

棍其勒-13味丸质量标准的建立

王秋桐¹, 崔圆圆², 王玉华²

(1. 内蒙古医科大学附属第一医院 药物临床试验机构, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学 药学院)

摘要: **目的:** 建立棍其勒-13味丸的质量标准。 **方法:** 采用显微鉴别法定性鉴别处方中的诃子、大枣、红花、石膏、石榴、木香、肉豆蔻和沉香; 采用薄层色谱鉴别法定性鉴别处方中的枫香脂和木香。采用HPLC法对处方中的羟基红花黄色素A进行含量测定, 色谱柱为Agela Venusil XBP C18(250 mm×4.6 mm, 5μm), 流动相为乙腈-甲醇-0.7%磷酸溶液(用三乙胺调pH到6.04)(2:28:70), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 403 nm, 进样量 10μL。 **结果:** 结果通过显微鉴别观察到的药材结构清晰, 薄层色谱鉴别供试品色谱斑点清晰, 专属性强; 羟基红花黄色素A的线性关系好, 回归方程为 $y=3228006.9390x-116997.8884$, $r=1.0000$ 。平均回收率为 101.1% (RSD = 1.9%)。 **结论:** 本文所建立的质量标准方法可行性强, 专属性好, 灵敏度高, 可用于棍其勒-13味丸的质量控制。

关键词: 棍其勒-13味丸; 显微鉴别; 羟基红花黄色素A; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2021)05-0466-05

ESTABLISHMENT OF THE QUALITY STANDARD FOR GUNQILE-13 WEI WAN

WANG Qiu-tong, CUI Yuan-yuan, WANG Yu-hua

(Institute of Drug Clinical Trials, affiliated hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050 China)

Abstract: Objective: To establish the quality standard of Gunqile-13 Wei Wan. **Methods:** Using microscopic identification to statutorily identify Terminalia chebula, Choerospondiatis axllaris (Roxb.) Burr et Hili, Carthamus tinctorius, CaSO₄·2H₂O, Punica granatum, Aucklandia lappa Decne, Myristica fragrans Hoult., Aquilaria sinensis of the prescription. Using thin layer chromatography to identify Liquidambar Formosana Hance and Aucklandia lappa Decne. Using HPLC to determinate the content of hydroxysafflor yellow A in Gunqile-13 Wei Wan. The chromatographic column was Agela Venusil XBP C18 (250 mm × 4.6 mm, 5μm), the mobile phase was acetonitrile-methanol-0.7% phosphoric acid solution (adjusted the pH to 6.04 with triethylamine) (2:28:70), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30° C, the detection wavelength was 403nm, and the injection volume was 10 μL. **Results:** Microscopic identification has achieved ideal identification results. The TLC spots was fairly clear, and the Negative control has no interference. Hydroxysafflor yellow A had a good linear relationship. The regression equation was $y=3228006.9390x-116997.8884$, $r=1.0000$. The average recovery rate was 101.1% (RSD = 1.9%). **Conclusion:** The qualitative and quantitative analysis methods established were simple, accurate and sensitive, and can be used for the quality control of Gunqile-13 Wei Wan.

Key words: Gunqile-13 Wei Wan; Microscopic identification; Hydroxysafflor yellow A; TLC; HPLC

收稿日期: 2021-07-30; 修回日期: 2021-08-29

基金项目: 内蒙古蒙中药标准建设项目(JYCZ18-027-3)

作者简介: 王秋桐(1985-), 男, 内蒙古医科大学附属第一医院药物临床试验机构主管药师。

通讯作者: 王玉华, 博士, 教授, E-mai: yuhuwang59@163.com 内蒙古医科大学药学院, 010050

棍其勒-13味丸由诃子、广枣、红花、石膏、石榴、木香、枫香脂、胡黄连、丁香、豆蔻、肉豆蔻、炒马钱子、沉香十三味药组成的复方制剂。临床功效为镇赫依,清血热;用于胸部赫依、血相搏,“赫依”性心肺刺痛,胸闷、气短等症。棍其勒-13丸作为蒙医医院常用的蒙医经验方,目前没有相应的质量标准对其进行质量控制。为了更好的控制该制剂的质量,本实验对棍其勒-13味丸进行了定性鉴别和定量测定研究。

