupiping Granules was determined by reversed phase-high performance liquid chromatography(RP-HPLC). The chromatographic column was Diamonsil C<sub>18</sub> column(200 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid(11:89, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The characteristic spots of *Caulis spatholobi*, *Fructus crataegi* clearly appeared in the TLC, and there was no interference for the negative sample. The chromatographic peaks of epicatechin were well separated from other chromatographic peaks. The linear relationship between the concentration of epicatechin and the peak area was good in the range of 8.216~41.080 μg/mL( $r=0.9999$ ). The average recovery of epicatechin was 102.50%, RSD = 1.91% ( $n=6$ ). **Conclusion** The established method is simple, rapid, and accurate, which can be used for quality control of Rupiping Granules.

**Key words:** Rupiping Granules; epicatechin; *Fructus crataegi*; *Caulis spatholobi*; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; quality standard

第一作者: 胡斌, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药物制剂与分析, (电子信箱)hubin878@sina.com。

<sup>△</sup>通信作者: 胡婧, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药物制剂与分析, (电子信箱)18219797@qq.com。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 国家药品标准·新药转正标准(第50册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 58-61.
- [2] 古洪艳, 张声源, 黄文华, 等. 参芪扶正注射液的化学成分研究(Ⅱ)[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1494-1499.
- [3] 张强, 蔡军波, 陈鑫, 等. 参芪扶正注射液联合化疗治疗晚期三阴性乳腺癌32例[J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1866-1867.
- [4] 张声源, 范春林, 王磊, 等. 参芪扶正注射液的化学成分研究[J]. 中成药, 2011, 33(10): 1743-1747.
- [5] 舒娟, 杨胜斌. HPLC法同时测定参芪扶正注射液中6种成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(30): 4275-4277.
- [6] 邹小雅, 谭梅英, 廖丽锦, 等. 高效液相色谱法同时测定参芪扶正注射液中党参炔苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(5): 586-587.
- [7] 刘潇潇, 杨立伟, 于江泳, 等. HPLC法测定参芪扶正注射液中5-羟甲基糠醛的含量及其来源的初步探讨[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 639-642.
- [8] 王欣, 覃瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.
- [9] 黄俊忠, 曾兰花, 陈高翔, 等. 一测多评法测定京都念慈菴蜜炼川贝枇杷膏中苯甲醛和薄荷脑含量[J]. 中国药师, 2017, 20(10): 1881-1883.
- [10] 张玉杰, 李明春, 梁廷春, 等. HPLC法测定参芪苓口服液中药参炔苷的含量[J]. 中国药师, 2015, 18(9): 1608-1609.
- [11] 沈小钟, 刘瑶, 杨燕军, 等. 一测多评法研究进展[J]. 中国药业, 2013, 22(13): 1-5.
- [12] 王高峰. HPLC法同时测定党参中5种核苷和碱基[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5): 315-319.
- [13] 张艳丽, 杨雁芸, 白志尧, 等. UPLC-MS/MS法同时测定党参中7种核苷的含量[J]. 中国医药科学, 2018, 8(13): 68-71.
- [14] 何兵, 杨世艳, 张燕. 一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究[J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1653-1659.
- [15] 左岚, 孟胜男. 一测多评法在中药药物分析中的应用进展[J]. 中国药房, 2016, 27(18): 2589-2592.

(收稿日期: 2019-11-25; 修回日期: 2020-05-16)

