

# 降脂颗粒的质量研究

孙凤利<sup>1</sup>, 杨立新<sup>2</sup>, 崔淑莲<sup>2</sup>

(1 北京市怀柔区第一医院, 北京 怀柔 101400; 2 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

**摘要:** 目的: 建立降脂颗粒质量标准。方法: TLC 定性, HPLC-ELSD 法测定含量。流动相: 乙腈-水(30: 70); 漂移管温度: 105 °C; N<sub>2</sub> 流速: 2.70 mL/min。结果: 黄芪甲苷线性范围在 1.0~ 5.0 μg 之间; 平均回收率 99.19%; RSD= 2.20%。结论: 此方法快速、灵敏、准确, 重复性好。为建立降脂颗粒质控标准提供了科学依据。

**关键词:** 降脂颗粒; 黄芪甲苷; 薄层色谱; 高效液相色谱法

**中图分类号:** R284.1   **文献标识码:** B   **文章编号:** 1005-9903(2005)01-0007-03

降脂颗粒是由黄芪等十味中药组成, 具有健脾利湿, 祛瘀化浊的功能, 适用于高血脂症的患者, 为保证药物的安全性, 有效性和可控性, 我们对制剂质量进行研究, 建立了 6 味药材(黄芪、绞股蓝、决明子、虎杖、丹参和山楂)的薄层鉴别; 对君药黄芪中有效成分黄芪甲苷, 采用以蒸发光散射为检测器的高效液相色谱法(HPLC-ELSD)进行含量测定。从而圆满完成了本制剂的质量研究。

ELSD 是一种新型质量型检测器, 其响应值取决于待测物质的质粒数量和大小, 与化合物的光学特性无关, 因此适用于不具有发色团, 不挥发性的成分, 如甾萜、皂苷、内酯类等测定。本文根据黄芪甲苷的结构特点和化学性质, 建立了反相高效液相-蒸发光散射法<sup>[1]</sup>。实验证明该法具有快速、灵敏、准确、分辨率高的优点, 优于药典规定的薄层扫描法。

## 1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(美国惠普); 黄芪甲苷、熊果酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚对照品, 决明子、虎杖、丹参对照药材(由中国药品生物制品检定所提供)。3 批降脂颗粒及阴性样品(由中国中医研究院中药研究所剂型室提供); 试剂均为色谱纯及分析纯。

## 2 定性鉴别

**2.1 黄芪<sup>[2]</sup>** 取[含量测定]项下的供试品溶液, 作为供试品溶液。另取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VIB)试验, 吸取

供试品溶液 5 μL, 对照品溶液 3 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(13: 7: 2) 10 °C 以下放置过夜的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 日光下显相同颜色的棕褐色斑点。

**2.2 绞股蓝<sup>[3]</sup>** 取本品 10 g, 研细, 加甲醇 30 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 10% 氢氧化钠溶液 5 mL 使溶解, 再加水 25 mL 转移至分液漏斗中, 用水饱和正丁醇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 用水洗涤 2 次, 每次 20 mL, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加水 1~ 2 mL 使溶解, 放冷, 通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm, 长 12 cm), 以水 100 mL 洗脱, 弃去水液, 再以 70% 乙醇 50 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取绞股蓝对照药材 2 g, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VIB)试验, 吸取上述两种溶液各 3 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-水(15: 40: 22: 10) 10 °C 以下放置过夜的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的棕褐色斑点。

**2.3 决明子、虎杖** 取本品 15 g, 研细, 加甲醇 50 mL, 浸渍 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 再加盐酸 1 mL, 置水浴中加热 30 min, 立即冷却, 用乙醚提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加氯仿 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取决明子、虎杖对照药材各 1 g, 分别同法制成对照药材溶液。再取大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品, 加甲

醇制成每 1mL 各含 1mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取供试品溶液 10 $\mu$ L、对照药材溶液各 5 $\mu$ L、对照品溶液 5 $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(30~ 60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15: 5: 1) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的橙色荧光斑点; 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的橙黄色荧光斑点, 置氨蒸气中熏后, 日光下检视, 斑点变为红色。

