

引用:张军辉,郑家秀,周定荣.复方血三七颗粒的质量标准研究[J].湖南中医杂志,2020,36(4):153-156.

复方血三七颗粒的质量标准研究

张军辉¹,郑家秀¹,周定荣²

(1. 康普药业股份有限公司,湖南 长沙,415900;

2. 中南大学湘雅二医院,湖南 长沙,410011)

[摘要] 目的:建立复方血三七颗粒的质量控制方法。方法:采用薄层色谱法对复方血三七颗粒中当归、大血藤、葛根进行定性鉴别;按照《中国药典》2010年版附录规范对复方血三七颗粒的水分、溶化性进行检查;HPLC法测定复方血三七颗粒中槲皮素,比色法测定总黄酮。结果:薄层色谱法鉴别出当归、大血藤、葛根,斑点清晰,专属性好;颗粒的水分平均值为8.24%,RSD值为1.75%,溶化性良好;槲皮素在20~80 μg/ml与峰面积呈良好的线性关系, $r=0.9999$,平均加样回收率为99.17%,RSD值为1.98%;总黄酮在0.01~0.1 mg/ml呈良好的线性关系, $r=0.9996$ 。结论:本方法可有效地控制复方血三七颗粒的质量。

[关键词] 复方血三七颗粒;质量标准;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.04.060

Quality standards for compound Xuesanqi granules

ZHANG Junhui¹, ZHENG Jiaxiu¹, ZHOU Dingrong²

(1. Kamp Medicine Co., Ltd., Changsha 415900, Hunan, China;

2. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To establish a quality control method for compound Xuesanqi granules. Methods: Thin-layer chromatography (TLC) was used for qualitative identification of *Angelica sinensis*, *Sargentodoxa cuneata*, and *Radix Puerariae* in compound Xuesanqi granules. The standard in the appendix of Chinese Pharmacopoeia (version 2010) was used to examine the water content and dissolubility of compound Xuesanqi granules. High-performance liquid chromatography was used to measure quercetin in compound Xuesanqi granules, and colorimetry was used to measure total flavonoids. Results: *Angelica sinensis*, *Sargentodoxa cuneata*, and *Radix Puerariae* were identified by TLC, with clear spots and good specificity. The mean water content of granules was 8.24% (relative standard deviation [RSD] = 1.75%), and the granules had good dissolubility. Quercetin showed a good linear relationship with peak area within the range of 20~80 μg/ml ($r=0.9999$), with an average recovery rate of 99.17% (RSD = 1.98%). Total flavonoids showed a good linear relationship within the range of 0.01~0.1 mg/ml ($r=0.9996$). Conclusion: This method can effectively control the quality of compound Xuesanqi granules.

[Keywords] compound Xuesanqi granules; quality standard; experimental study

复方血三七颗粒是康普药业目前研究的民族药物制剂,由土家族民族中草药血三七为主,与当归、大血藤等活血类中药进行配伍,治疗脑动脉粥样硬化有较好的疗效^[1]。血三七味涩微苦,性平,有小毒,可活血舒筋、行气止痛、止生肌、收敛止泻,苗族和土家族常用来治疗跌打损伤、外伤出血等疾病。其中槲皮素等黄酮类成分为活血行气的物质基础。为了有效地控制复方血三七颗粒的质量,本研究采用薄层色谱(TLC)法对方中当归、大血藤、葛根进行了鉴

别,采用高效液相色谱(HPLC)法对其中的槲皮素进行了定量测定,并采用比色法测定总黄酮。

1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-20A 紫外检测器(日本岛津公司),FA1004 电子分析天平(北京科瑞达有限公司),SCANNER 4 薄层色谱仪(力扬企业有限公司),硅胶 G 板(青岛海洋化工厂),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 试剂公司),乙腈(色谱纯,美国 Fisher 试剂公司),其

