

# 四味降酶片的质量标准研究

张世晓\*,张星星,王香粉,李 恒(解放军第159医院药械科,河南驻马店 463000)

中图分类号 R917;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)08-1040-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.08.07

**摘要** 目的:建立四味降酶片的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中丹参、茵陈和蒲公英进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中绿原酸的含量,色谱柱为Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-3%乙酸溶液(10:90, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为327 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。结果:丹参、茵陈和蒲公英的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。绿原酸检测进样量线性范围为0.26~0.79 μg( $r=0.999\ 9$ );定量限、检测限分别为0.26、0.12 μg;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于1.0%;加样回收率为96.11%~101.96%(RSD=1.98%, $n=9$ )。结论:所建标准可用于四味降酶片的质量控制。

**关键词** 四味降酶片;薄层色谱法;高效液相色谱法;绿原酸;质量标准

## Study on Quality Standard for Siwei Jiangmei Tablets

ZHANG Shixiao, ZHANG Xingxing, WANG Xiangfen, LI Heng (Dept. of Pharmaceutical Equipment, No.159 Hospital of PLA, Henan Zhumadian 463000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard for Siwei jiangmei tablets. METHODS: TLC method was used for the qualitative identification of *Salvia miltiorrhiza*, *Artemisiae Scopariae Herba* and *Taraxaci Herba*. HPLC method was adopted for the content determination of chlorogenic acid. The determination was performed on Agilent's TC-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-3% acetic acid (10:90, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 327 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: TLC spots of *S. miltiorrhiza*, *Artemisiae Scopariae Herba* and *Taraxaci Herba* were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of chlorogenic acid was 0.26-0.79 μg for ( $r=0.999\ 9$ ). The limits of quantitation and detection were 0.26, 0.12 μg, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.0%. The recoveries were 96.11%-101.96% (RSD=1.98%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: Established standard can be used for quality control of Siwei jiangmei tablets.

**KEYWORDS** Siwei jiangmei tablets; TLC; HPLC; Chlorogenic acid; Quality standard

四味降酶片是我院制剂室根据中医中药理论自行研制且临床应用功效显著的中药制剂。该处方由蒲公英、车前草、丹参、茵陈等4味中药材组合而成。方中蒲公英苦、甘,寒,归肝、胃经,有清热解毒、消肿散结、利尿通淋之功效<sup>[1]</sup>,有研究发现其具有广谱抑菌活性,并且可增强机体免疫<sup>[2-3]</sup>;车前草具有清热利尿通淋、祛痰、凉血、解毒、抗炎和保肝作用<sup>[4]</sup>;丹参具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功效,对受损肝细胞也有一定的保护作用<sup>[5]</sup>;茵陈具有清利湿热、利胆保肝的作用<sup>[6]</sup>。我院多年临床经验发现,上述4味药材合用具有清热解毒、利湿去黄、利胆保肝、活血化瘀之功效,可用于慢性乙型肝炎、急性黄疸性肝炎的快速退黄,但目前尚缺乏该制剂的质量标准。本研究采用薄层色谱法(TLC)对制剂中茵陈、蒲公英和丹参进行定性鉴别,采用高效液相色谱法(HPLC)对制剂中茵陈和蒲公英的主要成分绿原酸<sup>[7]</sup>进行含量测定,以为其质量

标准的制定提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200 LC型HPLC仪,包括TU-1901型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KQ2200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BSA224S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

### 1.2 药品与试剂

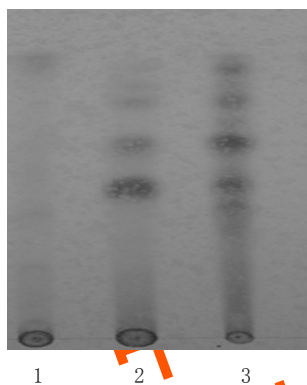
四味降酶片(解放军第159医院制剂室自制,批号:161203、161205、161208,规格:0.25 g/片);丹参对照药材(批号:120923-201615)、茵陈对照药材(批号:120950-201007)、蒲公英对照药材(批号:121195-201503)、绿原酸对照品(批号:110753-201415,纯度:96.2%)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

