

基于多成分同时检测的良附丸质量控制

卢君蓉¹, 李文兵², 季宁平¹, 王世宇^{1*}, 傅超美¹, 严鑫¹, 杨志平¹

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 成都 611900)

[摘要] **目的:**建立一种同时检测良附丸中主要成分的定性、定量方法,为其质量控制标准提供参考。**方法:**采用薄层色谱法(TLC),以硅胶GF₂₅₄为薄层板,石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(5:1)为展开剂,于254,365 nm波长下检视,对良附丸中高良姜素、山柰素、香附烯酮、圆柚酮和 α -香附酮5种特征性成分同时进行定性鉴别;高效液相色谱法(HPLC),采用Phenomenex C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~30 min,55% A;30~45 min,55%~70% A;45~70 min,70% A),检测波长242 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,对5种特征性成分含量进行同时测定。**结果:**该法可在同一条件下实现对良附丸中5个特征性成分的同时检测,不同批次良附丸的高良姜素质量分数在3.33~3.81 mg·g⁻¹,山柰素质量分数在1.13~1.29 mg·g⁻¹,香附烯酮质量分数在0.57~1.12 mg·g⁻¹,圆柚酮质量分数在0.02~0.09 mg·g⁻¹, α -香附酮质量分数在0.36~0.54 mg·g⁻¹。**结论:**该方法简便、可行、重复性好,可为进一步完善良附丸质量标准,为其二次开发奠定基础。

[关键词] 良附丸; 高良姜素; 山柰素; 香附烯酮; 圆柚酮; α -香附酮

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0049-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220049

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1404.072.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 14:04

Quality Control of Liangfuwan Based on Multi-components Determination

LU Jun-rong¹, LI Wen-bing², JI Ning-ping¹, WANG Shi-yu^{1*},

FU Chao-mei¹, YAN Xin¹, YANG Zhi-ping¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Neo-Green Pharmaceutical Co. Ltd., Chengdu 611900, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a qualitative and quantitative method which can simultaneously measure the main components of Liangfuwan, and provide a reference for its quality control. **Method:** Thin layer chromatography (TLC) method was used for qualitative determination of 5 characteristic components: galangin, kaempferol, cyperotundone, nootkatone and α -cyperone. In the TLC method, silica gel GF₂₅₄ was used as thin layer plate and petroleum ether (60-90℃) - ethyl acetate (5:1) was used as the developing agent; the results were viewed under the wavelength of 254 nm and 365 nm. High performance liquid chromatography (HPLC) determination method was established to simultaneously determine the contents of the above components. HPLC method was performed on Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), with methanol (A) -0.2% phosphoric acid aqueous solution (B) as mobile phase for gradient elution (0-30 min, 55% A; 30-45 min, 55%~70% A; 45-70 min, 70% A) at a flow of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 242 nm and column temperature was 30℃. **Result:** The method could be used to simultaneously determine five components in

[收稿日期] 20151113(002)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81303227);四川省教育厅资助科研项目(15ZA0089);成都中医药大学科技发展基金(ZRQN1412);四川省科技厅苗子工程项目(2016RZ0039);成都中医药大学科技发展基金(ZRQN1607)

[第一作者] 卢君蓉, 硕士, 讲师, 从事中药新制剂、新剂型与中药质量标准研究, Tel:13688167921, E-mail:634589580@qq.com

[通讯作者] *王世宇, 博士, 教授, 从事中药新制剂、新剂型与中药质量标准研究, Tel:028-61800033, E-mail:497217505@qq.com

Liangfuwan under the same condition, and the mass fraction was 3.33-3.81, 1.13-1.29, 0.57-1.12, 0.02-0.09, 0.36-0.54 mg·g⁻¹ respectively for galangin, kaempferol, cyperotundone, nootkatone and α -cyperone.

Conclusion: This method is simple, feasible and reproducible, which can provide a good reference for further improvement of quality control of Liangfuwan.

