

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.11.014

藏药六味大托叶云实散质量标准研究

刘婷婷¹, 杨玲霞², 罗宇¹, 陈鸣¹

(1. 西安交通大学第一附属医院药学部, 陕西 西安 710065; 2. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070)
摘要:目的 完善藏药六味大托叶云实散的质量标准。方法 采用薄层色谱法对方中石榴子、红花进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定红花中羟基红花黄色素 A 的含量,色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-0.7% 磷酸溶液(26:2:72, V/V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 403 nm,柱温为 25 ℃,进样量为 10 μL。结果 石榴子、红花的薄层色谱清晰,阴性对照无干扰。羟基红花黄色素 A 进样量在 17.92~215.04 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 2$, $n=6$);平均加样回收率为 100.46%, RSD 为 0.79% ($n=6$);精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.0% ($n=6$)。结论 该方法简便,可操作性强,重复性好,专属性强,可为提高藏药六味大托叶云实散的质量标准提供参考。

关键词:藏药;六味大托叶云实散;石榴子;红花;羟基红花黄色素 A;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

中图分类号:R932;R284.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)11-0050-03

Quality Standard of Tibetan Medicine Liuwei Datuoyeyunshi Powder

LIU Tingting¹, YANG Lingxia², LUO Yu¹, CHEN Ming¹

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou, Gansu, China 730070)

Abstract: **Objective** To improve the quality standard of Tibetan medicine Liuwei Datuoyeyunshi Powder. **Methods** Thin-layer chromatography(TLC) method was used to qualitatively identify *Semen Punicae granati* and *Carthamus tinctorious* in Liuwei Datuoyeyunshi Powder. High-performance liquid chromatography(HPLC) method was used to determine the content of hydroxyl safflower yellow pigment A, the chromatographic column was Agilent C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-acetonitrile-0.7% phosphate solution(26:2:72, V/V/V), the flow was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 403 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spectra of *Semen Punicae granati* and *Carthamus tinctorious* were clear, and the negative control had no interference. The mass concentration of hydroxyl safflower yellow pigment A showed a good linear relationship with the peak area in the range of 17.92~215.04 μg/mL ($r=0.999\ 2$, $n=6$). The average recovery of hydroxyl safflower yellow pigment A was 100.46% with RSD of 0.79% ($n=6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 1.0% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, easy to operate, reproducible and specific, which can provide a reference for improving the quality standard of Tibetan medicine Liuwei Datuoyeyunshi Powder.

Key words: Tibetan medicine; Liuwei Datuoyeyunshi Powder; *Semen Punicae granati*; *Carthamus tinctorious*; hydroxyl safflower yellow pigment A; TLC; HPLC; quality standard

六味大托叶云实散由大托叶云实、红花、石榴子、肉桂等 6 味中药组方,是藏医治疗妇科疾病常用方剂,疗效确切^[1]。其现行质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药(第一册)》^[2],但无定性和定量指标,仅收载了常规检查项,已不能很好适应现代化控制药品质量的要求。为全面控制该制剂的质量,本研究中采用薄层色谱法对方中石榴子、红花进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱法测定红花中指标成分羟基红花黄色素 A 的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); KQ-700TDE 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 700 W,频率为 80 kHz);XS205DU 型分析

天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,精度为十万分之一);5810R 型低温离心机(德国艾本德公司)。

1.2 试剂

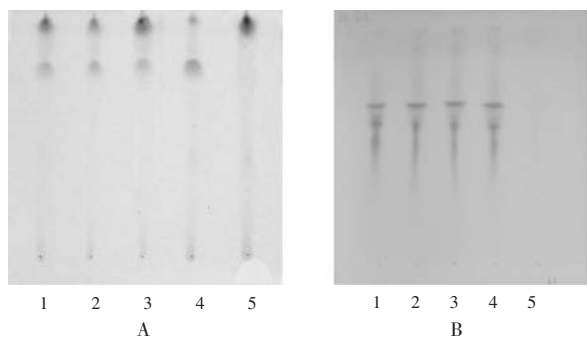
六味大托叶云实散(天祝藏族自治县藏医药开发研究所,批号分别为 20030302, 20042602, 20050901);石榴子对照药材(批号为 121431-201002),红花对照药材(批号为 120907-201713),羟基红花黄色素 A 对照品(批号为 111637-201810,含量以 93.1% 计),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

石榴子:取样品 3 g,加乙醇并超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至干,加乙醇 2 mL 溶解,作为供试品溶液。