红花具有活血通经,散瘀止痛的功效^[1]。参阅近几年中药红花的研究文献,其主要的化学成分是黄酮类、甾体、酚酸类、双醇、木脂素、查尔酮、炔类以及挥发油等^[2,3]。查尔酮类成分红花黄色素是红花现在已知得主要活性成分,根据官能团的不同,化学结构的分为红花黄色素A和红花黄色素B两种成分^[2],羟基红花黄色素A(hydroxysafflor yellow A, HSYA)是红花中最具药理活性的水溶性成分,多年来一直是科研的热点,临床研究表明,其具有抗凝血、抗氧化、预防脑缺血、保护血管内皮细胞和神经等作用,是2015版中国药典收录红花药材的质量控制指标成分之一^[4,5]。故选择HSYA作为指标成分,采用HPLC法对方中红花的指标性成分HSYA进行含量测定。

1 仪器与试药

1.1 仪器

仪器	型号	厂家
高效液相色谱仪	Waters e2695	沃特世科技有限公司
电子天平	Mettler-Toledo MS105DU	梅特勒-托利多仪器有限公司
电子天平	Mettler-Toledo XPR10	梅特勒-托利多仪器有限公司
超声波清洗器	SBL-22DT	宁波新芝生物科技股份有限公司
超纯水系统	Heal Force NW15UV	河南省予华仪器有限公司
多功能粉碎机	FW400A	北京材茂科技有限公司
薄层色谱成像仪	GoodSee-10	上海科哲生化科技有限公司
XSP-BM-30AD	电脑UIS生物显微镜	上海彼爱姆光学仪器制造有限公司

1.2 试剂与试药

对照品:HSYA(111838-201403),去氢木香内酯(111525-201912)。

对照药材:枫香脂(121637-201201),均购于中

检院。

供试品:棍其勒-13丸(201908001、201908002、201908003),由呼伦贝尔市蒙医医院生产;自制样品(201908010)。

试剂:甲醇、乙腈、三乙胺为色谱纯,其他为分析纯。

2 方法与结果

2.1 显微鉴别

取本品,置显微镜下观察:石细胞无色,椭圆形,壁厚,孔沟细密(石榴)。脂肪油滴众多,加水合氯醛试液加热后渐形成针簇状结晶(肉豆蔻)。菊糖团块形状不规则,有时可见微细放射状纹理(木香)。橄榄形、椭圆形或类圆形的花粉粒,具3个萌发孔,直径约至60 μ m,外壁有齿状突起(红花)。石细胞成群,呈长卵形、类圆形、长条形或长方形,孔沟细密而明显(诃子)。果皮表皮细胞成片,表面观类多角形或类圆形,胞腔内含颗粒状物(广枣)。不规则片状结晶,无色,有平直纹理(石膏)。具缘纹孔导管,纹孔密,内含淡黄色或黄棕色树脂状物(沉香)。显微特征照片见图1。



图1 显微特征照片

Tab.1 Microscopic feature photos

A. 石榴石细胞 B. 肉豆蔻针簇状结晶 C. 木香菊糖
D. 红花花粉粒 E. 诃子石细胞 F. 广枣果皮表皮细胞
G. 石膏不规则片状结晶 H. 沉香具缘纹孔导管

2.2 薄层色谱鉴别

2.2.1 枫香脂薄层色谱鉴别

取本品 2.0g, 粉碎, 加 10mL 甲醇, 用超声处理 20 分钟, 取上清液作为供试品溶液。另取枫香脂对照药材 0.2g 和阴性供试品 2.0g, 同法分别制成对照药材溶液和阴性对照溶液。点样量各 5 μ L, 薄层板为硅胶 GF254 薄层板, 展开剂为正己烷-乙酸乙酯-石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C)-冰醋酸 (6:3:2:0.2), 检视方式为在紫外灯 (254nm) 下检视。薄层色谱图见图 2。