**2.4 丹参<sup>[4]</sup>** 取本品 7g, 研细, 加水 50mL, 浸泡过夜, 加热回流提取 30min, 静置过滤, 滤液用 10% 盐酸酸化至 pH2, 用醋酸乙酯提取 3 次, 每次 10mL, 合并醋酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取丹参对照药材 1g, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述二种溶液各 5 $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-丙酮-甲酸(25: 10: 4) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置氨蒸气中熏后, 再喷以 5% 三氯化铁乙醇溶液, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

**2.5 山楂** 取本品 7g, 研细, 加醋酸乙酯 25mL, 超声处理 15min, 滤过, 滤液蒸至 2mL, 作为供试品溶液。另取熊果酸对照品, 加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述两种溶液各 4 $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-氯仿-醋酸乙酯(20: 5: 8) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 于 110 $^{\circ}$ C 加热 5~ 7min, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的紫红色斑点。

### 3 含量测定

**3.1 色谱条件** 色谱柱: ZORBAX RX-C<sub>18</sub>(4.6mm $\times$ 150mm), 5 $\mu$ m; 流动相: 乙腈-水(30: 70); 流速: 1.0mL/min, 柱温: 35 $^{\circ}$ C, ELSD 参数: 漂移管温度: 105 $^{\circ}$ C, 氮气流速: 2.70mL/min。

**3.2 标准曲线的制备** 取干燥至恒重的黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1mL 含 0.507mg 的溶液, 制成对照品溶液。分别精密吸取上述溶液 2.4.6.8.10 $\mu$ L 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以对照品进样量的自然对数为横坐标, 对照品峰面积的自然对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 黄芪甲苷在 1.014~ 5.07 $\mu$ g 范围内线性良好。其

回归方程为  $Y=4.155+1.745X$ ,  $r=0.9997$ 。

**3.3 空白试验** 按处方中药味比例, 自配不含黄芪的群药, 按其工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制备并测定, 结果空白溶液在与黄芪甲苷对照品相同保留时间处未见明显色谱峰, 故认为无干扰。见图 3。

**3.4 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液, 在所确定的 HPLC-ELSD 条件下, 进样 10 $\mu$ L, 重复进样 5 次, 求得黄芪甲苷峰面积自然对数的相对标准偏差 < 0.50%, 表明仪器的精密度良好。

**3.5 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液(批号 030901) 10 $\mu$ L, 分别于配制后在室温放置 0.1.2.4.24.28h 依次进行测定, 结果 RSD 为 0.83%, 表明供试品溶液在 24h 内稳定。

**3.6 重复性试验** 取同一批号(030901) 样品 5 份, 按供试品溶液制备方法和测定法进行操作并测定黄芪甲苷的含量, 经计算平均含量为每袋 1.34mg, RSD 为 2.32%。

**3.7 加样回收实验** 取已知含量同一批号的样品适量, 精密称定, 分别精密加入黄芪甲苷对照品 2% 氢氧化钾甲醇溶液, 按供试品溶液的制备方法制备, 测定含量, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.19%, RSD 为 2.20%,  $n=5$ 。结果见表 1。

**3.8 供试品、对照品溶液的制备及测定** 对照品溶液的制备: 精密称取黄芪甲苷对照品适量, 加甲醇制成每 1mL 含 0.25mg 的溶液, 作为对照品溶液。

供试品溶液的制备: 取本品装量差异项下的内容物, 研细, 取 7g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 2% 氢氧化钾甲醇溶液 50mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 3h, 放置至室温, 密塞, 再称定重量, 用 2% 氢氧化钾甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 25mL, 蒸干, 残渣加水 25mL 使溶解, 并转移至分液漏斗中, 用氯仿-正丁醇(2: 1) 提取 4 次, 每次 25mL, 合并氯仿-正丁醇(2: 1) 液, 用 1% 磷酸二氢钾水溶液 50mL 洗涤, 弃去 1% 磷酸二氢钾水溶液, 氯仿-正丁醇(2: 1) 液蒸干, 残渣加水 1~ 2mL 使溶解, 放冷, 通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5cm, 长 12cm), 以水 50mL 洗脱, 弃去水液, 再以 40% 乙醇 30mL 洗脱, 弃去 40% 乙醇洗脱液, 继用 70% 乙醇 50mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并转移至 2mL 量瓶内, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

