

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.014

瓜蒌当归降脂颗粒质量标准研究*

李媛, 朱建勇, 顾伟鹰, 时扣荣, 刘娟, 张春燕, 罗兰[△]

(上海中医药大学附属第七人民医院, 上海 200137)

摘要:目的 建立瓜蒌当归降脂颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的当归、决明子、山楂进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定阿魏酸、橙黄决明素的含量,色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.1% 磷酸溶液-甲醇(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 284 nm,柱温为 25℃,进样量为 10 μL。结果 当归、决明子、山楂的 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。精密性、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2.0%;阿魏酸、橙黄决明素进样量分别在 0.01~0.20 μg, 0.02~0.40 μg 范围内与峰面积线性关系良好;平均加样回收率分别为 101.83% 和 105.19%, RSD 分别为 3.47% 和 4.90% (n=6)。结论 所建立的质量标准可用于瓜蒌当归降脂颗粒的质量控制。

关键词:瓜蒌当归降脂颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;阿魏酸;橙黄决明素;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0050-05

Quality Standard of Gualou Danggui Jiangzhi Granules

LI Yuan, ZHU Jianyong, GU Weiyong, SHI Kourong, LIU Juan, ZHANG Chunyan, LUO Lan

(The Seventh People's Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 200137)

Abstract: Objective To establish the quality control standard of Gualou Danggui Jiangzhi Granules. Methods Thin-layer chromatography(TLC) method was adopted for the qualitative identification of *Radix Angelicae sinensis*, *Semen Cassiae obtusifolia* and *Fructus Crataegus pinnatifidia* in this preparation. High-performance liquid chromatography(HPLC) method was adopted for the content determination of ferulic acid and aurantio-obtusin, the chromatographic column was Agilent C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid-methanol(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 284 nm, the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 25℃. Results The TLC spots of *Radix Angelicae sinensis*, *Semen Cassiae obtusifolia* and *Fructus Crataegus pinnatifidia* were clear and well separated without negative interference. The RSDs of precision,

*基金项目:上海市卫生健康委员会中医药传承和科技创新项目[ZYSK2019029];上海市浦东新区中医药科技孵化专项[PDZYKJFH-201809]。

第一作者:李媛,女,硕士研究生,研究方向为新药研发,(电子信箱)1097072374@qq.com。

[△]通信作者:罗兰,女,博士研究生,主任药师,副教授,研究方向为中药新药研发,(电子信箱)114820703@163.com。

加工、炮制、储存过程中,应注意杯苋甾酮的不稳定性。

中药成分复杂,与疗效相关的多指标控制是中药质量管理的必然发展趋势^[13]。本研究在 2015 年版《中国药典(一部)》筋骨草质量控制基础上,建立了 HPLC 波长切换法同时测定筋骨草中 5 种成分的含量,方法高效、简便,可重复,可为筋骨草药材及其制剂质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 岳党昆,丁广治,王维皓,等. HPLC 测定筋骨草中乙酰哈巴苷的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(4):289-290.
- [2] 熊焰,曲玮,梁敬钰. 筋骨草属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2012,24(2):1-7.
- [3] 唐洁,吕云瑶,龙之浩,等. 筋骨草水煎液对急性肺炎的保护作用研究[J]. 川北医学院学报,2017,32(3):329-331.
- [4] 王锦玉,孙晓丽,全燕,等. 筋骨草中总环烯醚萜苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):3-5.
- [5] 聂万松,汪艳,占晓敏,等. 液相色谱法测定筋骨草胶囊特征图谱研究[J]. 安徽医药,2019,23(1):46-48.

- [6] 王锦玉,全燕,王智民,等. RP-HPLC 法同时测定筋骨草药材中哈巴苷和乙酰哈巴苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):26-28.
- [7] 温彬宇,李建荣. HPLC-ELSD 同时测定筋骨草药材中乙酰哈巴苷和哈巴苷含量[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(7):89-92.
- [8] CHEN Y, YANG F, AO H, et al. Study on chemical constituents of *Ajuga ovalifolia* var. *calantha* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(17):3475-3479.
- [9] 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,2015:346.
- [10] 黄茂,范文辉,殷凯生. 木犀草素抑制支气管哮喘气道重塑的作用[J]. 中国临床康复,2006,10(47):82-84.
- [11] 赵稳兴,陈忠明,侯辉,等. 木犀草素降低 CCL₄ 诱导的大鼠肝纤维化[J]. 世界华人消化杂志,2002,10(7):779-782.
- [12] 陈昊,梁敬钰,孙建博,等. 筋骨草属植物中二萜类成分的化学及药理活性研究进展[J]. 海峡药学,2017,29(3):1-10.
- [13] 张永文. 试谈中药新药质量标准制定的整体思路[J]. 中国新药杂志,2017,26(18):2185-2189.

