

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2023)24-0109-05

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.24.025



宣肺达郁颗粒质量标准研究*

祁庆瑞¹,翟秉涛¹,田欢²,岳宝森²,赵锋^{2△}

(1. 陕西中医药大学药学院,陕西 西安 712046; 2. 陕西省西安市中医医院,陕西 西安 710021)

摘要:目的 建立宣肺达郁颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中陈皮、白芍、百合、干姜进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定制剂中苦杏仁苷、芍药苷、甘草苷、桂皮醛、橙皮苷的含量,色谱柱为 Agilent 5 TC - C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.2% 乙酸水溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 220 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 15 μL。结果 陈皮、白芍、百合、干姜的 TLC 图斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。苦杏仁苷、芍药苷、甘草苷、桂皮醛、橙皮苷质量浓度分别在 1.064 0~19.152 0 μg/mL、0.820 0~14.760 0 μg/mL、0.138 0~2.484 0 μg/mL、0.000 5~0.009 0 μg/mL、0.432 0~7.776 0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 \geq 0.999 2$);精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%;平均加样回收率分别为 97.26%,102.46%,95.63%,98.61%,97.73%;RSD 分别为 1.69%,3.56%,2.19%,2.64%,0.99%($n=6$)。结论 该研究所建立的标准操作简便,专属性强,结果准确可靠,可用于宣肺达郁颗粒的质量控制。

关键词:宣肺达郁颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;定性鉴别;含量测定;质量标准

Study on Quality Standard of Xuanfei Dayu Granules

QI Qingrui¹,ZHAI Bingtao¹,TIAN Huan²,YUE Baosen²,ZHAO Feng²

(1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 712046; 2. Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710021)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Xuanfei Dayu Granules. **Methods** Citri Reticulatae Pericarpium, Paeoniae Radix Alba, Lillii Bulbus, Zingiberis Rhizoma in the preparation were identified qualitatively by the thin-layer chromatography (TLC) method, the contents of amygdalin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamaldehyde and hesperidin in the preparation were determined simultaneously by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Agilent 5 TC - C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol - 0.2% acetic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 15 μL. **Results** The TLC chromatograms of Citri Reticulatae Pericarpium, Paeoniae Radix Alba, Lillii Bulbus and Zingiberis Rhizoma showed clear spots, good resolution, and there was no interference from the negative reference. The linear ranges of amygdalin, paeoniflorin, liquiritin, cinnamaldehyde and hesperidin were 1.064 0 - 19.152 0 μg/mL, 0.820 0 - 14.760 0 μg/mL, 0.138 0 - 2.484 0 μg/mL, 0.000 5 - 0.009 0 μg/mL, 0.432 0 - 7.776 0 μg/mL ($R^2 \geq 0.999 2$) respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rates of the above five components were 97.26%, 102.46%, 95.63%, 98.61%, 97.73% with RSDs of 1.69%, 3.56%, 2.19%, 2.64%, 0.99% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The established standard is simple, specific, accurate and reliable, which can be used for the quality control of Xuanfei Dayu Granules.

Key words: Xuanfei Dayu Granules; TLC; HPLC; qualitative identification; content determination; quality standard

宣肺达郁方由党参、桂枝、醋鳖甲、茯苓、炙甘草、陈皮、炒苦杏仁等15味药材组方,其由国医大师杨震教授所创,可升肝脾、降肺胃,调节气机郁滞、痰湿阻滞,从而恢复人体正气,达到阴平阳秘,继而加速康复,应用前景较好^[1]。为便于该方的推广使用,将其开发为颗粒剂,前期已完成制备工艺研究。在此,以薄层色谱(TLC)法定性鉴别制剂中的陈皮、白芍、百合、干姜,以高效液相色谱(HPLC)法同时测定制剂中苦杏仁苷、芍

药苷、甘草苷、桂皮醛、橙皮苷的含量,为宣肺达郁颗粒质量标准的建立提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱系统(日本Shimadzu公司);SHZ-D型循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司);CQ-150A-DST型超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);KHW-S-4型电热恒温水浴锅