\* 主管药师。研究方向:医院制剂。电话:0396-2957041。E-mail:zsxzzyd@126.com

## 2.1 定性鉴别

2.1.1 丹参 取样品适量,除去包衣,研细,精密称取粉末2 g,加水15 mL、盐酸1 mL,超声(功率:80 W,频率:40 kHz,下同)处理30 min,滤过,滤液用乙酸乙酯萃取2次,每次10 mL,合并乙酸乙酯萃取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取丹参对照药材细粉(过2号筛)1 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按四味降酶片处方和工艺制备缺丹参的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按2015年版《中国药典》(四部)TLC法<sup>[1]</sup>试验,吸取上述供试品溶液和阴性对照溶液各3  $\mu$ L,对照药材溶液5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-二氯甲烷-甲酸乙酯-甲醇-甲酸(2:3:4:0.5:2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2%三氯化铁乙醇溶液,在105  $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图1。



注:1.阴性对照;2.丹参对照药材;3.供试品

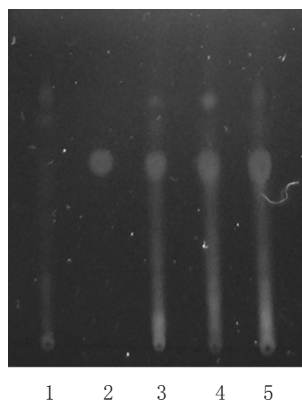
Note: 1. negative control; 2. *Salvia miltiorrhiza* reference substance; 3. test sample

图1 丹参的薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms of *S. miltiorrhiza*

2.1.2 茵陈和蒲公英 取样品适量,除去包衣,研细,精密称取粉末1.5 g,加50%甲醇溶液20 mL,超声处理30 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取茵陈对照药材和蒲公英对照药材各0.5 g,分别加50%甲醇溶液20 mL,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加50%甲醇溶液1 mL使溶解,制成单一对照药材溶液。取绿原酸对照品,加甲醇制成质量浓度为0.6 mg/mL的对照品溶液。按四味降酶片处方和工艺制备缺茵陈和蒲公英的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按2015年版《中国药典》(四部)TLC法<sup>[1]</sup>试验,吸取上述供试品溶液和阴性对照溶液各4  $\mu$ L,单一对照药材溶液3  $\mu$ L,对照品溶液2  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸丁酯-甲酸-水(7:4:2, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱

中,在与对照药材和对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图2。



注:1.阴性对照;2.对照品;3.蒲公英对照药材;4.茵陈对照药材;5.供试品

Note: 1. negative control; 2. control substance; 3. *Artemisiae Scopariae Herba* reference substance; 4. *Taraxaci Herba* reference substance; 5. test sample

图2 蒲公英和茵陈的薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatograms of *Artemisiae Scopariae Herba* and *Taraxaci Herba*

## 2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m);流动相:乙腈-3%乙酸溶液(10:90, V/V);流速:1.0 mL/min,检测波长:327 nm;柱温:25  $^{\circ}$ C;进样量:20  $\mu$ L<sup>[8-10]</sup>。