[**Key words**] Liangfuwan; galangin, kaempferol; cyperotundone; nootkatone; α -cyperone

中药制剂品种繁多、剂型丰富,由于原材料、工艺、辅料等的特殊性,其质量控制研究相对复杂和困难,而其质量控制问题一直以来备受业内关注,现有标准难以体现中药复方制剂“君、臣、佐、使”配伍和整体协调作用,甚至阻碍了中医传统经典方剂的开发和典型中药传统制剂的二次开发,已然成为影响中药制剂科学化、现代化发展的重要瓶颈问题,选择与中药制剂功能主治相关的成分或指标开展中药制剂质量标准的研究已成为业界共识^[1-2]。良附丸首载于清·谢元庆之《良方集腋》,是由高良姜、醋香附 2 味中药等份、粉碎、混合而制成的水泛丸,具有温胃理气之功效,临床上用于寒凝气滞、脘痛吐酸、胸腹胀满,为治疗寒凝气滞胃脘疼痛的代表制剂^[3]。作为典型的中药传统复方制剂,良附丸药味组成固定,制备工艺简单,适于现代人由于生活、学习、工作环境和压力等造成的胃脘疼痛,临床疗效显著,极具研究价值和开发潜力,先后被研究制成良附滴丸^[4]、良附软胶囊^[5]、良附口服液^[6]、良附口服微乳^[7]、良附颗粒^[8]、良附胃漂浮片^[9]等多种不同的新制剂,其抑制应激性胃溃疡、抗炎和镇痛等效果相当于或优于原水泛丸制剂^[7,10-12]。然而目前良附丸质量标准还不完善,2015 年版《中国药典》一部仅以本品与高良姜对照药材的薄层色谱对比和 α -香附酮的含量作为控制指标^[3],以良附丸所含挥发油类成分为关键制备的各种新制剂,也多以 α -香附酮为质量控制指标,难以全面反映和控制产品质量。本研究在前期对香附醋制前后化学成分变化及建立同时测定香附中圆柚酮, α -香附酮,香附烯酮 3 种特殊性成分的基础上,建立了能同时检测良附丸中山柰素,高良姜素,圆柚酮, α -香附酮,香附烯酮 5 种特征性成分的含量测定方法和薄层鉴定方法,为进一步完善良附丸质量标准提供参考,也为中医经典名方和传统制剂的二次开发奠定基础。

1 材料

1200 Series 系列高效液相色谱仪(G1312B 四元梯度泵,G1322A 脱气机,G1316B 柱温箱,G1329B 自动进样器,G1315C 二极管阵列紫外检测器,美国 Agilent),BP211DAG 型电子天平(德国 Sartorius),

KQ5200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),CAMAG 型薄层色谱仪(卡玛公司)。

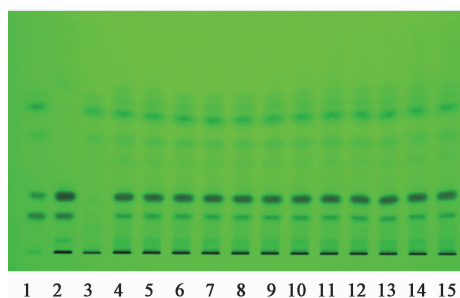
对照品高良姜素(中国食品药品检定研究院,批号 111699-200501),山柰素(成都曼思特生物科技有限公司,批号 Must-12020812,纯度 $\geq 98\%$),圆柚酮(美国 Sigma 公司,批号 10112423,纯度 $\geq 98\%$), α -香附酮(江西本草天工科技有限责任公司,批号 1443-080529,纯度 $\geq 98\%$),香附烯酮(自制,检测纯度 $> 98\%$),香附对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 120918-200809),高良姜对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 1263-0301),良附丸(北京同仁堂制药有限公司,批号 2083024,2083025,2083026,3088042,3082248,3083042,4082082,4082083,4082085,15081216,15081311,4082016)。甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别^[13-14] 取良附丸粉末 1 g,加甲醇 25 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液挥干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取香附、高良姜对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液。取高良姜素、山柰素、圆柚酮、 α -香附酮、香附烯酮对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的混合溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VI B)试验,吸取上述 4 种溶液各 4 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(5:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254 nm)下检视,再喷 10% 硫酸乙醇显色,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点颜色明显,置紫外灯(365 nm)下检视,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置,显相同颜色荧光斑点,见图 1,2。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[15] Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~30 min,55% A;30~45 min,55%~70% A;45~70 min,70% A),检测波长 242 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}$ C。在选定条件下,各色谱峰与样品中其他组分色谱峰达基线分离,其理论板数 $> 4\ 000$ 。见图 3。