乳腺增生症又称小叶增生、乳腺结构不良症,是患者乳腺体和间质不同程度地增生与复旧不全,造成乳腺结构在数量及组织形态上表现异常,具有病程长、发展慢、易复发等特点<sup>[1]</sup>,常见于25~40岁的中青年妇女<sup>[2]</sup>。乳腺增生为乳腺常见病、多发病,被认为是乳腺癌的一种良性病变<sup>[3]</sup>。乳癖平颗粒为我院的院内制剂,由通草、山楂、鸡血藤等药材组方,具有活血化瘀、软坚散结、镇痛消肿的功效,用于治疗各种乳腺增生性疾病。方中山楂与鸡血藤占比较高,且均含有表儿茶素<sup>[4-5]</sup>。本研究建立了表儿茶素进行含量测定的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,旨在对乳癖平颗粒制剂质量进行控制,保证制剂生产的稳定性和临床的有效性。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);ZF-1 型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);BT124S 型电子天平(精度为0.1 mg),BP 211D 型电子天平(精度为0.01 mg),均由赛多利斯科学仪器有限公司生产;KQ-4000KDE 型高功率数控清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为400 W,频率为40 kHz);硅胶G薄层板(青岛海陵硅胶干燥剂厂);聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂)。

### 1.2 试药

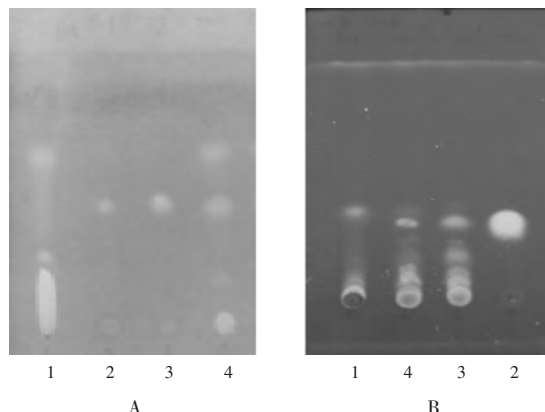
表儿茶素对照品(中国药品生物制品检定所,批号为110878-200102,纯度为100.0%);枸橼酸对照品(批号为100396-200302,纯度为100.0%),芒果花素对照品(批号为111703-200603,纯度为100.0%),均购自中国食品药品检定研究院;山楂对照药材(批号为121138-200905),鸡血藤对照药材(批号为121173-200903),均购自中国药品生物制品检定所;乳癖平颗粒(批号分别为180805,180815,180820,180826,180828,180910,180912,180916,180920,180928,我院院内制剂);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);超纯水、其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层色谱鉴别

山楂:取样品10 g,加甲醇20 mL,超声处理15 min,滤过,取滤液作为供试品溶液。取处方中除山楂药材以外的其余药材,制成阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。另取山楂对照药材0.1 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。再取枸橼酸对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.125 mg的对照品溶液。取上述4种溶液各8  $\mu$ L,分别点于同一块聚酰胺薄膜上,以乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:4:1, V/V/V)为展开

剂,展开,取出,晾干,喷以0.1%溴甲酚绿乙醇溶液,日光下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液、对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图1 A。



1. 阴性对照品溶液 2. 对照品溶液 3. 对照药材溶液  
4. 供试品溶液  
A. 山楂 B. 鸡血藤

图1 薄层色谱图

鸡血藤:取样品10 g,加乙醚100 mL,超声处理30 min,分取乙醚层,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取处方中除鸡血藤药材以外的其余药材,制成阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。另取鸡血藤对照药材4 g,加水煎煮2次,浓缩至10 mL,加乙醚20 mL,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。再取芒果花素对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.05 mg的对照品溶液。取上述4种溶液各20  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-氯仿-乙酸乙酯(20:3:12, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯下(254 nm)检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液、对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图1 B。