图 2 的结果显示, 枫香脂对照药材溶液显示 1 个主斑点, 供试品溶液在与其对应位

置处显相同颜色的斑点; 阴性对照对测定没有干扰。

2.2.2 木香薄层色谱鉴别

取本品 2.5g, 粉碎, 加 10mL 甲醇, 用超声处理 0.5 小时, 过滤, 作为供试品溶液。另取去氢木香内酯对照品, 加甲醇制成 0.5mg/mL 的对照品溶液。取阴性供试品 2.5g, 同法制成阴性对照溶液。点样量各 5 μ L, 薄层板为硅胶 G 薄层板, 展开剂为环己烷-甲酸乙酯-甲酸 (15:5:1), 检视方式为喷 1% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰。薄层色谱图见图 3。

图 3 的结果显示, 去氢木香内酯对照品溶液显示 1 个斑点, 供试品溶液在与其对照品溶液 Rf 值相同的位置上显相同颜色的斑点; 阴性对照对测定没有干扰。

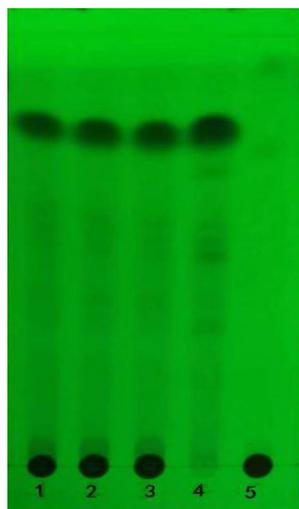


图 2 枫香脂 TLC 鉴别图

Tab.2 Liquidambar Formosana Hance TLC Identification Chart

1-3. 供试品 4. 枫香脂对照药材 5. 阴性对照



图 3 木香 TLC 鉴别图

Tab.3 Aucklandia lappaceae Decne TLC Identification Chart

1-3. 供试品 4. 去氢木香内酯对照品 5. 阴性对照

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱条件	参数
色谱柱	Agela Venusil XBP C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)
流动相	甲醇-乙腈-0.7%磷酸(用三乙胺调 pH 为 6.04) (28:2:70)
检测波长	403 nm
柱温	30 $^{\circ}$ C
流速	1.0 mL \cdot min $^{-1}$
进样体积	10 μ L

2.3.2 溶液的制备

将本品粉碎, 精密称取 1.7g, 精密加 25% 甲醇 25ml, 称重, 超声 40 分钟, 放冷, 再称重, 用 25% 甲醇补, 离心 5 分钟 (转速 7000r/min), 取上清液作为供试品溶液。再取 HSYA 对照品, 加 25% 甲醇制成 56.79 μ g/mL 的对照品溶液。取阴性供试品 1.7g, 同法制成阴性对照溶液。

