

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)09-0106-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.09.022



芪龙活络颗粒质量标准研究*

魏玲¹, 丁小凡¹, 张贺廷¹, 陈浩^{2△}, 刘畅¹, 席永宽¹

(1. 安徽省阜阳市中医医院, 安徽 阜阳 236025; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031)

摘要:目的 建立芪龙活络颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中黄芪、川牛膝、鸡血藤药材进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定丹酚酸 B 的含量, 色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(23:77, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 286 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 薄层色谱斑点清晰, 且阴性对照无干扰。丹酚酸 B 的进样量在 0.062 4~1.248 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=1.000, n=5$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.00% ($n=6$); 平均回收率为 107.61%, RSD 为 4.28% ($n=6$)。5 批样品中丹酚酸 B 的含量为 1.09~1.32 mg/g。结论 该方法专属性好, 结果准确, 可用于芪龙活络颗粒的质量控制。暂订芪龙活络颗粒中丹酚酸 B 的含量应不低于 1.0 mg/g。

关键词: 芪龙活络颗粒; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 黄芪; 川牛膝; 鸡血藤; 丹酚酸 B

Quality Standard of Qilong Huoluo Granules

WEI Ling¹, DING Xiaofan¹, ZHANG Heting¹, CHEN Hao², LIU Chang¹, XI Yongkuan¹

(1. Fuyang Hospital of TCM, Fuyang, Anhui, China 236025; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230031)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Qilong Huoluo Granules. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used to qualitatively identify Cyathulae Radix, Astragali Radix, and Spatholobi Caulis in the preparation. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of salvianolic acid B in the preparation, the chromatographic column was Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (23:77, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 286 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots were clear, and the negative control had no interference. The linear range of salvianolic acid B was 0.062 4-1.248 μg ($r=1.000, n=6$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.00% ($n=6$). The average recovery of salvianolic acid B was 107.61% with an RSD of 4.28% ($n=6$). The content of salvianolic acid B in five batches of samples was in the range of 1.09-1.32 mg/g. **Conclusion** This method is specific and accurate, which can be used for the quality control of Qilong Huoluo Granules. The content of salvianolic acid B in Qilong Huoluo Granules is temporarily set at no lower than 1.0 mg/g.

Key words: Qilong Huoluo Granules; TLC; HPLC; Cyathulae Radix; Astragali Radix; Spatholobi Caulis; salvianolic acid B

芪龙活络颗粒(注册批号 Z20210053000)为安徽省阜阳市中医医院开发的院内制剂,由丹参、红花、黄芪、胆南星、川牛膝、鸡血藤、石菖蒲、地龙组方,具有益气、活血、通络功效。临床用于治疗中风病、眩晕等气虚血

瘀证。方中,黄芪、丹参为君药,具有补气固表、利尿脱毒等功效^[1];丹参活血祛瘀,红花活血通经,共为臣药;川牛膝逐瘀通经、引药下行,鸡血藤活血补血,胆南星息风定惊,共为佐使药^[2-3]。诸药合用,共奏补气、活血、

*基金项目:安徽省阜阳市卫生健康委员会科研课题[FY2021-032]。

第一作者:魏玲,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为中药制剂与质量评价,(电子信箱)13965576856@163.com。

△通信作者:陈浩,男,硕士研究生,主任中药师,研究方向为中药制剂与质量评价,(电子信箱)chenhao071522@163.com。

时珍国医国药,2008,19(8):1876-1877.

中国医药科技出版社,2020:59-60.

[18] 康帅,江玲玲,罗婧,等. 决明子及其易混淆品望江南的性状和显微鉴定与数字化研究[J]. 药物分析杂志, 2021,41(8):1352-1359.

[22] 卜妍红,陆婷,吴虹,等. 栀子化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽中医药大学学报,2020,39(6):89-93.

[19] 罗晓霞. 草果与拟草果的性状与显微鉴别[J]. 中药材, 2014,37(2):227-229.

[23] 史永平,孔浩天,李昊楠,等. 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药,2019,50(2): 281-289.

[20] 李付惠,李琴,张娇. 草果的生药学鉴定[J]. 文山学院学报,2012,25(3):16-18.

[24] 邹毅,周敏. 栀子化学成分及药理作用的研究进展[J]. 江西化工,2019(5):47-48.