他分析纯。槲皮素对照品(批号:100081-200907)、阿魏酸对照品(批号:110773-201012)、当归对照药材(批号:120927-201315)、大血藤对照药材(批号:121353-201107)、葛根对照药材(批号:121551-201103)均购自中国食品药品检定研究院。复方血三七颗粒为本公司自制(批号:20151207、20151209、20151211)。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 当归的 TLC 鉴别 参照文献[2]中的方法进行鉴别。取本品 5 g,研细,加 1% 碳酸氢钠溶液 50 ml,超声提取 15 min,离心,取上清液用稀盐酸调节 pH 值 2~3,用乙醚振摇提取 3 次,20 ml/次,合并乙醚提取液,水浴蒸干,残渣加甲醇 2 ml,使溶解,即为供试品溶液。取当归对照药材 1 g,同上法制成对照药材样品溶液。另取阿魏酸对照品,加甲醇制成 1 mg/ml 的溶液,作为对照品溶液,取缺当归的阴性样品,同上法制成阴性样品溶液。吸取供试品溶液、对照品溶液及阴性样品溶液各 10 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正乙烷-二氯甲烷-醋酸乙酯-甲酸(4:1:1:0.1)为展开剂,展开、取出、晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。结果表明,供试品色谱中,在与对照品相应位置上,显相同颜色的荧光斑点。而阴性样品色谱在对应位置上不显示荧光斑点,由此表明该方法可作为复方血三七颗粒中当归的特征鉴别。(见图 1)

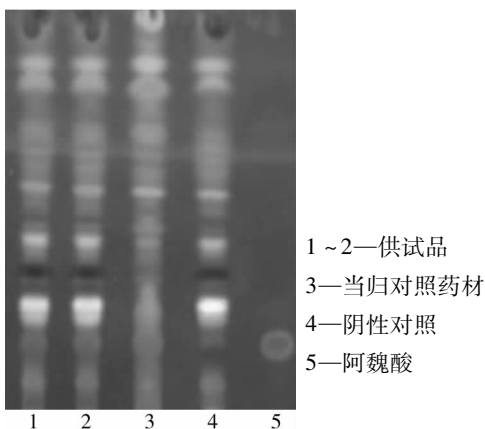


图 1 当归鉴别 TLC 图

2.1.2 大血藤的 TLC 鉴别 参照文献[3]中的方法进行鉴别。取本品 5 g,研细,用 70% 乙醇 20 ml,超声处理 15 min,滤过,取滤液,蒸干,残渣加甲醇 1 ml 溶解,为供试品溶液。取缺大血藤的阴性样品,同上法处理,为阴性样品溶液。另取大血藤对照药材 2 g,同上法处理,作为对照药材溶液。吸取供试品溶液、对照药材溶液及阴性样品溶液各 10 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,甲醇-氯仿(1:5)展开。取出,晾干,喷以 2% 香草醛硫酸溶液-乙醇(4:1)混合溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性样品则无。(见图 2)

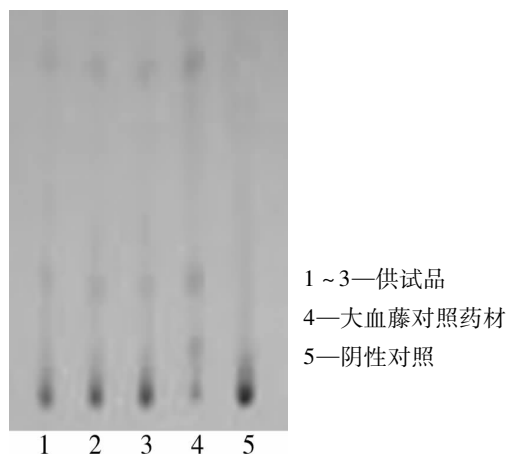


图 2 大血藤鉴别 TLC 图

2.1.3 葛根的 TLC 鉴别 取本品 5 g,加甲醇 25 ml,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取葛根对照药材 0.8 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2015 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 2 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-水(15:6:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。(见图 3)

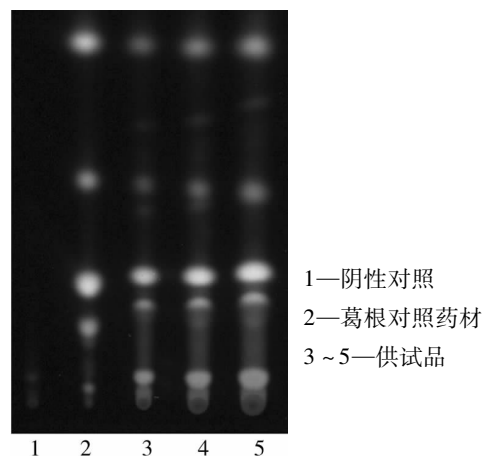


图 3 葛根鉴别 TLC 图

2.2 水分测定 按照《中国药典》2015 年版一部附录 IX H 水分测定法第一法(烘干法),测定 3 批复方血三七颗粒样品的水分,平均值为 8.24%,RSD 为 1.75%。