另取石榴子对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。按处方比例及工艺, 制备不含石榴子的阴性对照样品, 同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-甲醇(6:4, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 下烘至斑点显色清晰。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斑点, 且阴性对照无干扰。色谱图见图 1 A(温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 36%, 展距为 10 cm)。



1. 对照品溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 石榴子 B. 红花

图 1 薄层色谱图

1. reference solution 2-4. test solution 5. negative reference solution

A. Semen Punicae granati B. Carthamus tinctorius

Fig. 1 TLC chromatograms

红花: 取本品 2 g, 加 80% 丙酮 6 mL, 超声处理 20 min, 离心, 取上清液作为供试品溶液。取红花对照药材 0.5 g, 同法制成对照药材溶液。按处方比例及工艺制备不含红花的阴性对照样品, 同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇(7:3:2:0.4, V/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, 在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰。色谱图见图 1 B(温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 38%, 展距为 10 cm)。

2.2 羟基红花黄色素 A 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.7% 磷酸溶液(26:2:72, V/V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 403 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

2.2.2 溶液制备

取羟基红花黄色素 A 对照品适量, 精密称定, 加 25% 甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液, 作为对照品溶液。取样品 0.3 g, 精密称定, 精密加入 25% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min(功率为 700 W, 频率为 80 kHz), 放冷, 用 25% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。按处方比例及工艺制备不含红花的阴性样品, 同法制备阴性对照品溶液。

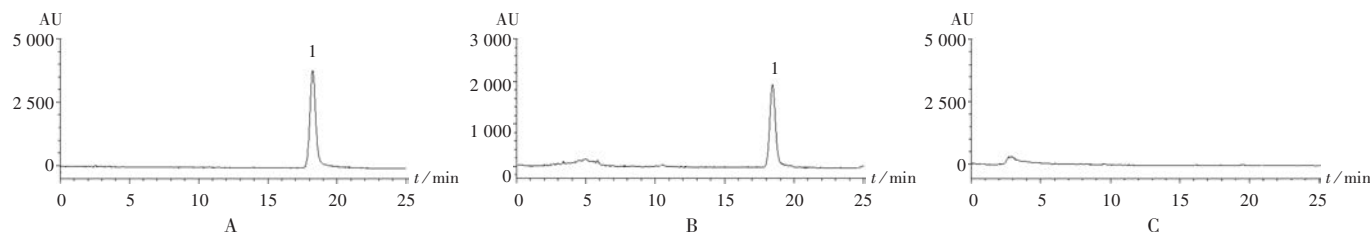
2.2.3 方法学考察

专属性试验: 精密吸取 2.2.2 项下 3 种溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。详见图 2。结果供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相同保留时间处具有相应色谱峰, 且阴性对照品溶液在该保留时间处无色谱峰出现, 表明方法专属性良好。

线性关系考察: 精密吸取对照品溶液(质量浓度为 17.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1, 3, 5, 7, 10, 12 μL , 注入液相色谱仪, 按 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积, 以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 2.1761 \times 10^3 X - 1.5432 \times 10^3$, $r = 0.9992$ ($n = 6$)。结果表明, 羟基红花黄色素 A 进样量在 17.92 ~ 215.04 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取对照品溶液 10 μL , 按 2.2.1 项下色谱条件, 重复进样 6 次, 测定峰面积。结果羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 为 0.88% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 精密吸取供试品溶液 10 μL (批号为 20030302), 按 2.2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 6,



1. 羟基红花黄色素 A

A. 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. hydroxyl safflower yellow pigment A

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

8, 10 h时进样测定峰面积。结果的 RSD 为 0.69% ($n=6$), 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为 20030302)样品,依法制备供试品溶液,共 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样 10 μ L 测定,记录峰面积。结果羟基红花黄色素 A 含量的 RSD 为 0.77% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批(批号为 20030302)样品 6 份,每份 0.15 g,精密称定,分别加入质量浓度为 0.4016 mg/mL 的羟基红花黄色素 A 对照品溶液 2.0 mL,依法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样 10 μ L 测定,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 羟基红花黄色素 A 加样回收试验结果 ($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test of hydroxyl safflower yellow pigment A ($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.150 2	0.693 9	0.803 2	1.509 2	101.51	100.46	0.79
0.151 2	0.698 5	0.803 2	1.498 8	99.64		
0.150 1	0.693 5	0.803 2	1.498 6	100.24		
0.149 8	0.692 1	0.803 2	1.498 1	100.35		
0.150 6	0.695 8	0.803 2	1.496 7	99.71		
0.150 4	0.694 6	0.803 2	1.508 6	101.34		