[21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:

(收稿日期:2023-06-01;修回日期:2023-11-06)

通络之效。临床研究发现,黄芪治疗脑卒中的疗效较好^[1]。药理学研究发现,丹参有保护心血管、降血压的作用,红花中的羟基红花素A被广泛用于治疗脑血管疾病^[4],黄芪-丹参是中药治疗缺血性脑卒中的主要药对,临床疗效较好^[5]。为更好地控制制剂质量,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对黄芪、川牛膝、鸡血藤进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定丹参中丹酚酸B的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1260 II型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),配有二极管阵列检测器(DAD);梅特勒ME55型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);JK-DY300型超声波清洗器(合肥金克尼机械制造有限公司,功率为300 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

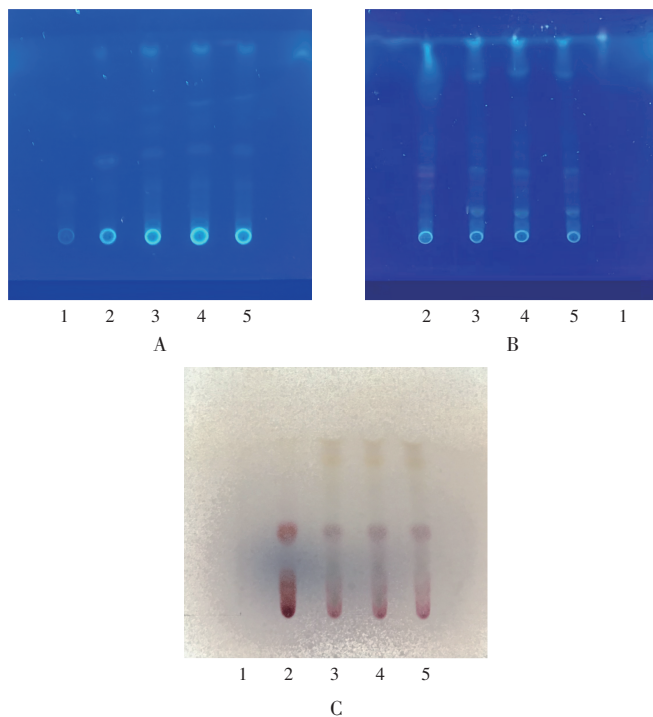
丹酚酸B对照品(批号为111562-201916,纯度为96.6%),鸡血藤对照药材(批号为121173-201805),川牛膝对照药材(批号为121065-201707),黄芪对照药材(批号为21462-201705),均购于中国食品药品检定研究院;芪龙活络颗粒(医院制剂,批号分别为220501,220502,220701,220702,220801);硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司,批号为20220406);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

川牛膝^[6-7]:取样品3 g,研细,加甲醇30 mL,超声处理(功率为300 W,频率为40 kHz)20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水10 mL使溶解,用乙酸乙酯振荡提取2次,每次10 mL,合并乙酸乙酯液,回收溶剂至干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取川牛膝对照药材1 g,加甲醇15 mL,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按处方工艺取不含川牛膝的处方药材,制备阴性对照药材,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述3种溶液各4 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-二氯甲烷-丙酮-甲酸(8:4:1:0.1, V/V/V/V)为展开剂,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,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 A。

黄芪^[8-10]:取样品10 g,研细,加甲醇50 mL,超声处理(功率为300 W,频率为40 kHz)20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水10 mL使溶解,用水饱和的正丁醇振荡



1. 阴性对照品溶液 2. 对照药材溶液 3-5. 供试品溶液
A. 川牛膝 B. 黄芪 C. 鸡血藤

图1 薄层色谱图

1. Negative reference solution 2. Reference medicinal materials
3-5. Test solution
A. Cyathulae Radix B. Astragali Radix C. Spatholobi Caulis

Fig.1 TLC chromatograms

提取2次,每次10 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤3次,每次20 mL,弃去氨液,用正丁醇液回收溶剂至干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取黄芪对照药材1 g,加甲醇15 mL,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按处方工艺取不含黄芪的处方药材,制备阴性对照药材,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述3种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(10:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置氨蒸气中熏蒸后置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 B。

鸡血藤^[11-12]:取样品5 g,研细,加水30 mL,超声处理(功率为300 W,频率为40 kHz)30 min,离心(转速为4 000 r/min)5 min,取上清液,用乙酸乙酯振荡提取2次,每次30 mL,合并乙酸乙酯液,用乙酸乙酯液回收溶剂至干,残渣加乙酸乙酯1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取鸡血藤对照药材0.5 g,加水30 mL,煎煮30 min,滤过,滤液用乙酸乙酯振荡提取2次,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按处方工艺取不含鸡血藤

的处方药材,制备阴性对照药材,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述3种溶液各2 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-甲酸乙酯-冰醋酸-甲酸-异丙醇(5:5:0.5:0.5:1, V/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。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 C。

2.2 HPLC法测定丹酚酸B含量

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Eclipse XDB - C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(23:77, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:286 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。理论板数按丹酚酸B峰计不低于4 000^[13-14]。