2.3 溶化性测定 按照《中国药典》2015 年版一部附录 IX C 颗粒剂溶化性检查法,测定 3 批复方血三七颗粒样品的溶化性,结果发现 3 个批号样品均可溶化,仅少量出现轻微浑浊。

2.4 槲皮素的测定

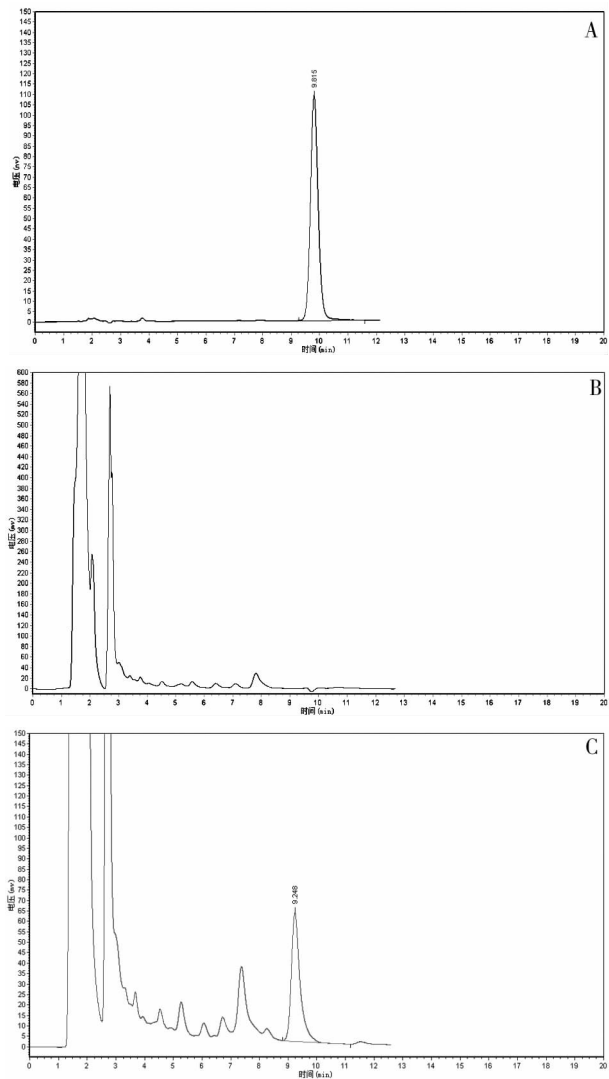
2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相为甲醇-0.4% 磷酸(60:40),体积流量 1 ml/min,检测波长 370 nm,进样量 10 μ l,柱温为室温^[4]。

2.4.2 溶液配置

2.4.2.1 对照品溶液的制备 精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥 12 h 的槲皮素对照品 10 mg,置 20 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,再从中精密吸取 1 ml,转移至 10 ml 量瓶中,加甲醇配制成 50 μg/ml 的溶液。

2.4.2.2 供试品溶液的制备 取本品 10 g,研细,精密称定 5 g,置100 ml量瓶中,加甲醇至刻度,密塞,称定质量,分别于 80 ℃ 水浴回流 0.5 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,作为供试品溶液,即得。

2.4.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方配比称取除血三七外的药材,按制备工艺制成缺血三七的复方血三七颗粒阴性样品。按上述色谱条件测定,吸取上述配置好的对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液进样。供试品色谱图中,在槲皮素的保留时间处有相应化学组分峰,且与其他组分分离度良好,阴性样品也无干扰。(见图 4)