2.2.4 样品含量测定

取样品 3 批(批号分别为 20030302, 20042602, 20050901),各 2 份,依法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样 10 μ L 测定。结果 3 批样品中羟基红花黄色素 A 的含量分别为 4.62, 4.12, 4.03 mg/g。

3 讨论

3.1 薄层色谱鉴别条件选择

参考文献[3]试验条件,石榴子对照药材溶液薄层色谱斑点分离度不好,且阴性对照有干扰。改展开剂为二氯甲烷-甲醇(6:4, V/V),展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,于 105 $^{\circ}$ C 下烘至斑点显色清晰。结果薄层色谱斑点清晰,阴性对照无干扰。

3.2 HPLC 法含量测定条件选择

指标成分选择:红花具有散瘀止痛、活血通经功效,用于痛经、经闭、癥瘕痞块、恶露不行等证,为妇科要药^[4-8]。羟基红花黄色素 A 为红花中主要指标成分,能有效反映红花的质量,其产地、采摘时间、贮存时间等对质量影响较大。文献[9-11]报道,红花中羟基红花黄色素 A 的含量最低为 1.03%,最高为 4.73%。因此,对制

剂中的红花进行质量控制很有必要。故选择高效液相色谱法测定方中红花指标成

分羟基红花黄色素 A 的含量。

色谱条件选择:目前,关于红花中羟基红花黄色素 A 的检测方法均较成熟^[9-15]。采用 2015 年版《中国药典(一部)》红花中羟基红花黄色素 A 的色谱条件^[15],测定六味大托叶云实散中羟基红花黄色素 A 的含量,阴性对照无干扰,方法重复性好,可操作性强。

提取溶剂选择:羟基红花黄色素 A 为亲水性成分,在水和低浓度醇中的溶解度均较大。本试验中先后采用纯水、25% 甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇作为溶剂进行提取,结果当采用 25% 甲醇超声处理 30 min 时,羟基红花黄色素 A 的溶解度大,且过滤较容易,故选择 25% 甲醇为提取溶剂。

参考文献

- [1] 德格卓玛. 藏药治疗滴虫性阴道炎 28 例疗效观察[J]. 中国民族医药杂志, 2003, 9(2): 6.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药(第一册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 285.
- [3] 冯欣, 鲁晓光, 看召本, 等. 藏药五味金色丸的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(16): 1992-1997.
- [4] 程力, 曾莉, 熊薇, 等. 红花在妇科疾病中的应用体会[J]. 贵阳中医学院学报, 2001, 33(1): 65-66.
- [5] 史向华, 高波, 柴秋彦. 羟基红花黄色素 A 对小鼠离体子宫平滑肌收缩力的影响[J]. 山西中医学院学报, 2011, 12(5): 7-8.
- [6] 聂欣, 成颜芬, 王琳, 等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 226-234.
- [7] 徐如英, 童树洪. 红花的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2010, 19(20): 86-87.
- [8] 张涛, 张斌, 王佩义, 等. 定坤丹组方药物化学成分与药理作用研究进展[J]. 神经药理学报, 2015, 5(6): 40-50.
- [9] 田兰, 吴桂荣, 王岩. 新疆塔城地区额敏县红花的品质研究[J]. 中国药业, 2007, 16(1): 5-7.
- [10] 李彤彤, 韩红园, 张博, 等. 新疆和河南红花中羟基红花黄色素 A 和山柰素含量分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(9): 67-70.
- [11] 徐山. 新疆不同产地红花中羟基红花黄色素 A 的含量测定[J]. 内蒙古中医药, 2019, 38(1): 99-128.
- [12] 朱光怡, 于莲, 田永刚. 高效液相色谱法测定复方红花滴丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(4): 19-20.
- [13] 周维, 胡昌江, 杨丽, 等. 红花配方颗粒质量标准研究[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(2): 38-39.
- [14] 胡小祥, 何艳. 高效液相色谱法同时测定骨折挫伤胶囊中羟基红花黄色素 A 和大黄素含量[J]. 中国药业, 2020, 29(1): 54-56.
- [15] 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: 151.

(收稿日期: 2020-08-23; 修回日期: 2020-10-28)

本栏自由

重庆药友制药有限责任公司

协办