

· 论 著 ·

健脾和胃颗粒质量标准的研究

赵 丹¹,许绍兰¹,李 蔚²,朱诗竞¹,毛峻琴¹

[摘要] 目的 研究并建立健脾和胃颗粒的质量标准。方法 采用 TLC 法对健脾和胃颗粒中的丹参、山楂和党参三味药进行定性鉴别;采用 HPLC 法测定健脾和胃颗粒丹参中的丹酚酸 B 含量,Agilent Eclipse Plus C₁₈柱(4.6×250 mm,5 μm),以甲醇-乙腈-1.67%甲酸水溶液(27:9:64)为流动相;检测波长为 286 nm,柱温 25 ℃,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL。结果 试验采用 TLC 定性鉴别的三味药色谱斑点清晰,阴性对照无干扰;以 HPLC 法测定健脾和胃颗粒丹参中的丹酚酸 B,丹酚酸 B 浓度在 12.1856~389.94 μg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系,线性回归方程为 $Y=6.5459X-3.7811$ ($r=0.9999, n=6$),回收率为 99.97%,RSD 为 1.07%。结论 本试验确定的方法操作简单、灵敏、准确,可用于健脾和胃颗粒的质量控制。

[关键词] 健脾和胃颗粒;丹参;山楂;党参;丹酚酸 B;鉴别;含量测定

[中图分类号] R286 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.06.011

Study on the quality standard of Jianpihewei Granules

ZHAO Dan¹, XU Shao-lan¹, LI Wei¹, ZHU Shi-jing¹, MAO Jun-qin¹. 1. Department of Pharmacy, 85 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China;2. Department of Pharmacy, 105 Hospital of PLA, Hefei, Anhui 361000, China

[Abstract] Objective To study and establish the quality standard for Jianpihewei Granules. Methods TLC was used to identify salvia miltiorrhizae, crataegus pinnatifida and codonopsis pilosula in Jianpihewei Granules. The content of salvianolic acid B in salvia miltiorrhizae was determined by HPLC. Methanol-acetonitrile-1.67% formic acid solution (27:9:64) was used for mobil phase of Agilent Eclipse Plus C₁₈(4.6×250 mm,5 μm). The detection wavelength was 286 nm, flow rate was 1.0 mL/min and the temperature of column was 25 ℃. The injection volume was 10 μL. Results The spots on TLC are clear without negative sample interference. The concentration of salvianolic acid B in salvia miltiorrhizae determined by HPLC showed a good linear relationship with peak area in the range of 12.1856~389.94 μg/mL of salvianolic acid B. The linear regression equation was $Y=6.5459X-3.7811$ ($r=0.9999, n=6$). The recovery was 99.97% and RSD was 1.07%. Conclusion The method is simple, sensibility and accuracy, which can be used in quality control of Jianpihewei Granules.

[Key words] Jianpihewei Granules; salvia miltiorrhizae; crataegus pinnatifida; codonopsis pilosula; salvianolic acid B

健脾和胃颗粒为解放军 105 医院自制制剂,是由丹参、党参、山楂等 12 味组成的复方制剂,具有健脾利湿、疏肝理气、清热活血等功效。为了提高该制剂的质量标准,本文使用 TLC 法对丹参、山楂和党参进行了定性鉴别,并采用 HPLC 法测定健脾和胃颗粒丹参中丹酚酸 B 含量,提高并完善了健脾和胃颗粒质量标准^[1-3]。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦公司,四元泵,DAD 检测器)、BT25S 型电子分析天平(德国 Sartorius)、KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、WD-9403 型紫外

分析仪(北京市六一仪器厂)、硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂分厂)。

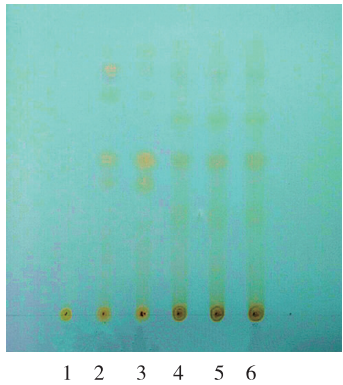
1.2 试药 健脾和胃颗粒(规格:15g/袋,盒/10 袋,解放军 105 医院制剂室,批号 140721、140919、141205)、丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111562-201313,含量为 97.0%)、丹参对照药材(120923-201414)、山楂对照药材(121138-200905)和党参对照药材(121057-201206)均购自中国食品药品检定研究院,阴性对照品由本院自制,水为纯化水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 TLC 鉴别

2.1 健脾和胃颗粒丹参鉴别 取健脾和胃颗粒与阴性对照样品各 2.0 g,研细,分别加无水乙醚 10 mL,振摇放置 1 h,过滤并将滤液挥干,残渣加 1 mL 乙酸乙酯溶解,作为供试品溶液和阴性样品溶液;另取丹参药材、对照药材各 1 g,同法制成药材、

基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ03-1)
作者单位:1.200052 上海,解放军 85 医院药剂科;2.361000 安徽合肥,解放军 105 医院药剂科
通讯作者:毛峻琴,E-mail:xushaolan@126.com