* 基金项目:陕西省中医药管理局“秦药”开发重点科学研究项目[2021-02-22-010];陕西省中医药管理局委托办事项目[ZYJXG-Y2 3007]。

第一作者:祁庆瑞,女,在读硕士研究生,研究方向为临床中药学及中药制剂新剂型,(电子信箱)1292740715@qq.com。

△通信作者:赵锋,男,硕士,主任中药师,研究方向为临床中药学及中药复方物质基准,(电子信箱)zf6369@126.com。

(上海科恒实业发展有限公司);101型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司);UV-A型手提暗箱式紫外分析仪(上海康禾光电仪器有限公司);ZA305AS型分析天平、JA200R3型电子精密天平(上海赞维衡器有限公司,精度分别为0.1 mg,1 mg)。

1.2 试药

宣肺达郁颗粒(西安市中医医院制剂室,批号分别为20221120,20221130,20221214,记为 S_1, S_2, S_3);橙皮苷对照品(批号为110721-202019,含量95.3%),桂皮醛对照品(批号为110710-202022,含量99.5%),甘草苷对照品(批号为111610-201908,含量95.0%),苦杏仁苷对照品(批号为110820-201808,含量88.2%),芍药苷对照品(批号为110736-201943,含量95.1%),以及百合对照药材(批号为121100-201605)、干姜对照药材(批号为120942-201510),均购于中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司,批号为2021028);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

陈皮:取样品10 g,加甲醇20 mL超声(功率150 W、频率40 kHz,下同)提取20 min,滤过,滤液蒸干,加入甲醇2 mL,作为供试品溶液。按宣肺达郁颗粒处方和工艺制备缺陈皮的阴性样品,同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。另取橙皮苷对照品适量,加甲醇制成对照品溶液。吸取上述溶液,点于同一硅胶G薄层板上(以0.5%氢氧化钠溶液制备),分别以水-甲醇-乙酸乙酯(13:17:100, V/V/V)和水-甲酸-乙酸乙酯-甲苯(1:1:10:20, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝溶液,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显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 A。

白芍:取样品15 g,加甲醇40 mL加热回流60 min,滤过,滤液蒸干,加水20 mL,另取水饱和正丁醇25 mL振摇提取3次,合并正丁醇液,再用正丁醇饱和的水25 mL洗2次,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇1 mL溶解,作为供试品溶液。按宣肺达郁颗粒处方和工艺制备缺白芍的阴性样品,同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。取芍药苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。吸取上述溶液,点于同一硅胶G薄层板上,以甲酸-甲醇-乙酸乙酯-三氯甲烷(0.2:10:5:40, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰,置日光灯下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 B。

百合:取样品10 g,加甲醇30 mL,超声处理20 min,滤过,滤液蒸干,加入1 mL甲醇,作为供试品溶液。按宣肺达郁颗粒处方和工艺制备缺百合的阴性样品,同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。取百合对照药材1 g,加甲醇10 mL,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。吸取上述溶液,点于同一硅胶G薄层板上,以甲酸-乙酸乙酯-石油醚(1:5:15, V/V/V)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%磷钼酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰,置日光灯下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 C。

干姜:取样品10 g,加乙酸乙酯30 mL,超声处理20 min,滤过,滤液浓缩至1 mL,作为供试品溶液。按宣肺达郁颗粒处方和工艺制备缺干姜的阴性样品,同供试品溶