(收稿日期:2020-08-05)

repeatability and stability tests were less than 2.0%, the linear ranges of ferulic acid and aurantholone were 0.01–0.20 μg and 0.02–0.40 μg , respectively. The average recoveries of ferulic acid and aurantholone were 101.83% and 105.19% with RSDs of 3.47% and 4.90% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The established standard can be used for the quality control of Gualou Danggui Jiangzhi Granules.

Key words: Gualou Danggui Jiangzhi Granules; TLC; HPLC; ferulic acid; aurantholone; quality standard

瓜蒌当归降脂方由当归、瓜蒌、泽泻、决明子、山楂5味中药组方,为上海市名老中医叶景华教授的经验方,临床应用20余年,对高脂血症有显著疗效。其临床应用剂型为汤剂,保质期短,口感欠佳,服用不便,且不利于贮存和运输。运用现代技术将其剂型由汤剂改为颗粒剂,对于该方的临床应用有积极意义。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中当归、决明子、山楂进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定阿魏酸及橙黄决明素的含量,为建立瓜蒌当归降脂颗粒的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); BD-II 型多功能紫外分析仪(北京启航博达有限公司); CP225D 型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司); DL720-A 型超声清洗仪(上海之信仪器有限公司); HWS28 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); SHZ-D III 型循环水式真空泵(郑州博科设备有限公司); DNG-9140A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); RV-10 型旋转蒸发器(德国 IKA 公司)。

1.2 试剂

瓜蒌当归降脂颗粒(医院制剂,批号分别为20190901,20190902,20190903);熊果酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为 L03A6Y1,含量 $\geq 98\%$);

阿魏酸对照品(批号为 110773-201614,含量 $\geq 98\%$),橙黄决明素对照品(批号为 111900-201605,含量 $\geq 98\%$),大黄酚(批号为 110796-201922,含量 $\geq 98\%$),均购于中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水;瓜蒌、当归、泽泻、决明子、山楂药材均购于上海康桥药业有限公司,经上海市第七人民医院药剂科副主任中药师公丕君鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

决明子^[1-3]:取样品 10 g,加水 100 mL,超声(功率 600 W,频率 40 kHz,下同)处理 30 min,滤过,取续滤液 50 mL,加入盐酸 1 mL,用 50 mL 水饱和正丁醇振摇提取 2 次,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取橙黄决明素、大黄酚对照品各适量,加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1, V/V),制成质量浓度均为 1 mg/mL 的单一对照品溶液。按瓜蒌当归降脂颗粒处方工艺制备缺决明子的阴性样品,同法制成阴性对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(一部)》通则 0502 项下方法试验,分别取上述 4 种溶液各 2 μL ,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以石油醚-丙酮(2:1, V/V)为展开剂,置氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,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。详见图 1 A。

当归^[4-5]:取样品 10 g,加水 100 mL,超声处理 30 min,

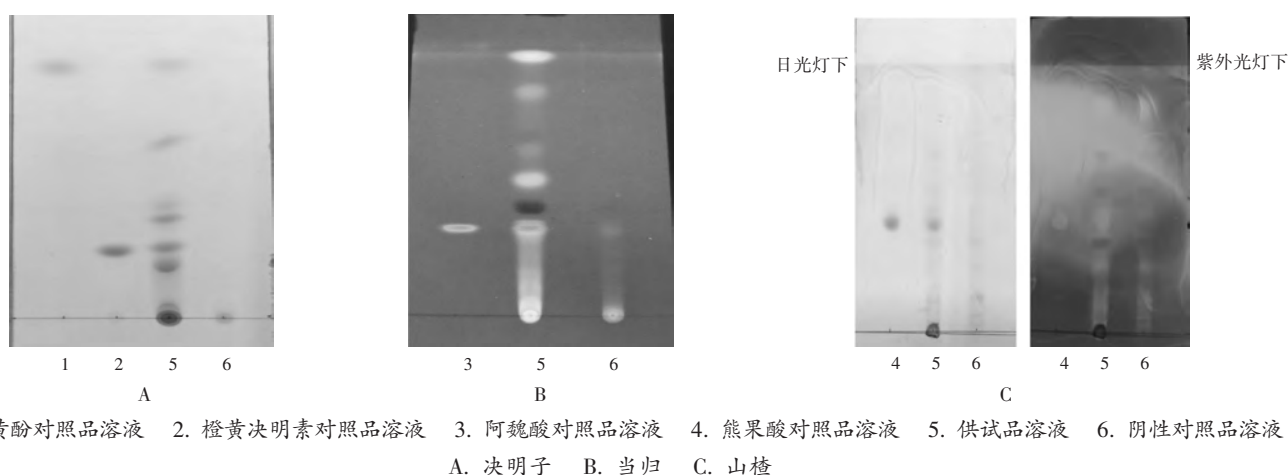


图1 薄层色谱图

1. chrysophanol reference solution 2. aurantholone reference solution 3. ferulic acid reference solution 4. ursolic acid reference solution
5. test material solution 6. negative reference solution