2.2.2 溶液制备

取丹酚酸B对照品12.92 mg,精密称定,置200 mL容量瓶中,加75%甲醇定容,制成质量浓度为62.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。取样品(批号为220801)2 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇50 mL,密塞,称定质量,加热回流30 min,放冷,再称定质量,用75%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。按处方工艺取不含丹参的处方药材,制备不含丹参的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

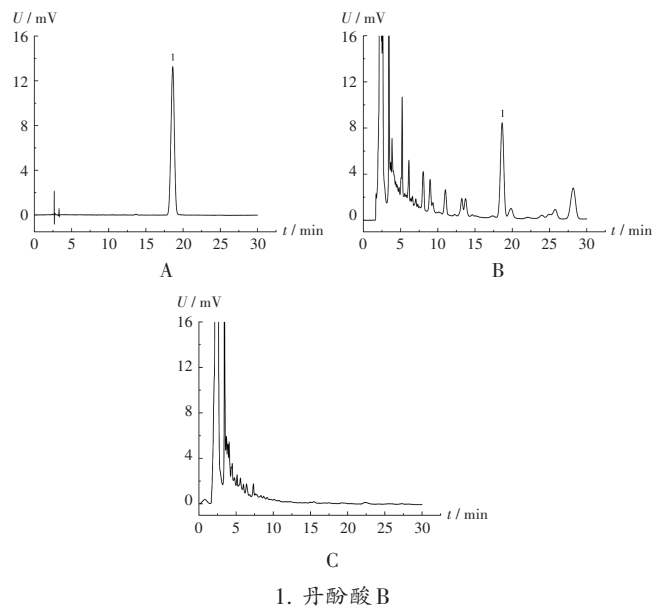
2.2.3 方法学考察

专属性试验^[15]:分别吸取2.2.2项下对照品溶液、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。结果供试品溶液色谱中,在丹酚酸B对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图2。

线性关系考察:设置自动进样程序,分别吸取2.2.2项下丹酚酸B对照品溶液(质量浓度为62.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1, 2, 5, 10, 20 μL ,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以进样量(X , μg)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 815.52X + 0.27$ ($r = 1.000, n = 5$)。结果表明,丹酚酸B进样量在0.062 4 ~ 1.248 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD为0.36%($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为220801)样品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.85%($n = 6$),表明供试品溶液在24 h



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. Salviolic acid B

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

Fig. 2 HPLC chromatograms

内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为220801)样品适量,精密称定,平行6份,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。结果丹酚酸B的平均含量为1.26 mg/g, RSD为1.92%($n = 6$),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220801)2.0 g,精密称定,平行6份,加丹酚酸B对照品溶液(质量浓度为62.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)25 mL,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,并计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
2.529 0	1.56	4.172 4	105.35		
2.529 0	1.56	4.206 2	107.51		
2.529 0	1.56	4.082 9	99.61	107.61	4.28
2.529 0	1.56	4.252 1	110.46		
2.529 0	1.56	4.272 8	111.97		
2.529 0	1.56	4.257 0	110.77		

2.2.4 样品含量测定

取5批(批号分别为220501, 220502, 220701, 220702, 220801)样品各适量,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。结果样品中丹酚酸B的含量分别为1.09, 1.24, 1.27, 1.19, 1.32 mg/g。综合考虑,拟订芪

芩活络颗粒中丹酚酸B的含量应不低于1.0 mg/g。

3 讨论

3.1 TLC 鉴别

考察药材选择:在前期小试试验中均能鉴别出红花、石菖蒲药材,且阴性对照无干扰,但中试试验后的检验中均未检出。查阅文献发现,红花中主要活性物质羟基红花黄色素A为水溶性物质^[16],长时间在高温环境中会随时间的延长而有所降解^[17-18]。石菖蒲主要活性物质有苯丙素类、酚类及挥发油类^[19]。我院制剂室的提取设备相对陈旧,导致提取时间变长,提取温度过高,无法进行TLC鉴别。胆南星进行TLC鉴别时阴性对照干扰较大。故红花、石菖蒲、胆南星均暂不列入本质量标准。