1. 混合对照品(从下到上分别为山柰素, 高良姜素, 圆柚酮, α -香附酮, 香附烯酮); 2. 高良姜对照药材; 3. 香附对照药材; 4~15. 不同批次良附丸(图 2 同)

图 1 良附丸 TLC(254 nm)

Fig. 1 TLC of Liangfuwan(254 nm)

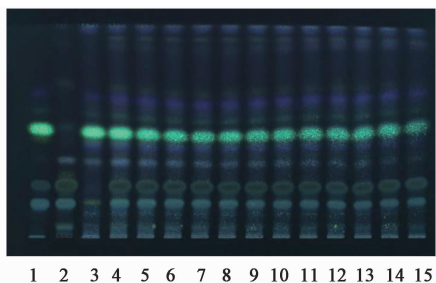
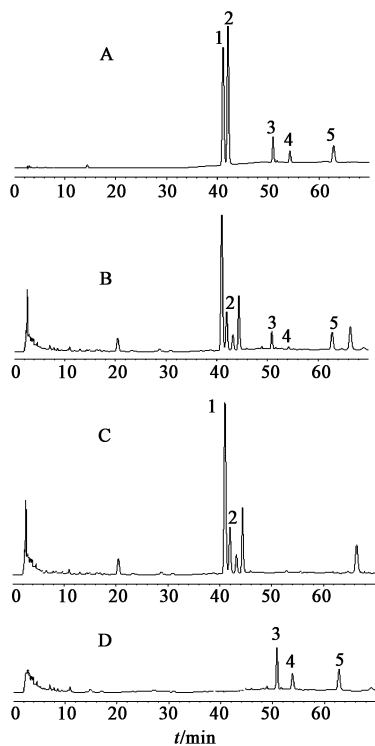


图 2 良附丸 TLC(365 nm)

Fig. 2 TLC of Liangfuwan(365 nm)



A 对照品; B 良附丸样品(批号 3088042); C. 缺香附阴性样品; D. 缺高良姜; 1. 高良姜素; 2. 山柰素; 3. 香附烯酮; 4. 圆柚酮; 5. α -香附酮

图 3 良附丸 HPLC

Fig. 3 HPLC of Liangfuwan

2.2.2 对照品溶液的制备 取高良姜素, 山柰素, 香附烯酮, 圆柚酮, α -香附酮对照品适量, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶内, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得混合对照品储备液。精密量取上述储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶内, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得对照品溶液, 质量浓度分别为 0.254, 0.032, 0.051, 0.005, 0.021 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 供试品溶液的制备 取良附丸粉末(60 目) 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液, 分别进样 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 μL , 测定各色谱峰峰面积。以对照品进样量(μg) 为横坐标, 色谱峰峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程见表 1。结果表明, 各成分在相应范围内, 线性关系良好。

表 1 线性范围考察

Table 1 Linear range survey

成分	回归方程	线性范围/ μg
高良姜素	$Y = 2\ 709.98X - 21.07$	0.508 ~ 2.540
山柰素	$Y = 2\ 019.75X - 0.62$	0.065 ~ 0.324
香附烯酮	$Y = 1\ 376.35X - 2.37$	0.102 ~ 0.510
圆柚酮	$Y = 4\ 265.34X - 2.92$	0.001 ~ 0.050
α -香附酮	$Y = 3\ 060.46X - 4.98$	0.043 ~ 0.214

注: 相关系数均为 0.999 9。

2.2.5 专属性考察 取高良姜、香附粉末约 0.5 g, 精密称定, 按 2.2.3 项下方法制备, 得供试品溶液, 进样, 考察其专属性。结果表明, 高良姜对良附丸中香附烯酮, 圆柚酮, α -香附酮无干扰; 香附对良附丸中高良姜素、山柰素无干扰, 说明专属性好。见图 3。

2.2.6 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 测定高良姜素, 山柰素, 香附烯酮, 圆柚酮, α -香附酮峰面积, 其 RSD 分别为 0.8%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 0.4%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品(批号 3088042) 6 份, 分别按供试品溶液的制备方法制备, 进样 10 μL , 测定峰面积, 计算高良姜素, 山柰素, 香附烯酮, 圆柚酮, α -香附酮平均质量分数分别为 3.45, 1.23, 0.57, 0.07, 0.43 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为

