

保肝降脂颗粒质量标准

谢华阁, 张兴德*, 谢辉, 李昕阳, 刘婷
(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] **目的:** 建立保肝降脂颗粒的质量标准。**方法:** 采用 TLC 对保肝降脂颗粒中丹参、香附、片姜黄进行定性鉴别; 通过 HPLC 同时测定保肝降脂颗粒中绿原酸和丹酚酸 B 含量, 流动相乙腈(A)-0.5% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 10% A; 10~20 min, 10%~15% A; 20~30 min, 15%~20% A; 30~53 min, 20%~30% A; 53~60 min, 30%~10% A), 绿原酸、丹酚酸 B 检测波长分别为 327, 286 nm。**结果:** 建立的丹参、香附、片姜黄 TLC 鉴别方法中斑点清晰且阴性对照无干扰。绿原酸、丹酚酸 B 线性范围分别为 0.050 8~0.571 5, 0.326~3.26 μg , 平均回收率分别为 100.56% (RSD 2.00%), 100.50% (RSD 1.59%)。**结论:** 建立的方法定性专属性强、定量准确度高, 适用于保肝降脂颗粒的质量控制。

[关键词] 保肝降脂颗粒; 丹参; 香附; 片姜黄; 绿原酸; 丹酚酸 B; 高效液相色谱法; 薄层色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0044-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014080044

Quality Standards of Baogan Jiangzhi Granules

XIE Hua-ge, ZHANG Xing-de*, XIE Hui, LI Xin-yang, LIU Ting
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quality standards of Baogan Jiangzhi granules. **Method:** TLC was used to identify *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Cyperi Rhizoma* and *Rhizoma Wenyujin Concisum* in Baogan Jiangzhi granules. HPLC was adopted to determine contents of chlorogenic acid and salvianolic acid B with mobile phase of acetonitrile (A)-0.5% formic acid (B) gradient elution (0-10 min, 10% A; 10-20 min, 10%-15% A; 20-30 min, 15%-20% A; 30-53 min, 20%-30% A; 53-60 min, 30%~10% A), detection wavelength of these two ingredients were 327 and 286 nm, respectively. **Result:** Established TLC had clear spots without interference of the negative control sample. Linear ranges of chlorogenic acid and salvianolic acid B were 0.050 8-0.571 5 and 0.326-3.26 μg , average recoveries were 100.56% (RSD 2.00%) and 100.50% (RSD 1.59%), respectively. **Conclusion:** These methods was accurate and specific, which were suitable for quality control of Baogan Jiangzhi granules.

[Key words] Baogan Jiangzhi granules; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Cyperi Rhizoma*; *Rhizoma Wenyujin Concisum*; chlorogenic acid; salvianolic acid B; HPLC; TLC

保肝降脂颗粒为临床经验方, 由茵陈、丹参、香

附、片姜黄等药味组成, 具有补益肝脾、清热化湿、消痰祛瘀的功效, 临床用于脂肪肝肝肾亏虚、湿热痰瘀互结症。方中茵陈为君药, 具有保肝利胆、降血脂、抗凝血和抗病毒等药理作用^[1]; 丹参为臣药, 具有保护肝脏、加快肝功能的修复、抑制肝硬化的功效^[2]。课题组拟将该复方研制成中药六类新药, 故本实验对复方中茵陈、丹参、香附等药味进行定性鉴别, 以茵陈中绿原酸和臣药丹参中丹酚酸 B 为指标性成分, 采用 HPLC 同时测定二者含量, 建立该制剂的质量控制标准。

[收稿日期] 20131123(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001640); 江苏高校优势学科建设工程项目(ysxk-2010)

[第一作者] 谢华阁, 在读硕士, 从事中药制剂研究, Tel: 025-85811517, E-mail: xhg641@163.com

[通讯作者] *张兴德, 硕士, 副教授, 从事中药制剂研究, Tel: 025-85811517, E-mail: xingde2293@126.com

1 材料

2695-2998 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Hedera ODS-2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), AY220 型电子天平(日本岛津公司)。

药材均购自南京海昌药材饮片厂,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求,其中茵陈系规定的绵茵陈;硅胶 GF254 和薄层色谱硅胶 G(青海海洋化工有限公司分厂),绿原酸(批号 110753-200413)、丹酚酸 B(批号 111562-201111)、丹参酮 II_A(批号 110766-200619)、香附酮(批号 110748-201111)对照品和丹参(批号 120923-201113)、片姜黄(批号 121006-200903)对照药材均购自中国食品药品检定研究院,保肝降脂颗粒(批号 130327, 130328, 130329, 自制),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