注:A—槲皮素对照品; B—阴性样品; C—供试品

图 4 HPLC 图

2.4.3 线性关系考察 精密称取槲皮素对照品 10 mg,置 50 ml量瓶中,加甲醇至刻度,配制 0.2 mg/ml 对照品储备液。再采用移液管从中精密吸取对照品储备液适量,转移至不同体积的容量瓶中,以甲醇为溶剂稀释至相应刻度,配制成浓度为 20、30、40、50、60、80 μg/ml 槲皮素系列对照品溶液,按上述色谱条件下分别进样,进样量 10 μl,记录峰面积。分别以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,制作标准曲线,得回归方程 $Y = 1038X + 312$, $r = 0.9999$,结果表明槲皮素在 20 ~ 80 μg/ml 与峰面积的线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 精密吸取 60 μg/ml 槲皮素对照品溶液 10 μl,注入 HPLC 色谱仪,连续进样 6 次,测得槲皮素峰面积积分值,结果 RSD 为 1.04%,表明该方法精密度良好。

2.4.5 重复性试验 精密称取同一批号(批号:20151209)的复方血三七颗粒样品 6 份,每份约 5 g,制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样 10 μl,记录色谱图,测定槲皮素峰面积,并计算该批号样品中槲皮素的质量分数,结果槲皮素质量分数的 RSD 值为 1.24%,表明该方法重现性良好。

2.4.6 稳定性试验 取同一复方血三七颗粒样品(批号:20151209),制备供试品溶液,室温下分别在 0、2、4、6、8、12、18 h 后进样,每次进样量为 10 μl,测定峰面积值,RSD 值为 1.38%。结果表明供试品溶液在 18 h 内基本稳定。

2.4.7 回收率试验 取已知含量的复方血三七颗粒样品(批号:20151209,含量已知)适量,精密称定 5 份,按供试品溶液制备方法进行样品制备,各份再分别加入对照品储备液适量,按样品测定法提取,按照上述色谱条件进行含量测定,并计算回收率,结果槲皮素平均回收率分别为 99.17%,RSD 值为 1.98%。

2.4.8 样品含量测定 精密称取 3 个批号的复方血三七颗粒样品,按“2.4.2.2”项下方法进行样品溶液制备,再精密吸取样品溶液 10 μl 进样,按照上述色谱条件进样测定,每个批号平行 3 份样品,并采用标准曲线法以回归方程计算各批样品中槲皮素的质量分数,以各批号平行测定结果的均值计入结果。最终 3 个批号复方血三七颗粒中槲皮素的平均含量为 0.576 mg/g,RSD 为 1.08%。(见表 1)

表 1 复方血三七颗粒样品中槲皮素的测定结果(n=3)

批号	槲皮素含量(mg/g)
20151207	0.578
20151209	0.581
20151211	0.569

2.5 总黄酮含量测定

2.5.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 20 mg (105 ℃ 干燥至恒重)置100 ml量瓶中,加 70% 乙醇适量,振摇使溶解,并稀释至刻度,摇匀。配制成 0.2 mg/ml 的对照品溶液。

2.5.2 标准曲线的制备 精密吸取上述芦丁标准液 0.0、

0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 于 10 ml 比色管中,加 5% NaNO_2 0.5 ml 溶液,摇匀放置 6 min,加入 5% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 30.5 ml 显色 6 min,后再加 3 ml、1 mol/L NaOH 溶液,用 70% 乙醇溶液定容,摇匀放置 15 min。在 510 nm 波长处,以第一管溶液作为空白。测得不同浓度下吸光度值,以质量浓度对吸光度进行线性回归,得回归方程 $A = 11.274C - 0.765$, $r = 0.9996$ 。表明芦丁在 0.01 ~ 0.1 mg/ml 与吸光度线性关系良好。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密称取复方血三七颗粒约 5 g,置 100 ml 锥形瓶中,加 70% 乙醇 50 ml 超声 45 min,过滤,滤液蒸干,用 70% 乙醇定容于 25 ml 容量瓶中,其余的步骤按“标准曲线的制备”项下方法加显色剂显色进行处理,即得。

2.5.4 精密度试验 取 0.05 mg/ml 芦丁对照品溶液,按“标准曲线的制备”项下处理,测定吸光度,连续测定 5 次,计算得吸光度 RSD 值为 0.46%。

2.5.5 重复性试验 精密称取复方血三七颗粒样品 6 份,制备供试品溶液,其余的步骤按“标准曲线的制备”项下方法处理,测定吸光度值,结果吸光度值的 RSD 值为 1.17%。

2.5.6 稳定性试验 称取血三七药材样品 1 份,制备供试品溶液,其余的步骤按“标准曲线制备”项下方法进行处理,分别于 2、6、8、12、16 h 测定吸光度值,结果其 RSD 值为 1.46%。