测定法: 分别精密吸取对照品溶液 5.10.15 $\mu$ L

与供试品溶液 10μL, 注入液相色谱仪, 测定, 将峰面积及浓度均取自然对数后, 用回归方程法计算, 求出供试品浓度的自然对数, 再转换成供试品的含量, 结果见表 2。图 1, 2。

表 1 回收率试验

样品中黄芪甲苷的含量 (mg)	加入黄芪甲苷的量 (mg)	测出黄芪甲苷的量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.4692	0.45	0.9044	96.71		
0.4988	0.45	0.9562	101.64		
0.4925	0.45	0.9457	100.71	99.19	2.20
0.4728	0.45	0.9099	97.13		
0.5320	0.45	0.9810	99.77		

表 2 样品测定结果

批号	黄芪甲苷含量(mg/袋)	RSD(%)
030901	1.40	2.15
030902	1.37	1.68
030903	1.38	1.53

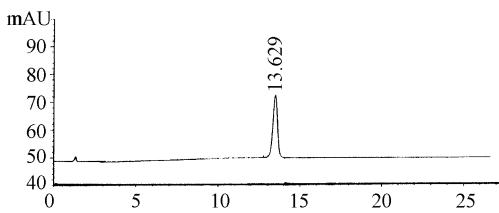


图 1 黄芪甲苷对照品 HPLC 图

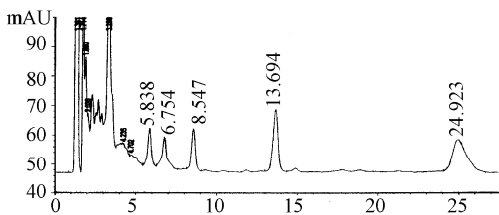


图 2 降脂颗粒 HPLC 图

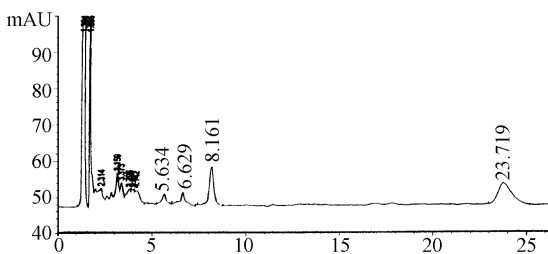


图 3 降脂颗粒空白 HPLC 图

#### 4 讨论

参考文献[5]确定了以 2% 氢氧化钾甲醇溶液作为提取溶剂。分别超声处理 30min; 加热回流提取 2h; 冷浸 24h, 处理, 制成供试品溶液并测定, 结果证明加热回流提取含量最高, 故采用加热回流提取。加热回流时间分别考察了 1/2、1、2、3、4h。结果证明 2h 黄芪甲苷已基本提尽, 取 3h 为提取完全。

供试品溶液用 2% KOH 甲醇溶液提取, 黄芪中所含皂苷结构很相似, 黄芪皂苷属于环黄芪醇苷。环黄芪醇类皂苷在一定强度的碱液中加热可转化为黄芪甲苷, 故本品含量应为环黄芪醇类皂苷以黄芪甲苷计。

黄芪甲苷结构没有发色基团, 只有很弱的末端吸收, 为含量测定带来困难, 直到目前为止均以双波长薄层扫描为含量测定依据。采用 ELCD 检测器, 黄芪甲苷可以采用高效液相作为分离和分析手段, 扩大了 HPLC 的应用范围, 因此该法值得推广。

在含量测定中对漂移观管的温度、氮气流量和流动相的比例等进行调试和实验, 确定了最佳的色谱条件。

#### 参考文献:

- [1] 周春玲, 鲁静. 高效液相色谱-蒸发光散射检测测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(3): 166-168.
- [2] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典[S]. 2000 年版. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000. 6.
- [3] 山东省卫生厅编. 山东中药材标准[M]. 济南: 山东友谊出版社, 1995. 137.
- [4] 李静, 何丽一, 宋万志. 丹参中水溶性酚酸类成分的薄层扫描测定法[J]. 药学学报, 1993, 28(7): 543-547.
- [5] 王宝葵. 黄芪药材及其制剂中黄芪甲苷的含量测定方法研究综述[J]. 中国药品标准, 2000, 1(3): 4.