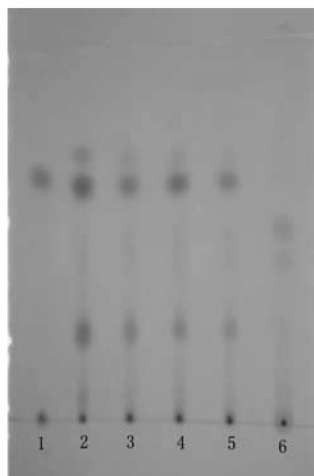
2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 丹参 取本品 5 g 研碎,加乙醚 20 mL 超声处理 30 min,滤过,滤液用 5% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去 5% 氢氧化钠溶液,乙醚用水 20 mL 洗涤 1 次,弃去水液,乙醚液蒸干,残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取丹参对照药材 5 g,同法制成丹参对照药材溶液。取缺丹参阴性样品 5 g,同法制备阴性样品供试液。取丹参酮 II_A 对照品,加乙酸乙酯制成 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液。吸取上述 4 种溶液 10 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯(19:1.5)为展开剂,展开,展距 10 cm,取出,晾干,日光下检视,结果见图 1,显示供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应位置上,均显相同颜色的斑点,阴性样品在该位置无相应斑点。

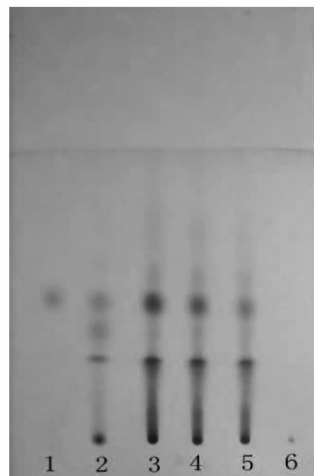
2.1.2 制香附 取本品 5 g 研碎,加乙醚 5 mL 超声处理 5 min,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯 0.5 mL 溶解制成供试品溶液。取香附对照药材约 1 g,同法制成香附对照药材溶液。取缺香附样品约 1 g,同法制备阴性样品供试液。取 α-香附酮对照品,加乙酸乙酯制成 1 g·L⁻¹ 的对照品溶液。吸取上述 4 种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以苯-乙酸乙酯-冰醋酸(92:5:5)为展开剂,展距 10 cm,展开,取出,晾干,放置片刻,置紫外光灯(254 nm)下检视,结果见图 2,显示供试品色谱中,

在与对照品色谱相应位置显清晰的相同斑点,而阴性样品在该位置无相应斑点。



1. 丹参酮 II_A 对照品;2. 对照药材;3~5. 供试品;6. 阴性样品

图 1 保肝降脂颗粒中丹参 TLC



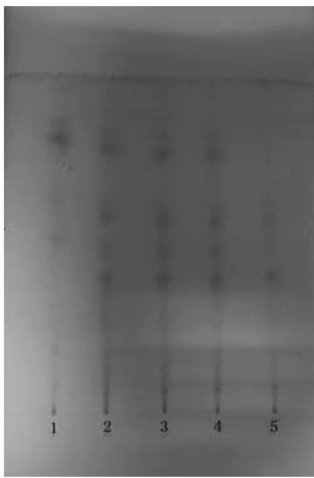
1. α-香附酮对照品;2. 对照药材;3~5. 供试品;6. 阴性样品

图 2 保肝降脂颗粒中香附 TLC

2.1.3 片姜黄 取本品颗粒 5 g,加石油醚(30~60℃)5 mL,时时振摇约 30 min,滤过,滤液转移至 5 mL 量瓶中,加石油醚定容,制成供试品溶液。另取片姜黄对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。取缺片姜黄样品 1 g,同法制成阴性样品供试液。吸取上述 3 种溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯(17:3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 香草醛硫酸溶液,于 100℃ 加热至斑点显色清晰,结果见图 3,发现供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,而阴性样品在该位置无相应斑点。

2.2 绿原酸与丹酚酸 B 的含量测定

2.2.1 色谱条件 Hedera ODS-2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30℃,流速 1 mL·