2.5.7 样品总黄酮含量测定 取定容后的样液 1 ml 置于 10 ml 具塞试管中,并另取 1 支 10 ml 比色管,加入 1 ml 70% 乙醇,均按上述标准曲线绘制方法配制溶液,显色,在 510 nm 波长处测定吸收度,结果 3 个批号(20151207、20151209、20151211)复方血三七颗粒的总黄酮分别为:25.8、26.1、24.7 mg/g,平均为 25.5 mg/g, RSD 值为 2.07%。

3 讨 论

对复方血三七颗粒中当归、大血藤药材进行薄层色谱

定性鉴别,结果阴性样品均无干扰,斑点清晰、分离良好、无拖尾现象,具有较强的操作性,可作为复方血三七颗粒质量标准中的定性鉴别方法。

血三七药材中含有黄酮类,多酚类,皂苷类等多种成分,考虑到黄酮类为其治疗动脉粥样硬化的主要有效成分,且该药材中槲皮素成分含量比较高,故本研究选择槲皮素和总黄酮作为复方血三七颗粒的质量控制指标^[5-6]。提取过程中比较了 95% 乙醇和甲醇 2 种溶剂的提取效果,发现甲醇的提取率最高,且干扰组分也相对较少,结合文献报告关于槲皮素的提取方法,故最终选择甲醇为提取溶剂。分析过程中选择甲醇-0.4% 磷酸(60:40)为流动相,结果显示槲皮素的峰型对称,分离度良好,基线平稳,保留时间也比较合理,并且阴性样品无干扰,故选择该流动相。

参考文献

- [1] 殷智,彭再生,杨长丰. 复方血三七胶囊治疗脑动脉粥样硬化症 42 例疗效观察[J]. 中国民族民间医药杂志,2005(73):90-92.
- [2] 肖霞,曹俊凯. 人参当归颗粒的薄层鉴别[J]. 中国实用医药,2012,7(9):249-250.
- [3] 胡馨,张国明,童月建. 红景天片剂薄层鉴别及红景天甙的含量测定[J]. 中成药,2000,22(11):808-810.
- [4] 张颖,张立木,李同德,等. 泰山沙棘果中总黄酮与槲皮素含量测定及其抗氧化性探讨[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(8):644-646.
- [5] 任恒春,万定荣,邹忠梅. 血三七化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(2):183-185.
- [6] 王金翠,胡雄彬,唐甜甜,等. 血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 现代药物与临床,2014,29(3):239-242.

(收稿日期:2019-08-27)

(上接第 123 页)

参考文献

- [1] 李兰兰,谭秀敏,屠金莉,等. 关于中医药文化国际传播的调查与思考——以中医药文化对在津国际学生及外教的认知调研为基础[J]. 湖南中医杂志,2018,34(10):129-131.
- [2] FAN DM. The year in Chinese Academy of engineering[M]. Xi'an: The fourth military medical university press, 2014.
- [3] YU WD, GUAN T. Economic effect analysis and countermeasure research of Chinese medicine in China's free trade zone arrangements with switzerland[J]. Economist, 2014(9):100-102.
- [4] XIAO ZZ, XING R, GUO XG. The current state of Chinese Medicine in the europe and thoughts on its development[J]. J Hunan Univ Tradit Chin Med, 2012, 32(5):75-78.
- [5] YAO ZJ, WANG ZQ, YU JB, et al. View at the development of ac-

upuncture from the success of application for world immaterial heritages with acupuncture[J]. J Hubei Univ Tradit Chin Med, 2011, 13(4):42-44.

- [6] WANG CY, BAI XY, WANG CH. Traditional Chinese Medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development[J]. Am J Chin Med, 2014, 42(3):543-559.
- [7] 凌子平. “一带一路”背景下中医药传播路径研究[J]. 南京中医药大学学报:社会科学版, 2018, 19(3):157-159.
- [8] FAN DM. Holistic integrative medicine[J]. Am J Dig Dis, 2014, 1(1):22-36.
- [9] WANG M, FRANZ G. The role of the European Pharmacopoeia (Ph Eur) in quality control of Traditional Chinese Herbal medicine in European member states[J]. World J Tradit Chin Med, 2015, 1(1):5-15.

(收稿日期:2019-05-29)