2.3.3 方法学考察

2.3.3.1 专属性实验

在“2.3.1”项色谱条件下将上述制备的三种溶液进液相测定, 记录色谱图。色谱图见图 4。

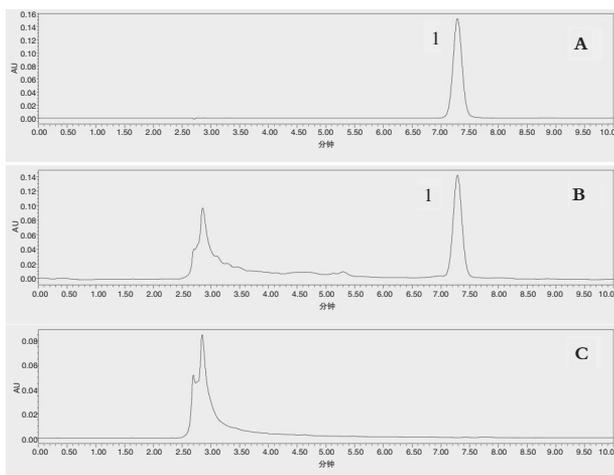


图 4 专属性试验色谱图

Tab.4 Exclusive experiment chromatogram
1. 羟基红花黄色素 A. 对照品 B. 供试品 C. 缺红花阴性供试品

图 4 结果显示, 在相同的保留时间处, 供试品和对照品色谱图中均有色谱峰出现; 阴性对照色谱图无色谱峰出现, 专属性强。

2.3.3.2 线性关系考察

取上述制备的对照品溶液, 分别精密吸取 2 μ L、5 μ L、10 μ L、15 μ L、20 μ L 和 25 μ L 进液相测定, 以峰面积对进样量进行分析, 结果见表 1 和图 5。

表1 标准曲线数值表
Fig.1 Standard curve value table

进样量(μg)	0.1136	0.2820	0.5679	0.8519	1.1358	1.4198
峰面积值	256392	796789	1704649	2626628	3551868	4471305

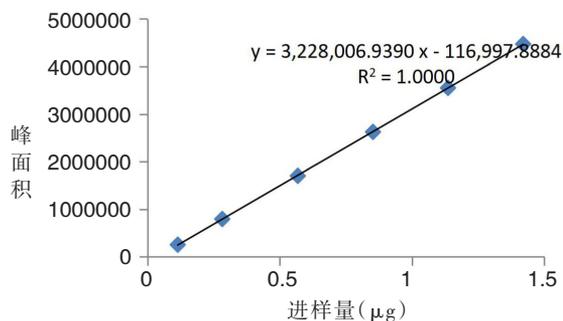


图5 标准曲线图

Tab.5 Standard curve chart

结果线性关系较好,回归方程 $y=3228006.9390x-116997.8884(r=1.0000)$ 。

2.3.3.3 精密度试验

取一份供试品溶液连续进样6针进行测定,结果HSYA峰面积值的RSD为0.63%。仪器精密度好。

2.3.3.4 稳定性试验

取一份供试品溶液,分别在溶液制备后的0、2、4、8、10和12小时进样测定,结果HSYA峰面积值RSD为1.27%。表明12小时内供试品溶液稳定。

2.3.3.5 重复性试验

取同一批号(批号201908001)供试品6份,制成供试品溶液后进样分析,计算含量。结果HSYA的平均含量为 $0.87\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,含量RSD值为0.29%。该方法的重复性好。

2.5.6 加样回收试验

取供试品(批号201908001,含量为 $0.87\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)9份,精密称取0.85g,分成三组,每组三份,每组分别精密加入约相当于供试品含有量的50%、100%、150%的HSYA对照品及25%甲醇25mL,再按上述方法制备供试品溶液,进样分析,计算含量并计算回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果表
Fig.2 Test results of Sample recovery test

序号	样品量(g)	供试品含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.8572	0.7458	0.3353	1.089	102.2		
2	0.8601	0.7483	0.3353	1.097	104.1		
3	0.8588	0.7472	0.3353	1.087	101.2		
4	0.8581	0.7465	0.6707	1.435	102.6		
5	0.8541	0.7431	0.6707	1.424	101.6	101.1	2.05
6	0.8559	0.7446	0.6707	1.427	101.7		
7	0.8523	0.7415	1.0060	1.732	98.4		
8	0.8517	0.7410	1.0060	1.734	98.7		
9	0.8528	0.7419	1.0060	1.737	98.9		

表2结果显示,HSYA的平均回收率为101.1%,RSD为2.05%,表明该方法准确、可靠。

2.5.7 耐用性试验

取供试品两份,按上述拟定的方法制备供试品溶液,用不同厂家色谱柱和柱温箱子不同温度下进行测定。结果在使用不同厂家的色谱柱测定时,HSYA色谱峰分离度均良好,且其含量测定结果之