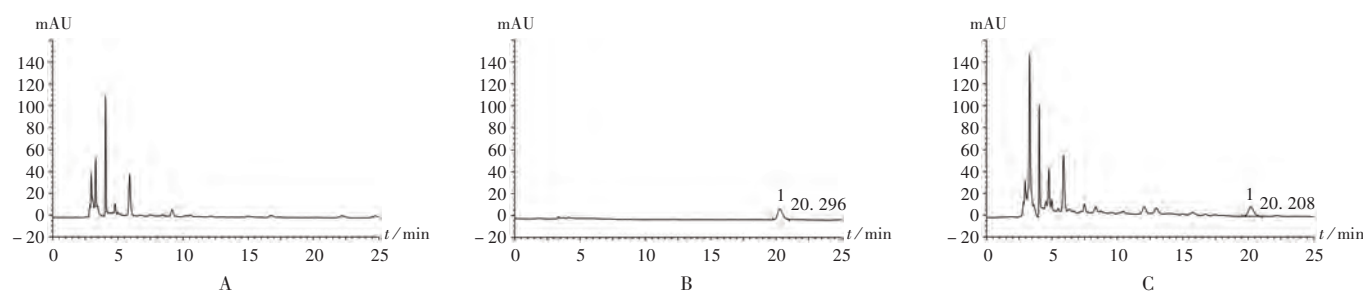
### 2.2 含量测定

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C<sub>18</sub>柱(200 mm×4.6 mm,5  $\mu$ m);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30  $^{\circ}$ C;进样量:20  $\mu$ L。

#### 2.2.2 溶液制备

取表儿茶素对照品(批号为110878-200102)10.27 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇稀释、溶解、定容并摇匀,制成质量浓度为0.4108 mg/mL的表儿茶素对照品贮备液;取贮备液1 mL,置25 mL容量瓶中,用甲醇稀释成每1 mL含16.43  $\mu$ g的对照品溶液。取乳癖平颗粒,研细,取2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超



1. 表儿茶素

A. 阴性对照品溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图2 反相高效液相色谱图

声(60 kHz)处理30 min,取出,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例取缺山楂、鸡血藤的各药材,加水煎煮,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

### 2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2.2项下3种溶液各20  $\mu$ L,进样测定,记录色谱图。结果见图2。

线性关系考察:取表儿茶素对照品10.27 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加入甲醇稀释、溶解并定容至刻度,得质量浓度为410.8  $\mu$ g/mL的溶液。分别取0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,稀释至10 mL,制成质量浓度为8.216, 16.432, 24.648, 32.864, 41.080  $\mu$ g/mL的对照品溶液,进样20  $\mu$ L,记录色谱图,以进样质量浓度为横坐标(C)、峰面积为纵坐标(A)绘制标准曲线,得回归方程 $A = 14.25C + 2.58$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 5$ )。结果表明,表儿茶素质量浓度在8.216~41.08  $\mu$ g/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液20  $\mu$ L,按拟订色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果的RSD为0.76% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为180910)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,于常温下放置0, 2, 4, 6, 12, 24 h后进样,测定峰面积。结果的RSD为1.88% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取乳癖平颗粒(批号为180910)共6份,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果测得表儿茶素含量平均值为0.2718 mg/g, RSD为1.89% ( $n = 6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取6份已知含量(0.2718 mg/g)的乳癖平颗粒(批号为180910)1.0 g,精密称定,另取表儿茶素对照品12.10 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,取5 mL置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,即得对照品溶液(每1 mL含表儿茶素0.2420 mg)。精密量取对照品溶液1 mL,置各样品中,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果见表1。

表1 表儿茶素加样回收试验结果( $n = 6$ )

| 取样量<br>(g) | 样品含量<br>(mg) | 加入量<br>(mg) | 测得量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | $\bar{X}$<br>(%) | RSD<br>(%) |
|------------|--------------|-------------|-------------|------------|------------------|------------|
| 0.9938     | 0.2701       | 0.2420      | 0.5220      | 104.09     | 102.50           | 1.91       |
| 0.9997     | 0.2717       | 0.2420      | 0.5174      | 101.53     |                  |            |
| 0.9970     | 0.2710       | 0.2420      | 0.5208      | 103.22     |                  |            |
| 1.0029     | 0.2726       | 0.2420      | 0.5194      | 101.98     |                  |            |
| 0.9940     | 0.2702       | 0.2420      | 0.5238      | 104.79     |                  |            |
| 0.9969     | 0.2710       | 0.2420      | 0.5115      | 99.38      |                  |            |