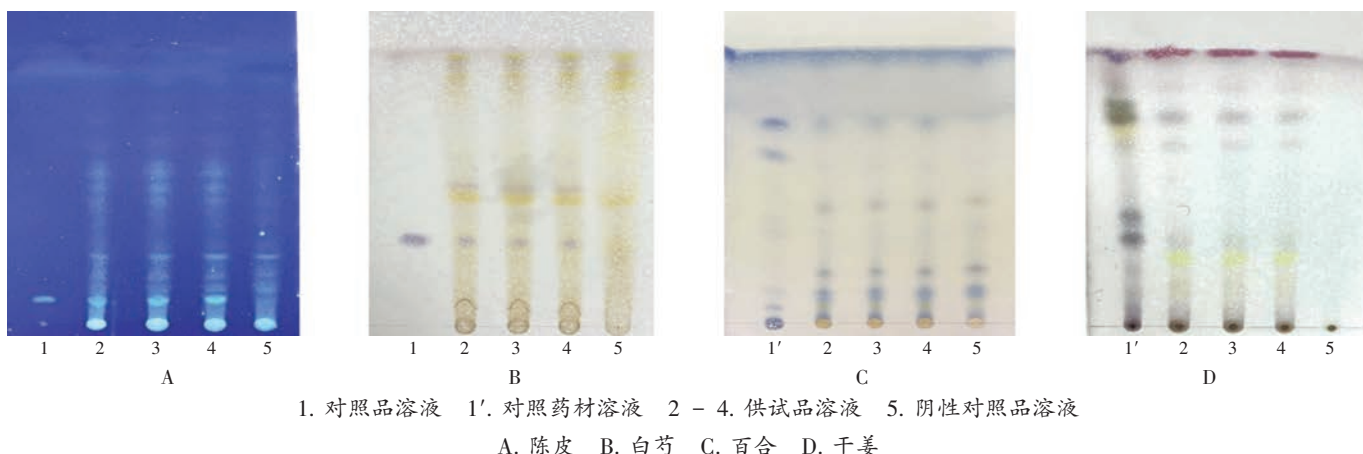


图1 薄层色谱图

1. Reference solution 1'. Reference medicinal solution 2-4. Test solution 5. Negative reference solution
A. Citri Reticulatae Pericarpium B. Paeoniae Radix Alba C. Lili Bulbus D. Zingiberis Rhizoma

Fig. 1 TLC chromatograms

液制备方法制成阴性对照品溶液。另取干姜对照药材 1 g, 加乙酸乙酯 15 mL, 同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。吸取上述溶液, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯 - 三氯甲烷 - 石油醚 (1:1:2, V/V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以香草醛硫酸试液, 105 ℃ 加热至斑点显色清晰, 置日光灯下检视。结果供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 1 D。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent 5 TC - C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 0.2% 乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min 时 10% A, 5 ~ 10 min 时 15% A, 10 ~ 20 min 时 20% A, 20 ~ 35 min 时 25% A, 35 ~ 45 min 时 30% A, 45 ~ 55 min 时 35% A, 55 ~ 65 min 时 36% A, 65 ~ 75 min 时 45% A, 75 ~ 80 min 时 50% A, 80 ~ 85 min 时 10% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 15 μL。

2.2.2 溶液制备

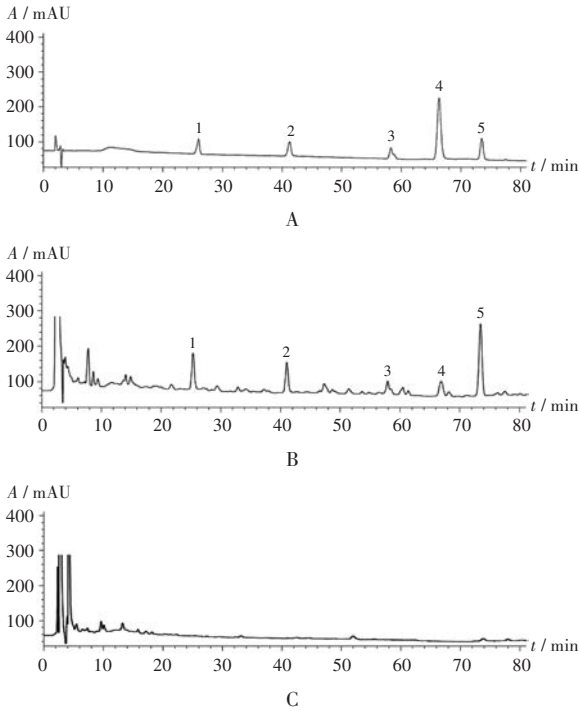
取苦杏仁苷、芍药苷、甘草苷、橙皮苷、桂皮醛对照品各适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 5.60, 4.10, 2.30, 4.80, 0.10 mg/mL 的混合对照品溶液。取样品 1 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 5 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再次称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按宣肺达郁颗粒处方及工艺制备同时缺苦杏仁、桃仁、芍药、甘草、桂枝、陈皮的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验: 分别取 2.2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果各待测成分分离良好, 分离度均大于 1.5, 且阴性对照无干扰。详见图 2。