间没有显著差异。在柱温箱温度不同(25℃、30℃、35℃)的情况下对实验结果的影响较小,耐用性好。

2.5.8 样品含量测定

取3批样品和1份自制样品(批号201908001,201908002,201908003,201908010)各2份,制备供试品溶液后进样测定,计算含量。结果见表3。

表3 含量测定结果表

Fig.3 Assay result

批号	称样量(g)	样品峰面积		平均峰面积	含量 (mg·g ⁻¹)	平均含量 (mg·g ⁻¹)
		A	B			
201908001	1.7028	1743599	1764655	1754127	0.8655	0.8670
	1.7033	1761806	1760135	1760971	0.8686	
201908002	1.7038	1750251	1749313	1749782	0.8628	0.8629
	1.7033	1741767	1757738	1749753	0.8630	
201908003	1.7031	1745425	1759227	1752326	0.8644	0.8692
	1.7087	1769512	1785266	1777389	0.8739	
201908010	1.7035	1839215	1845204	1842210	0.9085	0.9181
	1.7084	1887214	1885161	1886188	0.9276	

表3的结果显示,3批棍其勒-13味丸样品中HSYA含量很接近,自制样品含量稍高些。

3 讨论

3.1 流动相的调整

参照《中国药典》2020年版一部“红花”项下的测定方法^[1],选择甲醇-0.7%磷酸-乙腈(26:72:2)为流动相进行实验,但HSYA峰型不对称且拖尾严重。加三乙胺调节0.7%磷酸溶液pH值至6.0后,供试品色谱图中的HSYA峰的对称性由拖尾变成前沿峰,故调整流动相比比例为甲醇-乙腈-0.7%磷酸溶液(28:2:70)。此时HSYA色谱峰的拖尾因子在0.95-1.05之间且与相邻峰达到较好分离,理论板数较高,并具有适宜的保留时间。经以上试验确定流动相为甲醇-乙腈0.7%磷酸水溶液(28:2:70)^[6-8]。流动相中的0.7%磷酸水溶液的pH值为6(用三乙胺调节)。

3.2 样品粉碎粒度的选择

以《中国药典》2020年版一部“红花”含测项下的粉碎细度为参考依据,确定本品粉碎细度为研细后过三号筛。

3.3 溶剂用量的确定

《中国药典》2020年版一部“红花”含测项下的红花称样量为0.4g,加提取溶剂50mL。根据棍其勒-13味丸处方总量和处方中红花的量计算,称取

棍其勒-13味丸1.7g含红花药材0.2g,故选择加提取溶剂25mL。

3.4 超声提取时间的选择

为确定超声提取时间对提取效率的影响,本试验研究比较了提取时间为30 min、40 min和50 min时的提取效率。结果超声提取30 min时含量偏低,超声提取40 min和50 min时,含量基本相同。故确定超声时间为40 min。

参考文献

- [1]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
- [2]杨志福,梅其炳,蒋永培.红花有效成分及药理作用[J].西北药学杂志,2001;16(3):131-133
- [3]吴振华.中药红花研究进展的概述[J].世界最新医学信息文摘,2019;19(34):33-34
- [4]李栋,马秉智,梁莹莹,等.红花中羟基红花黄色素A的提取方法与含量测定研究进展[J].中日友好医院学报,2018;32(1):39-41
- [5]Xu H, Liu T, Wang W, et al. Proteomic Analysis of Hydroxysafflor Yellow A against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats[J]. Rejuvenation research, 2019 Dec;22(6):503-512
- [6]内蒙古自治区食品药品监督管理局.内蒙古蒙药制剂规范(第二册)[M].内蒙古人民出版社,2014:35
- [7]杨金颖,孙芳芳,崔学刚,等. HPLC法测定桂枝红花颗粒(I)中羟基红花黄色素A的含量[J].天津药学,2019;31(02):5-6
- [8]杨洋,李珍,丁华,等.蒙药制剂其格日木汤中羟基红花黄色素A含量的测定[J].中国民族医药杂志,2018;24(08):46-47