1. 对照药材;2~4. 供试品;5. 阴性样品

图3 保肝降脂颗粒中片姜黄 TLC

min^{-1} , 流动相乙腈(A)-0.5%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 10% A; 10~20 min, 10%~15% A; 20~30 min, 15%~20% A; 30~53 min, 20%~30% A; 53~60 min, 30%~10% A), 绿原酸、丹酚酸 B 检测波长分别为 327, 286 nm, 进样量 10 μL 。

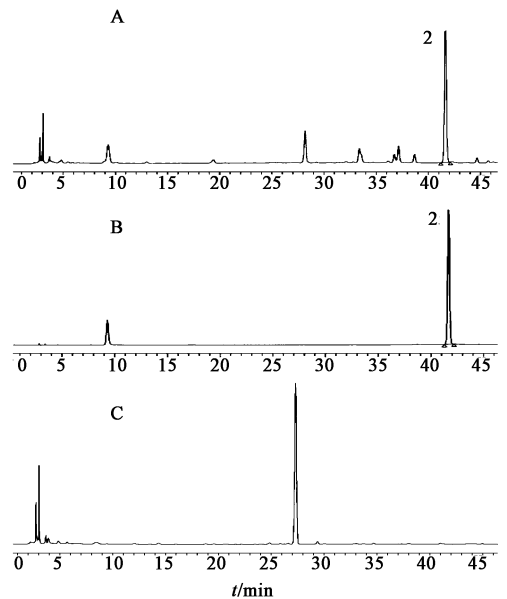
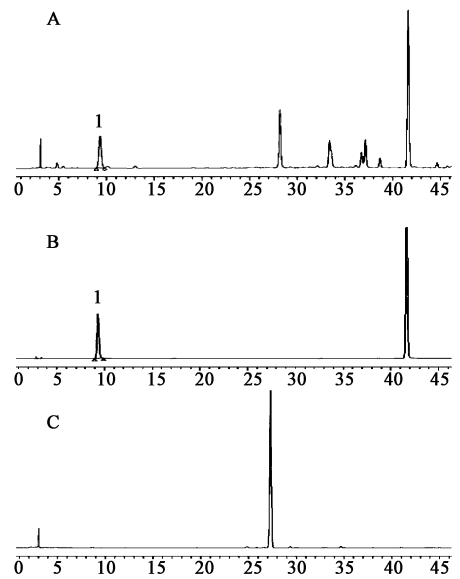
2.2.2 对照品储备液的制备 分别精密称取绿原酸、丹酚酸 B 对照品适量, 加 50% 甲醇溶解并配制质量浓度分别为 0.381, 3.260 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品颗粒适量研细, 精密称取本品粉末 0.45 g 置具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(500 W, 50 kHz) 30 min, 放冷, 加 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 取缺茵陈与丹参的阴性对照颗粒适量, 按 2.2.3 项下方法制成阴性样品溶液。

2.2.5 专属性试验 分别精密吸取对照品储备液、供试品溶液、阴性样品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 记录色谱图, 见图 4, 显示阴性样品溶液在绿原酸与丹酚酸 B 出峰处无干扰。

2.2.6 标准曲线的绘制 精密吸取混合对照品储备液适量, 加 50% 甲醇稀释成绿原酸质量浓度分别为 0.038 1, 0.019 1, 0.009 5, 0.006 4, 0.003 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 丹酚酸 B 质量浓度分别为 0.326 0, 0.163 0, 0.081 5, 0.054 3, 0.032 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程依次为 $Y = 2.443 \times 10^6 X_1 - 27\ 521.057$ ($R^2 = 0.999\ 9$), $Y = 1.091 \times 10^6 X_2 - 36\ 030.561$ ($R^2 = 0.999\ 9$), 线性范围分别



A. 供试品;B. 对照品;C. 阴性样品;1. 绿原酸;2. 丹酚酸 B

图4 保肝降脂颗粒 HPLC

为 0.050 8~0.571 5, 0.326~3.26 μg 。

2.2.7 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算绿原酸与丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.87%, 0.96%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 取同批保肝降脂颗粒样品, 按 2.2.3 项下方法制备 5 份供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算绿原酸与丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.73%, 1.22%, 表明该方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 h 进样, 按 2.2.1

项下色谱条件测定,计算绿原酸与丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 2.60%,0.45%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量的本品颗粒,研细,精密称取粉末适量,分别按低、中、高质量浓度精密加入混合对照品溶液适量,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 1,表明该方法回收率良好。