线性关系考察: 精密量取 2.2.2 项下混合对照品溶液, 稀释, 取 1, 2, 6, 10, 14, 18 μL, 分别按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以各待测成分质量浓度 (X, μg/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

精密度试验: 取 2.2.2 项下供试品溶液适量, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果苦杏仁苷、芍药苷、甘草苷、桂皮醛、橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.78%, 2.04%, 0.94%, 1.55%, 0.12% (n = 6), 表明方法精密度良好。



1. 苦杏仁苷 2. 芍药苷 3. 甘草苷 4. 桂皮醛 5. 橙皮苷
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. Amygdalin 2. Paeoniflorin 3. Liquiritin 4. Cinnamaldehyde 5. Hesperidin
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

表 1 线性关系考察结果

Tab. 1 Results of the linear relation test

待测成分	回归方程	R ²	线性范围 (μg/mL)
苦杏仁苷	$Y_1 = 8\,605.23X_1 + 4\,951.48$	0.999 9	1.064 0 ~ 19.152 0
芍药苷	$Y_2 = 19\,445X_2 + 173\,754$	0.999 2	0.820 0 ~ 14.760 0
甘草苷	$Y_3 = 48\,289X_3 - 175\,567$	0.999 7	0.138 0 ~ 2.484 0
桂皮醛	$Y_4 = 35\,477\,119.61X_4 - 278\,792.22$	0.999 9	0.000 5 ~ 0.009 0
橙皮苷	$Y_5 = 32\,284X_5 - 215\,228$	0.999 3	0.432 0 ~ 7.776 0

稳定性试验: 取供试品 (批号为 20221214) 溶液适量, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果苦杏仁苷、芍药苷、甘草苷、桂皮醛、橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.64%, 2.10%, 1.21%, 1.82%, 0.20% (n = 7), 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 取同一批 (批号为 20221214) 样品 6 份, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果苦杏仁苷、芍药苷、甘草苷、桂皮醛、橙皮苷含量的 RSD 分别为 1.91%, 2.76%, 1.44%, 2.50%, 0.49% (n = 6), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量样品适量, 各 6 份, 分别加入与各成分含量相近的对照品溶液适量 (含苦杏仁

表 2 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 6$)						
待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
苦杏仁苷	1.921 0	1.920 0	3.808 7	98.32	97.26	1.69
	1.900 0	1.920 0	3.791 5	98.52		
	1.910 0	1.920 0	3.799 2	98.40		
	1.920 5	1.920 0	3.784 0	97.06		
	1.921 0	1.920 0	3.785 2	97.09		
	1.901 2	1.920 0	3.709 9	94.20		
芍药苷	0.770 5	0.738 0	1.510 6	100.28	102.46	3.56
	0.729 2	0.738 0	1.528 0	108.24		
	0.762 1	0.738 0	1.512 0	101.61		
	0.754	0.738 0	1.490 3	99.77		
	0.731 5	0.738 0	1.511 0	105.62		
	0.749 1	0.738 0	1.481 5	99.24		
甘草苷	0.149 6	0.149 5	0.290 3	94.11	95.63	2.19
	0.150 2	0.149 5	0.295 5	97.19		
	0.149 7	0.149 5	0.297 7	99.00		
	0.150 0	0.149 5	0.291 0	94.31		
	0.149 0	0.149 5	0.291 8	95.52		
	0.148 5	0.149 5	0.288 5	93.65		
桂皮醛	0.000 299 8	0.000 300 0	0.000 595 4	98.53	98.61	2.64
	0.000 301 2	0.000 300 0	0.000 583 6	94.13		
	0.000 302 0	0.000 300 0	0.000 596 7	98.23		
	0.000 300 5	0.000 300 0	0.000 600 4	99.97		
	0.000 298 9	0.000 300 0	0.000 605 1	102.07		
	0.000 301 1	0.000 300 0	0.000 597 3	98.73		
橙皮苷	1.211 8	1.200 0	2.405 3	99.46	97.73	0.99
	1.243 1	1.200 0	2.417 9	97.90		
	1.238 2	1.200 0	2.397 4	96.60		
	1.244 4	1.200 0	2.412 2	97.32		
	1.232 1	1.200 0	2.398 9	97.23		
	1.216	1.200 0	2.390 7	97.89		