0.9% ,0.9% ,1.2% ,0.9% ,1.4% ,表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 3088042),分别于 0,1,2,4,8,16,24 h 进样 10 μL ,测定峰面积,高良姜素,山柰素,香附烯酮,圆柚酮, α -香附酮 RSD 分别为 1.0% ,1.2% ,1.3% ,1.3% ,1.5% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取 6 份已知含量的样品(批号 3083042)约 0.50 g,精密称定,分别加入对照品储备液 1 mL。按供试品溶液的制备方法制备,进样 10 μL ,测定峰面积,计算回收率,结果表明,各成分加样回收率均在 95% ~ 105% ,RSD 在 0.8% ~ 1.5% ,说明加样回收率良好。结果见表 2。

表 2 良附丸 5 种成分加样回收率试验

Table 2 Results of added sample recovery in Liangfuwan

成分	称样量 /g	样品中量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
高良姜素	0.500 2	1.725	2.540	4.118	94.21	95.24	2.1
	0.501 2	1.728	2.540	4.088	92.91		
	0.500 7	1.726	2.540	4.186	96.85		
	0.501 3	1.728	2.540	4.228	98.43		
	0.500 4	1.725	2.540	4.138	95.00		
	0.500 6	1.726	2.540	4.115	94.06		
山柰素	0.500 2	0.615	0.324	0.922	94.75	94.91	4.5
	0.501 2	0.616	0.324	0.916	92.59		
	0.500 7	0.616	0.324	0.931	97.22		
	0.501 3	0.617	0.324	0.946	101.54		
	0.500 4	0.615	0.324	0.921	94.44		
	0.500 6	0.616	0.324	0.904	88.89		
香附稀酮	0.500 2	0.283	0.510	0.772	95.88	95.65	2.1
	0.501 2	0.284	0.510	0.774	96.08		
	0.500 7	0.283	0.510	0.763	94.12		
	0.501 3	0.284	0.510	0.758	92.94		
	0.500 4	0.283	0.510	0.787	98.82		
	0.500 6	0.283	0.510	0.773	96.08		
圆柚酮	0.500 2	0.037	0.050	0.085	96.00	96.00	1.3
	0.501 2	0.037	0.050	0.085	96.00		
	0.500 7	0.037	0.050	0.085	96.00		
	0.501 3	0.037	0.050	0.085	96.00		
	0.500 4	0.037	0.050	0.086	98.00		
	0.500 6	0.037	0.050	0.084	94.00		
α -香附酮	0.500 2	0.213	0.214	0.423	98.13	95.17	2.6
	0.501 2	0.214	0.214	0.410	91.59		
	0.500 7	0.213	0.214	0.413	93.46		
	0.501 3	0.214	0.214	0.421	96.73		
	0.500 4	0.213	0.214	0.415	94.39		
	0.500 6	0.213	0.214	0.420	96.73		

2.2.10 样品测定 取不同批次良附丸,按照本方法进行样品处理和成分测定,结果见表 3。不同批次良附丸的高良姜素质量分数在 3.33 ~ 3.81 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,山柰素质量分数在 1.13 ~ 1.29 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,香附烯酮质量分数在 0.57 ~ 1.12 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,圆柚酮质量分数在 0.02 ~ 0.09 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, α -香附酮质量分数在 0.36 ~ 0.54 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,其中高良姜素,山柰素,香附烯酮, α -香附酮的含量较高,可以作为良附丸质量控制的研究指标。

表 3 良附丸中 5 种成分质量分数

Table 3 Determination results of contents in Liangfuwan $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	高良姜素	山柰素	香附稀酮	圆柚酮	α -香附酮
1	3.33	1.13	0.59	0.02	0.47
2	3.81	1.26	0.57	0.09	0.54
3	3.66	1.27	1.12	0.08	0.46
4	3.71	1.26	0.71	0.04	0.51
5	3.66	1.24	0.68	0.06	0.38
6	3.45	1.23	0.57	0.07	0.43
7	3.56	1.22	0.75	0.04	0.54
8	3.60	1.22	0.67	0.06	0.37
9	3.73	1.29	0.82	0.05	0.52
10	3.67	1.25	0.70	0.06	0.36
11	3.59	1.24	0.58	0.05	0.41
12	3.62	1.19	0.71	0.04	0.53