### 2.2.4 样品含量测定

分别取10批样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量。结果批号分别为180805, 180815, 180820, 180826, 180828, 180910, 180912, 180916, 180920, 180928的样品中每10 g表儿茶素的含量平均值约为1.40 mg。考虑到中药材原料含量季节性强、波动大,以平均值下浮20%制订本制剂的含量限度,故暂定每袋颗粒(10 g)中表儿茶素不得低于1.12 mg。

## 3 讨论

### 3.1 薄层色谱条件选择

在进行TLC鉴别时,考虑可能保留的成分为水溶性成分,根据文献[4-6]与预试验结果综合分析,确定鉴别成分为山楂中的枸橼酸和鸡血藤中的芒柄花素。在山楂的TLC鉴别中,曾尝试了以展开剂三氯甲烷-甲醇-甲酸(10:1:0.1, V/V/V)<sup>[7]</sup>为基础,调整比例,在硅胶G板上展开,分离效果不好,干扰大,把硅胶G板变为聚酰胺薄膜后,发现聚酰胺薄膜对枸橼酸这种极性化合物有特异的分辨能力,分离效果明显改变。优化展开剂,用极性更大更环保的乙酸乙酯代替三氯甲烷,调节各组比例,展开剂变为乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:4:1, V/V/V)后,薄层色谱效果明显变好,显色后黄色斑点清晰,无干扰,分离度好。在鸡血藤的TLC鉴别中,尝试了多种展开剂<sup>[8-11]</sup>,杂质多,干扰大,改用乙醚代替乙酸乙酯提取后,杂质明显减少,调整展开剂后,分离度好,无干扰,定为最优条件。

### 3.2 HPLC 条件选择

曾对聚酰胺柱色谱法<sup>[12]</sup>与超声提取法进行了比较,发现聚酰胺柱色谱法能很好地去掉供试品中的杂质,但耗时长,损失大;超声提取法方便、快捷,但杂质含量较高,考虑到实际生产检验需要,选取了快捷、高效、方便的超声提取法,通过改变 HPLC 条件<sup>[12-15]</sup>,达到测定目的。

### 3.3 指标成分选择

曾以枸橼酸<sup>[7,16-17]</sup>、芒柄花素<sup>[9]</sup>、熊果酸<sup>[18]</sup>及金丝桃苷<sup>[19-20]</sup>为主要指标成分,采用 HPLC 法对其进行测定。枸橼酸对照品 9 min 后出峰,样品成分复杂且含量在此处干扰峰多,曾试过多种提纯方法,效果不明显;芒柄花素、金丝桃苷及熊果苷均是对照品出峰正常,供试品中均无相应峰出现。考虑枸橼酸、芒柄花素都是 TLC 鉴别的成分,含量、稳定性都应优于其他成分,应成为后期研究的重点。

### 3.4 提取方法及提取条件选择

提取方法考察:取乳癖平颗粒(批号为 180910)2.0 g,精密称定,分别采用超声(60 kHz)处理 30 min 和加热回流 30 min 的方法处理,按拟订色谱条件进样测定。结果加热回流和超声提取表儿茶素含量分别为 0.23, 0.24 mg/g。可见,2 种方法的提取率无明显差异,因超声处理较简便,故采用超声方法进行提取。

提取溶剂考察:取乳癖平颗粒(批号为 180910)2.0 g,精密称定,分别用 100% 甲醇,80% 甲醇,50% 甲醇,30% 甲醇各 25 mL,超声(60 kHz)提取 30 min,按拟订色谱条件进样测定。结果表儿茶素含量分别为 0.08, 0.15, 0.23, 0.19 mg/g。可见,采用 50% 甲醇提取时表儿茶素提取率较高,且杂质较少,故选用 50% 甲醇作为提取溶剂。

提取溶剂量考察:取乳癖平颗粒(批号为 180910)2.0 g,精密称定,分别加入 50% 甲醇 10, 20, 25, 30, 40, 50 mL,超声(60 kHz)提取 30 min,按拟订色谱条件进样测定,计算含量。结果表儿茶素含量分别为 0.20, 0.22, 0.23, 0.23, 0.23, 0.24 mg/g。可见,加入 50% 甲醇量为 25 mL 时,能基本将表儿茶素提取完全,故选用 25 mL 50% 甲醇为提取溶剂量。