苷 1.920 0 mg、芍药苷 0.738 0 mg、甘草苷 0.149 5 mg、桂皮醛 0.000 3 mg、橙皮苷 1.200 mg),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,并计算加样回收率。结果见表 2。

2.2.4 多指标成分含量测定

取 3 批样品各适量,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,记录峰面积并计算各成分含量。结果见表 3。

3 讨论

本研究中参考 2020 年版《中国药典(一部)》,对宣肺达郁颗粒中的主要药味进行了 TLC 定性鉴别,其中陈皮、白芍、百合、干姜的色谱斑点清晰、分离度好且阴性对照无干扰,故均可列入质量标准;而前期研究中发现方中党参等其他药材 TLC 图效果欠佳,炙甘草和法半夏中均含

表 3 样品含量测定结果(mg / g, $n = 3$)

Tab. 3 Results of the content determination of five components in samples (mg / g, $n = 3$)					
批次	苦杏仁苷	芍药苷	甘草苷	桂皮醛	橙皮苷
S ₁ -1	1.72	0.92	0.17	0.000 4	1.43
S ₁ -2	1.74	0.89	0.17	0.000 4	1.43
S ₁ -3	1.73	0.92	0.17	0.000 4	1.43
S ₂ -1	1.78	0.65	0.18	0.000 3	1.01
S ₂ -2	1.80	0.68	0.18	0.000 3	1.11
S ₂ -3	1.83	0.68	0.18	0.000 3	1.28
S ₃ -1	1.89	0.73	0.15	0.000 3	1.26
S ₃ -2	1.92	0.77	0.15	0.000 3	1.22
S ₃ -3	1.90	0.77	0.15	0.000 3	1.21
$\bar{X}$	1.81	0.78	0.17	0.000 3	1.26

有甘草、苦杏仁和桃仁中均含有苦杏仁苷,阴性对照色谱会产生干扰,故均不作为质量标准定性考察项。

预试验中建立测定制剂有效成分含量的 HPLC 法时,分别考察了不同体积分数的提取溶剂、检测波长和流动相对提取率和色谱图的影响。分别以 50%,60%,70%,80%,90%,100% 的甲醇溶液作提取溶剂^[2],结果以 50% 甲醇的提取率较高,色谱图杂峰较少。全波段扫描结果显示,在 210~260 nm 波长范围内吸收峰最多且受末端吸收影响较小,基线平稳;进一步比较了 210,220,225,230,240,250,260 nm 波长处的色谱峰,其中 220 nm 波长处各色谱峰的峰面积较大,分离度较好。同时考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、甲醇-0.1% 乙酸水溶液作为流动相系统时的图谱效果^[3],其中以甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相时,色谱图分离度和峰形均较好且基线平稳。

宣肺达郁颗粒中药味较多,在建立含量测定方法过程中,以 2020 年版《中国药典(一部)》为依据,结合药味特点和组方选择指标成分。方中苦杏仁和党参共为君药,以调节气机;桂枝、茯苓、半夏三药共为臣药,以助阳健脾祛湿;炙甘草、干姜、陈皮、白芍、醋鳖甲为佐药,辅助君臣药发挥作用;百合为使药,可养阴润燥、解郁安神^[4]。研究表明,温度在 60℃ 以上时,党参中的基础物质党参炔苷^[5]随温度的升高及受热时间的延长含量显著降低^[6],因此,君药中选择苦杏仁中的苦杏仁苷作为指标成分。茯苓的主要活性成分为多糖和三萜类^[7-8],半夏的主要活性成分为生物碱、有机酸类化合物^[9-10],均不适宜进行含量测定,因此在臣药中选择了桂皮中的桂皮醛为指标成分。佐药中以陈皮中的橙皮苷和白芍中的芍药苷作为指标成分,而干姜中的活性物质 6-姜辣素^[11-12]由于其脂溶性较大,提取率受限,且其在贮存过程中易发生热解、水解及氧化反应,稳定性较差^[13];炙甘草中的甘草苷峰形欠佳,未能与其他杂