3 讨论

2015 年版《中国药典》良附丸薄层鉴定仅以高良姜为对照药材参照,缺乏对香附药材的质量控制指标,且展开系统中含有甲苯,对身体的危害性较大。因此,本实验在《中国药典》良附丸方法基础上进行了改进,系统考察了供试品制备方法、展开系统、显色方法等,建立了能同时鉴别高良姜中山柰素、高良姜素和香附中香附稀酮,圆柚酮, α -香附酮 5 种成分的薄层鉴别方法。该方法具有样品处理简单、展开系统毒性小、专属性强等优点,可作为良附丸制剂质量控制方法。

在建立良附丸 HPLC 含量测定方法时,发现高良姜素和山柰素极性差异极小,在 HPLC 中难以完全分开,与文献报道不符。李智勇等^[16]研究表明在甲醇-0.4% 磷酸(60:40)条件下,山柰素与高良姜素出峰时间分别为 9.51,22.28 min;刘原作等^[17]报道在甲醇-乙腈-水-甲酸(24:26:50:0.5),山柰素与高良姜素出峰时间分别为 9 min 和 28 min 左右。而笔者根据上述条件多次重复研究,发现山柰素和高

良姜素出峰时间基本一致,未能分开。究其原因,发现上述两篇文献山柰素对照品均购于中国食品药品检定研究院,而中国食品药品检定研究院将山柰素和山柰酚混为同一物质,实际为山柰酚(CAS520-18-3),不是山柰素(CAS491-54-3),因此,建议中国食品药品检定研究院对该 2 种对照品标准进行修订,区分两者之差异,以避免研究之混淆。

[参考文献]

[1] 伍振峰,郑琴,杨明,等. 中药制剂质量控制的方法模式分析与研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1332-1336.

[2] 梁小银,陈少旭,吴垠. 中药制剂质量控制研究的发展趋势[J]. 中国药房,2014,25(3):280-283.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:991.

[4] 蔡瑞民. 良附滴丸的制备方法及其质量控制方法:中国, CN1660380A[P]. 2005. 1.

[5] 奚肇宏,夏军权. 胃痛立应软胶囊的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(1):131-132.

[6] 翟志光,牛欣,冯前进,等. HPLC 测定良附口服液中 α -香附酮的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(10):988-999.

[7] 翟志光. 以良附丸为模型药物的中药复方微乳载药体系研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007.

[8] 李新芳,侯晨艳. 用正交试验优选良附颗粒提取工艺

[J]. 新疆中医药,2005,23(5):9-10.

[9] 田静,曹靖,周晓琳,等. 良附胃漂浮片的制备及体外溶出度的研究[J]. 世界中医药,2012,7(6):563-564.

[10] 夏军权,贾晓斌,奚肇宏,等. 胃痛立应软胶囊治疗寒凝气滞胃脘痛的研究[J]. 辽宁中医学院学报,2006,8(1):11-12.

[11] 刘发,刘满江,熊元君. 良附颗粒治疗胃脘痛的试验研究[J]. 中成药,1999,21(8):417-420.

[12] 郑雯婕. 良附滴丸治疗胃脘痛(寒凝气滞证)的临床研究[D]. 长春:长春中医药大学,2012.

[13] 李文兵,胡昌江,龙兰艳,等. 盐益智仁饮片的质量控制研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(24):3278-3281.

[14] 卢君蓉,李文兵,傅超美,等. 香附药材的质量控制方法的探讨[J]. 中国医院药学杂志,2015,35(5):389-392.

[15] 卢君蓉,李文兵,王世宇,等. 香附醋制前后香附烯酮、圆柚酮和 α -香附酮的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):24-26.

[16] 李智勇,孙冬梅,张建军. HPLC 法测定高良姜中高良姜素和山柰素的含量[J]. 中华中医药杂志,2010,25(9):1368-1370.

[17] 刘原作,王鑫,刘有平. RP-HPLC 法同时测定高良姜中槲皮素等 4 种黄酮的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2014,31(1):13-16.

[责任编辑 顾雪竹]