A. *Radix Angelicae sinensis* B. *Semen Cassiae obtusifolia* C. *Fructus Crataegus pinnatifida*

Fig. 1 TLC chromatograms

滤过,取续滤液 50 mL,加入盐酸 1 mL,用 100 mL 二氯甲烷振摇提取 2 次,合并萃取液,蒸干,残渣加 1 mL 甲醇使溶解,作为供试品溶液。取阿魏酸对照品,加甲醇制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。按瓜蒌当归降脂颗粒处方工艺制备缺当归的阴性样品,同法制成阴性对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(一部)》通则 0502 项下方法试验,分别取上述 3 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以石油醚-二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(4:2:2:0.1, V/V/V/V)为展开剂,置氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,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。详见图 1 B。

山楂^[6-8]:取样品 10 g,加水 100 mL,超声处理 30 min,滤过,取续滤液 50 mL,用石油醚振摇提取 2 次,每次 100 mL,合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取熊果酸对照品,加甲醇制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。按瓜蒌当归降脂颗粒处方工艺制备缺山楂的阴性样品,同法制成阴性对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(一部)》通则 0502 项下方法试验,分别取上述 3 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:4:0.5, V/V/V)为展开剂,置氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置日光下及紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,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。详见图 1 C。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[9-14]

色谱柱:Agilent C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:0.1% 磷酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速:1.0 mL/min;检测波长:284 nm;进

样量:10 μ L;柱温:25 $^{\circ}$ C。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs of the mobile phase		
时间(min)	A(%)	B(%)
0~20	75 $\rightarrow$ 30	25 $\rightarrow$ 70
20~25	30 $\rightarrow$ 20	70 $\rightarrow$ 80
25~28	20	80
28~31	20 $\rightarrow$ 75	80 $\rightarrow$ 25
31~35	75	25

2.2.2 溶液制备

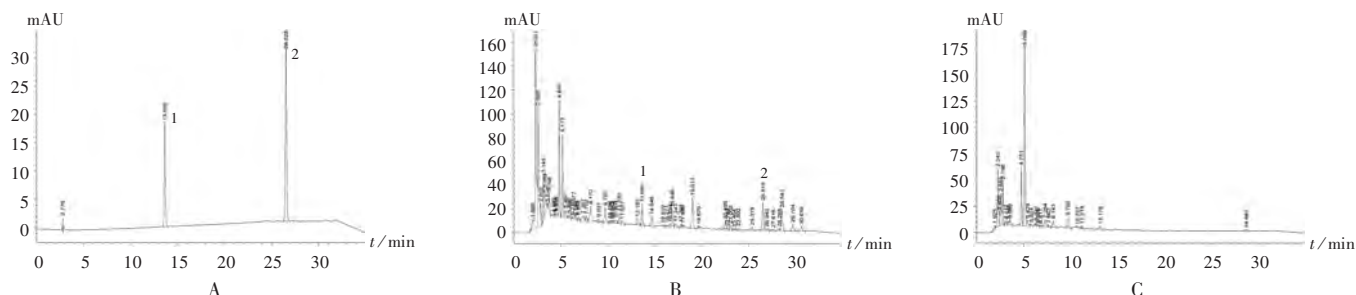
精密称取阿魏酸、橙黄决明素对照品各适量,加 50% 甲醇溶解,制成阿魏酸、橙黄决明素质量浓度分别为 10, 20 μ g/mL 的混合对照品溶液。取样品约 1.5 g,精密称定,加入 50% 甲醇 25 mL,超声处理 10 min,放冷至室温,补足减少的体积,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按瓜蒌当归降脂颗粒处方工艺制备缺当归、决明子的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2.2 项下 3 种溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图 2。结果显示,阴性对照品溶液在与阿魏酸、橙黄决明素对照品溶液相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。

线性关系考察:分别精密量取 2.2.2 项下混合对照品溶液 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 μ L,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(X , μ L)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得阿魏酸、橙黄决明素回归方程 $Y_1 = 1\,638.542\,6X_1 + 1.415\,6$ ($r_1 = 0.999\,7$), $Y_2 = 819.271\,3X_2 + 1.415\,6$ ($r_2 = 0.999\,7$)。结果,阿魏酸、橙黄决明素进样量分别在 0.01~0.20 μ g 和 0.02~0.40 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2.2 项下混合对照品溶液适量,