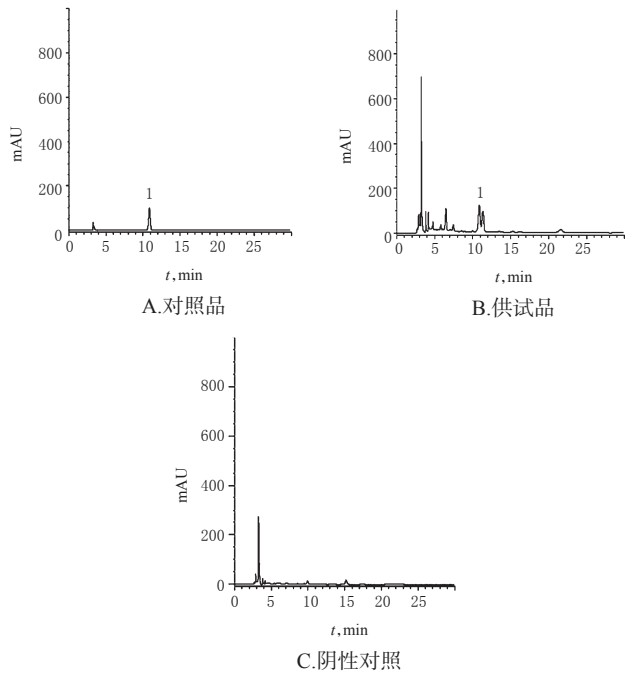
2.2.2 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品适量,精密称定,加50%甲醇溶液溶解制成绿原酸质量浓度为260  $\mu$ g/mL的对照品贮备液。取上述对照品贮备液1 mL,置于10 mL量瓶中,加50%甲醇溶液定容,即得绿原酸质量浓度为26  $\mu$ g/mL的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品适量,除去包衣,研细,称取1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加50%甲醇溶液50 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用50%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按四味降酶片处方和工艺制备缺茵陈和蒲公英的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,理论板数以绿原酸峰计大于5 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图3。

2.2.6 专属性试验 取上述对照品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,待测成分出峰时间稳定、峰形良好,阴性对照无干扰,详见图3。



注: 1. 绿原酸  
Note: 1. chlorogenic acid

图3 高效液相色谱图  
Fig 3 HPLC chromatograms

2.2.7 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液0.50、0.75、1.00、1.25、1.5 mL,分别置于10 mL量瓶中,加50%甲醇溶液定容,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各20 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以绿原酸进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得绿原酸回归方程 $y=31\ 202x+96.57$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,绿原酸检测进样量线性范围为0.26~0.79 μg。

2.2.8 定量限与检测限考察 分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果显示,绿原酸的定量限与检测限分别为0.26、0.12 μg。

2.2.9 中间精密度试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:161203)适量,在不同时间、不同人员、不同仪器设备情况下,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积并计算样品含量。结果,绿原酸平均含量的RSD为0.03%,表明中间精密度良好。

2.2.10 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:161203)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、10、12、24 h按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸峰面积的RSD为0.70%( $n=7$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.2.11 重复性试验 精密称取样品(批号:161203)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按

“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,绿原酸含量平均值为1.502 mg/g,RSD为0.26%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.2.12 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:161203)适量,每份0.8 g,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的绿原酸对照品溶液,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 1 Results of recovery tests ( $n=9$ )

样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1.234 0	1.040 0	2.264 1	99.05		
1.230 0	1.040 0	2.229 5	96.11		
1.242 0	1.040 0	2.293 6	101.12		
1.202 0	1.300 0	2.473 1	97.78		
1.200 0	1.300 0	2.457 7	96.75	98.74	1.98
1.202 0	1.300 0	2.473 8	97.83		
1.222 0	1.560 0	2.780 8	99.92		
1.236 0	1.560 0	2.826 6	101.96		
1.212 0	1.560 0	2.742 6	98.12		

2.2.13 耐用性试验 (1)色谱柱考察。取样品(批号:161203)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[色谱柱分别为Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Waters Xbridge C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Hypersil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm)]进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,详见表2。结果表明,本色谱条件在一定色谱柱变动情况下耐用。(2)流动相考察。取样品(批号:161203)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[流动相乙腈-3%乙酸溶液比例(V/V)分别为8:92、10:90、12:88]进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,详见表2。结果表明,本色谱条件在一定流动相变动情况下耐用。(3)流速考察。取样品(批号:161203)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(流速分别为0.9、1.0、1.1 mL/min)进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,详见表2。结果表明,本色谱条件在一定流速变动情况下耐用。(4)检测波长考察。取样品(批号:161203)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(检测波长分别为322、327、330 nm)进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,详见表2。结果表明,本色谱条件在一定检测波长变动情况下耐用。(5)柱温考察。取样品(批号:161203)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(柱温分别为20、25、30 ℃)进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,详见表2。结果表明,本色谱条件在一定柱温变动情况下耐用。