提取时间考察:取乳癖平颗粒(批号为 180910)2.0 g,精密称定,加入 50% 甲醇 25 mL,分别超声(60 kHz)提取 10, 20, 30, 40, 50, 60 min,按拟订色谱条件进样测定。结果表儿茶素含量分别为 0.218, 0.223, 0.240, 0.235, 0.236, 0.238 mg/g。可见,30 min 后,提取量无明显变化,故提取时间确定为 30 min。

### 3.5 方法评价

本研究中建立的质量标准可控性好,操作简单、快速,结果准确,可用于乳癖平颗粒的质量控制。

#### 参考文献:

- [1] 赵文静, 汪建伟, 常怀智, 等. 仙鹿消癥胶囊对乳腺增生模型小鼠血管生成因子 VEGF、bFGF、MVD 表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(3): 74-78.
- [2] 李 才, 任立群. 病理模型与实验病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 426.
- [3] 连小龙, 韩 涛. 中药抗乳腺增生作用机制研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(3): 80-82.
- [4] 刘荣华, 邵 峰, 邓雅琼, 等. 山楂化学成分研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(7): 1100-1103.
- [5] 陈建萍, 王冬梅. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1229-1234.
- [6] 宴仁仪, 魏洁麟, 杨 滨. 山楂化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1066-1068.
- [7] 王玉团, 石海燕, 徐 男, 等. 山楂提取物的质量标准研究[J]. 药学研究, 2015, 34(7): 387-390.
- [8] 翟 明, 刘民军. 鸡血藤与其常见混淆品的薄层色谱鉴别研究[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(3): 305-307.
- [9] 吴鲁东, 张戴英, 余馥佳. 牛大力的质量评价研究[J]. 今日药学, 2015, 25(2): 90-92.
- [10] 张玲玲, 王楠柯, 徐 云, 等. 鬼箭锦鸡儿中芒柄花素的薄层鉴别及总黄酮的测定[J]. 华西医学杂志, 2018, 33(2): 200-202.
- [11] 肖聪彦, 陈逸塑. 舒脊片中鸡血藤的薄层色谱鉴别研究[J]. 北方药学, 2016, 13(2): 2-3.
- [12] 赵英兰, 林 彩, 贺红军, 等. 山楂药材中表儿茶素的提取及含量测定[J]. 中国药业, 2009, 18(12): 34-35.
- [13] 王 敏, 马玉梅, 周晓松. RP-HPLC 法测定猕猴桃根中儿茶素和表儿茶素含量[J]. 食品研究与发展, 2018, 39(18): 168-172.
- [14] 陆雪丽, 潘晓娟, 邓萌萌, 等. 鸡血藤提取物的 TLC 鉴别及儿茶素和表儿茶素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 88-92.
- [15] 陈晓静, 何 杰, 杨建云, 等. RP-HPLC 法同时测定葡萄籽提取物中没食子酸、儿茶素和表儿茶素的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 723-727.
- [16] 符 影, 程 悦. 化癥散结片的质量标准研究[J]. 西北化学杂志, 2014, 29(2): 135-137.
- [17] 杨 滨, 李 化, 汤树良, 等. 高效液相色谱法测定山楂中枸橼酸的含量[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(9): 697-699.
- [18] 刘慧妍, 黄馨慧, 张艳海. HPLC 法快速测定 8 种中药中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中草药, 2017, 48(10): 1998-2001.
- [19] 陈宝龙, 黄 琦, 郑朝华, 等. 高效液相色谱测定山楂中金丝桃苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 24-26.
- [20] 张忠会, 秦 婷, 王惠达, 等. RP-HPLC 法测定山楂提取物中金丝桃苷的含量[J]. 中草药, 2004, 35(8): 884-885.

(收稿日期: 2019-12-26)