TLC鉴别条件选择:前期研究中,对芩活络颗粒中川牛膝、黄芪、丹参、红花、胆南星、地龙、胆南星、石菖蒲进行TLC鉴别,发现川牛膝、黄芪、鸡血藤TLC斑点显色清晰,且阴性对照无干扰,能较好地鉴别制剂中的川牛膝、黄芪、鸡血藤药材。《中国药典》中的TLC鉴别方法能较好地鉴别川牛膝和黄芪,但需要过柱^[20],方法烦琐,故选择本研究中2.1项下方法进行鉴别。通过考察不同类型的硅胶板发现,高效硅胶G板与普通硅胶G板均能较好分离川牛膝、黄芪、鸡血藤,且阴性对照无干扰。2020年版《中国药典(一部)》中川牛膝、黄芪、鸡血藤点样量分别为5 μL、5~10 μL、5~10 μL^[20]。通过考察点样量发现,芩活络颗粒中川牛膝、鸡血藤点样量在3~4 μL时具有较好的斑点,超过5 μL后原点处易出现溶剂扩散现象。故点样量选择2~5 μL。

3.2 色谱条件考察

前期研究中,通过对比2020年版《中国药典(一部)》中丹参的色谱条件,并参考文献^[12-13],最终选择2020年版《中国药典(一部)》中丹参的色谱条件,并调整流动相比,最终确定2.2.1项下色谱条件。

3.3 含量测定结果分析

芩活络颗粒由8味中药材组方,药味中所含活性物质较多。中药复方煎煮后往往发生较多的化学反应与生物活性转化,故仅测定单一物质成分含量无法全面评价药品的质量。为更好地控制产品质量,制备过程中对颗粒的烘干温度、时间、辅料加入量进行考察,优化了提取工艺与颗粒剂制备工艺。由5批样品含量测定结果可知,样品中丹酚酸B含量为1.09~1.32 mg/g,两者相差0.23 mg/g,通过查看批生产记录,发现样品出膏率也存在一定差异,其含量差异变化有待进一步验证。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法专属性好、结果准确,可用于芩活络颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 徐 铭,吴晓俊. 黄芪皂苷对神经系统疾病的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2021,46(18):4674-4682.
- [2] 官 杰,冯兴中,刘剑刚. 鸡血藤防治动脉硬化相关药理作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2019,30(3):385-389.
- [3] 唐照琦,李 彪,王秋红,等. 胆南星的化学成分、药理作用及相关复方临床应用的研究进展[J]. 中国药房,2020,31(12):1523-1527.
- [4] 唐秀松,陈 静,张青槐,等. 基于网络药理学探讨黄芪治疗缺血性中风的作用机制[J]. 世界中医药,2022,17(16):2245-2250.
- [5] 陈雨菡,马善波,杨 倩,等. 黄芪-丹参药对治疗缺血性脑卒中研究进展[J]. 陕西中医,2021,42(8):1142-1146.
- [6] 宋国红,李 卿. 川牛膝药材及其成方制剂薄层鉴别方法研究[J]. 中国药业,2018,27(11):25-26.
- [7] 罗 群,杨忠明,唐定洪,等. 消麻散质量标准研究[J]. 中国药业,2022,31(24):58-62.
- [8] 陆雪丽,潘晓鹃,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.
- [9] 许广华,王 虎,李小伟,等. 芪精愈消胶囊薄层鉴别及含量测定研究[J]. 安徽医药,2016,20(4):660-663.
- [10] 胡 翔. 参芪首乌颗粒质量标准研究[J]. 安徽医药,2018,22(5):819-821.
- [11] 王 玲,张筱杉,张长林. 丹栀颗粒的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学,2021,38(22):2836-2840.
- [12] 赵新杰,孙 实,李小倩,等. 筋骨痛消丸质量标准的提高[J]. 中国药师,2022,25(12):2246-2250.
- [13] 周文艳,王宇明,黄 雁,等. 高效液相色谱法测定复方黄黛片中丹酚酸B的含量[J]. 安徽医药,2022,26(3):463-465.
- [14] 姜军华,许 妍,罗跃华,等. 脉络宁颗粒的质量标准提升研究[J]. 中国现代应用药学,2021,38(20):2537-2541.
- [15] 唐斌斌,杜书君,韩子军,等. 丹芪祛风散质量标准研究[J]. 中国药业,2018,27(7):18-20.
- [16] 冯丹萍,段宝忠,夏从龙,等. 红花化学成分的研究[J]. 中成药,2021,43(8):2253-2255.
- [17] 虞 立,万海同,何 昱,等. 基于两种分析方法优化红花中羟基红花黄色素A提取工艺[J]. 中药材,2018,41(11):2627-2631.
- [18] 肖艳华,李艳艳,崔 猛,等. 红花中羟基红花黄色素A的提取工艺[J]. 武汉工程大学学报,2015,37(3):15-19.
- [19] 高瑞希,陈 凤,张天培,等. 石菖蒲根茎的化学成分研究[J]. 中药材,2021,44(5):1115-1118.
- [20] 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,2020:39-315.

(收稿日期:2023-06-01;修回日期:2023-11-23)