2.2.14 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按

“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

表2 耐用性试验结果

Tab 2 Results of durability tests

色谱条件	含量,mg/g	平均值,mg/g	RSD, %
色谱柱			
Agilent 5 TC-C <sub>18</sub>	1.508	1.517	0.53
Waters Xbridge C <sub>18</sub>	1.523		
Hypersil C <sub>18</sub>	1.521		
流动相			
乙腈-3%乙酸溶液(8:92, V/V)	1.523	1.514	0.54
乙腈-3%乙酸溶液(10:90, V/V)	1.508		
乙腈-3%乙酸溶液(12:88, V/V)	1.510		
流速			
0.9 mL/min	1.501	1.516	1.33
1.0 mL/min	1.508		
1.1 mL/min	1.539		
检测波长			
322 nm	1.524	1.521	0.80
327 nm	1.508		
330 nm	1.532		
柱温			
20 °C	1.513	1.518	0.95
25 °C	1.508		
30 °C	1.535		

表3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 3 Results of content determination of samples (n=3)

样品批号	含量,mg/g	RSD, %
161203	1.5112	0.64
161205	1.5167	1.61
161208	1.5131	1.23

### 3 讨论

根据绿原酸活性成分的极性,在预试验中笔者分别以水和不同体积分数(10%、20%、30%、40%、50%、60%)的甲醇溶液作为提取溶剂<sup>[1]</sup>。结果显示,50%甲醇溶液对绿原酸的提取率相对高于其他体积分数的甲醇溶液和水作为提取溶剂时的提取率。

四味降酶片在制备过程中采用的是传统水提法,绿原酸成分的极性较大,笔者参考相关文献[8-11],考察了甲醇-0.5%乙酸溶液(20:80, V/V)、乙腈-0.3%乙酸溶液(15:85, V/V)、乙腈-0.1%甲酸溶液(15:85, V/V)、乙腈-0.3%冰醋酸溶液(10:90, V/V)为流动相时绿原酸的保留时间和分离度。结果显示,流动相为乙腈-0.3%乙

酸溶液(10:90, V/V)时绿原酸的保留时间适宜且分离度较好。

笔者在选择检测波长时,对对照品溶液进行全波长扫描,结果绿原酸最大吸收波长为327 nm,因此本试验设定波长为327 nm,既满足了含量测定要求,又保证了结果的准确性。

综上所述,本研究所建标准可用于四味降酶片的质量控制。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 57-58、69、76、239、352.
- [2] 屠国昌. 蒲公英的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 海峡药学, 2012, 24(5): 33-35.
- [3] 于立恒. 蒲公英药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(7): 617-620.
- [4] 夏玲红, 金冠钦, 孙黎, 等. 车前草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2013, 16(2): 294-295.
- [5] 罗彩莲. 丹参的药理作用与临床应用[J]. 中国当代医药, 2012, 19(12): 11-12.
- [6] 王茜. 茵陈的药理作用及其主要化学成分药理学研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(4): 87-89.
- [7] 魏明, 杨晓梅, 刘佳红, 等. 绿原酸的药理作用研究进展[J]. 陕西中医, 2016, 37(4): 511-512.
- [8] 余晟岚, 许果. 反相高效液相色谱法测定金嗓口服液中绿原酸的含量[J]. 中国药业, 2015, 24(10): 65-66.
- [9] 段杨, 刘应华, 宋愿智, 等. 高效液相色谱法测定小儿咽扁颗粒中绿原酸含量[J]. 中国药业, 2014, 23(3): 38-39.
- [10] 张彦丽, 王艳, 李新霞, 等. 高效液相色谱法测定昆仑雪菊中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 107-109.
- [11] 罗慧玉, 闫伟伟, 徐鹏, 等. 杏花中绿原酸提取工艺优化及不同产地和品种杏花中绿原酸的含量比较[J]. 中国药房, 2017, 28(7): 975-977.

(收稿日期: 2017-06-01 修回日期: 2017-08-13)

(编辑: 张 静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