表 1 保肝降脂颗粒中绿原酸加样回收率

No.	样品含量 /mg	对照品 加入量 /mg	测得总量 /mg	平均 回收率 /%	RSD /%	
绿原酸	1	0.234 6	0.375 2	0.607 8	100.56	2.00
	2	0.229 1	0.381 5	0.611 6		
	3	0.234 1	0.381 1	0.605 2		
	4	0.290 4	0.300 6	0.591 1		
	5	0.287 2	0.305 7	0.593 0		
	6	0.291 2	0.303 5	0.604 7		
	7	0.345 2	0.242 3	0.597 5		
	8	0.349 1	0.249 0	0.598 2		
	9	0.350 8	0.234 7	0.586 5		
丹酚酸 B	1	1.674 0	2.501 2	4.185 1	100.50	1.59
	2	1.669 0	2.498 7	4.179 6		
	3	1.681 0	2.513 3	4.203 3		
	4	2.092 0	2.102 1	4.221 0		
	5	2.100 1	2.085 0	4.197 0		
	6	2.089 0	2.079 0	4.168 9		
	7	2.534 0	1.673 3	4.158 3		
	8	2.552 0	1.598 8	4.202 6		
	9	2.506 9	1.664 7	4.189 4		

2.2.11 样品测定 取 3 批颗粒样品,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算绿原酸质量分数分别为 1.32,1.31,1.35 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,丹酚酸 B 质量分数分别为 9.22,9.30,9.31 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

参考 2010 年版《中国药典》及文献资料^[3-4],尝试了多种保肝降脂颗粒样品处理方法及 TLC 展开条件,结合本组方特点对文献中方法进行改善,最终选定方中丹参、制香附、片姜黄的定性鉴别方法,但茵陈的 TLC 鉴别方法存在组间干扰。

本方在长期临床实践中均以绵茵陈入药,2010 年版《中国药典》将该药味中绿原酸含量作为质控指标^[4];文献报道绿原酸能显著降低大鼠血浆中胆固醇和甘油三酯含量,肝脏中甘油三酯水平也明显降低^[5],绿原酸还具有利胆、抗菌消炎的功效^[6],故将其作为本复方质量控制的指标成分之一。丹参作为活血化瘀药具有多种药理作用,主要活性成分为丹酚酸 B 和丹参酮 II_A,经检测发现多批丹参饮片中丹参酮 II_A 含量差异较大,且含量远低于丹酚酸 B,丹酚酸 B 具有抗脂质过氧化及抗肝纤维化作用^[7-8],故将丹酚酸 B 也作为含量控制指标之一。

采用 HPLC 同时测定两种指标成分,文献报道酚酸类成分常采用有机相与酸水溶液组成流动相^[9],酸水可抑制酚酸类成分的电离,峰形亦不易受流动相梯度变化的影响。本制剂最终采用乙腈-甲酸水溶液为流动相,调整流动相比比例,筛选分离度与峰形较好的色谱条件。采用二极管阵列紫外检测器,于 200~400 nm 分别对绿原酸和丹酚酸 B 对照品溶液进行全波长扫描,选择在各自最大波长处分别检测,待测成分响应信号好,可有效减少其他成分的干扰。

[参考文献]

- [1] 曹锦花. 茵陈的化学成分与药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(6):489.
- [2] 林峰,石杰. 丹参活性成分的药效药理作用[J]. 医学信息,2011,24(6):3813.
- [3] 吴笛,王德勤,李楚源. 复方丹参片薄层色谱鉴别方法研究[J]. 药物分析杂志,2012,32(9):1658.
- [4] 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,2010:69,70,223,241.
- [5] 吴卫华,康楨,欧阳冬升,等. 绿原酸的药理学研究的进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(4):691.
- [6] 刘颖,郭明晔,白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材,2012,35(7):1180.
- [7] 刘静,戴忠,王钢力,等. 丹参活性成分及相关分离分析方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):288.
- [8] 王蓉,原永芳. 丹酚酸 B 药理作用的研究概况[J]. 中医导报,2011,17(4):130.
- [9] 张倩,张加余,高凤阳,等. HPLC-DAD 法同时测定清开灵注射液 7 个酚酸类成分[J]. 药物分析杂志,2013,33(1):73.

[责任编辑 仝燕]