1. 阿魏酸 2. 橙黄决明素
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

1. ferulic acid 2. aurantio-obtusin
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果阿魏酸、橙黄决明素峰面积的 *RSD* 分别为 0.25% 和 0.50% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2.2 项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0,2,10,18,24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果,阿魏酸、橙黄决明素峰面积的 *RSD* 分别为 1.92% 和 0.99% ($n=5$),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:称取样品(批号为 20190901)适量,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果阿魏酸、橙黄决明素平均含量分别为 1.67% 和 6.09%,*RSD* 分别为 0.37% 和 0.34% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 20190901)适量,共 6 份,分别加入一定质量浓度的对照品溶液,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	<i>RSD</i> (%)
阿魏酸	0.011 0	0.010 0	0.021 6	106.00	101.83	3.47
	0.011 0	0.010 0	0.021 3	103.00		
	0.011 0	0.010 0	0.021 5	105.00		
	0.011 0	0.010 0	0.020 6	96.00		
	0.011 0	0.010 0	0.021 0	100.00		
	0.011 0	0.010 0	0.021 1	101.00		
橙黄决明素	0.060 0	0.060 0	0.121 8	103.00	105.19	4.90
	0.060 0	0.060 0	0.123 5	105.83		
	0.060 0	0.060 0	0.123 4	105.67		
	0.060 0	0.060 0	0.120 0	100.00		
	0.060 0	0.060 0	0.128 8	114.67		
	0.060 0	0.060 0	0.121 2	102.00		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品各适量,分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,平行测定 3 次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表 3。

3 讨论

本研究中当归、决明子、山楂的 TLC 鉴别主要参考 2015 年版《中国药典(一部)》的方法^[15]。当归的 TLC 鉴别中,药典采用乙醚提取当归药材中的阿魏酸,在样品的制备过程中考虑到安全性及阿魏酸的物理性质,先用盐酸调酸性,再用二氯甲烷分步萃取,作为供试品溶液。药典以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(4:1:

表 3 样品中阿魏酸、橙黄决明素含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab. 3 Results of content determination of ferulic acid and auranthio-obtusins in the samples(mg/g, $n=3$)

批号	阿魏酸	橙黄决明素
20190901	0.219	1.25
20190902	0.219	1.25
20190903	0.218	1.25

1:0.1, $V/V/V/V$)为展开剂,本研究中采用应用范围较广的石油醚代替环己烷,并将比例调整为 4:2:2:0.1($V/V/V/V$),荧光斑点显色清晰,分离度效果较好。决明子的 TLC 鉴别中,药典采用乙醚提取,后以三氯甲烷溶解。鉴于 2 种试剂的安全性差,以及结合橙黄决明素的物理性质,本研究中采用正丁醇提取,制备供试品溶液,结果表明该制备方法可行,效果良好。山楂的 TLC 鉴别中,预试验中分别用乙酸乙酯和石油醚萃取,前者干扰杂质较多不易分离,而采用石油醚萃取后制备供试品溶液,效果较好。

初期根据处方中药材的化学成分及药理作用对含量测定指标进行选择。瓜蒌药材中 3,29-二苯甲酰栝楼仁三醇,泽泻药材中 23-乙酰泽泻醇 B 的溶解性较差^[16],不适合作为该制剂的质量控制指标,故选择当归药材中的阿魏酸及决明子药材中的橙黄决明素作为检测指标。

HPLC 法测定含量方面,本研究中采用同一波长,同时检测 2 种成分的方法^[17],梯度洗脱时间设定在 40 min 时 2 种成分保留时间相差较大,峰形良好且分离度佳,各组分互不干扰,方法简单、易行,结果可靠。

样品中橙黄决明素的含量为 1.25 mg/g,虽略超线性范围,但因橙黄决明素的线性关系良好,仍认为制备的样品稳定。

本研究中建立了瓜蒌当归降脂颗粒中 3 种药材的 TLC 定性鉴别方法和 2 种有效成分的含量测定方法,方法简便可行,灵敏度高,准确度高,重复性好,可用于瓜蒌当归降脂颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 郑智慧,谢鸣坤,梁华伦,等. 决明子薄层鉴别方法改进研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(12):139-142.
- [2] 黄小平,钟国跃,张雪梅,等. 决明子薄层鉴别方法研究[J]. 重庆中草药研究,2011(1):53.
- [3] 胡轶娟,万丽,张加雄,等. 决明子药材薄层色谱鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(11):2129.
- [4] 谢仲德,方应权,李文烈,等. 当归调经胶囊的薄层鉴别与阿魏酸、芍药苷的测定[J]. 中成药,2013,35(2):427-430.
- [5] 杨永寿,肖培云. 当归片质量标准的研究[J]. 云南中医中药杂志,2008,29(1):33-34.
- [6] 黄超华,吴杰,骆妃静. 山楂中熊果酸的提取与分离[J].