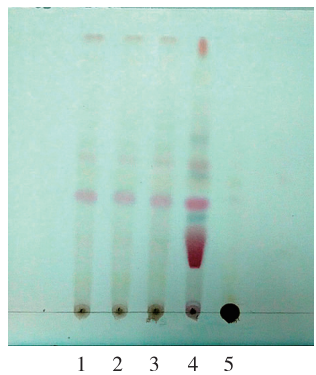
对照药材溶液。照文献^[4]薄层色谱法试验,吸取上述四种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(4:1)为展开剂展开,然后取出晾干。健脾和胃颗粒供试品在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点^[5]。见图 1。



1: 缺丹参阴性对照; 2: 丹参对照药材; 3: 丹参药材; 4, 5, 6: 样品

图 1 丹参薄层色谱图

2.2 健脾和胃颗粒山楂鉴别 取健脾和胃颗粒与本品阴性对照样品各 3 g, 研粉, 分别加乙酸乙酯 10 mL, 超声处理 15 min, 滤过后取滤液浓缩成 1 mL, 作为供试品溶液和阴性样品溶液; 另取山楂对照药材 1 g, 加乙酸乙酯 4 mL, 同法制成对照药材溶液。照文献^[4]薄层色谱法试验, 吸取上述溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:4:0.5)为展开剂^[6], 展开, 取出, 晾干。喷以硫酸乙醇溶液(3 \rightarrow 10), 在 80 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。健脾和胃颗粒供试品, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。见图 2。

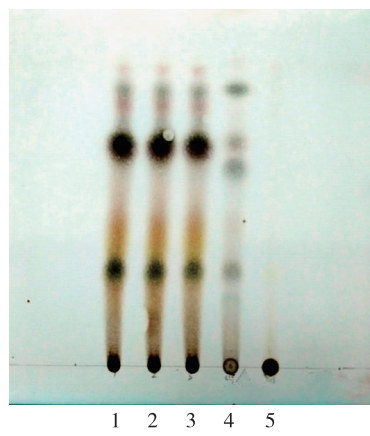


1, 2, 3: 样品; 4: 山楂对照药材; 5: 缺山楂阴性对照

图 2 山楂薄层色谱图

2.3 健脾和胃颗粒党参鉴别 取健脾和胃颗粒与本品阴性对照样品各 20 g, 研细, 分别加甲醇超声提

取两次(每次 50 mL) 每次 30 min, 滤过并将滤液浓缩至干, 加水 20 mL 使溶解, 加三氯甲烷 50 mL 提取, 弃去三氯甲烷液, 水溶液用水饱和正丁醇提取 2 次, 每次 25 mL, 合并提取液, 蒸干, 残渣加含 7% 硫酸的 45% 乙醇溶液 20 mL, 加热回流 1 h, 取出, 水浴蒸取乙醇, 加三氯甲烷提取两次, 每次 25 mL, 合并三氯甲烷液, 用水 50 mL 振摇洗涤, 弃去水洗液, 三氯甲烷液蒸干, 残渣加乙醇 2 mL, 分别作为健脾和胃颗粒供试品溶液和阴性样品溶液。再取党参对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。照文献^[4]薄层色谱法试验, 吸取上述四种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液^[7], 加热至斑点清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。见图 3。



1, 2, 3: 样品; 4: 党参对照药材; 5: 缺党参阴性对照

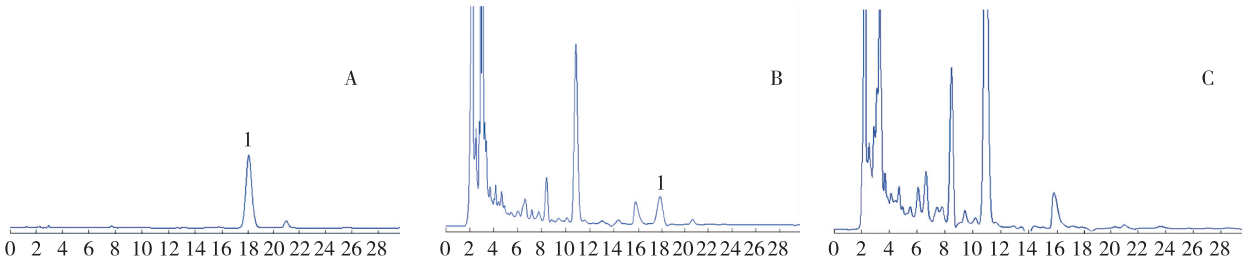
图 3 党参薄层色谱图

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Agilent eclipse plus C₁₈ 柱(4.6 \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-乙腈-1.67% 甲酸水溶液(27:9:64); 检测波长为 286 nm。柱温 25 $^{\circ}$ C; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。

3.2 溶液的配制 ①对照品溶液的制备: 精密称取丹酚酸 B 对照品 4.02 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加 75% 甲醇稀释至刻度, 摇匀即得。②供试品溶液的制备: 取健脾和胃颗粒粉末 2 g, 置于锥形瓶中, 加 75% 甲醇 20 mL, 称重, 超声 45 min, 放冷, 甲醇补足重量, 摇匀, 滤过, 取滤液即得。

3.3 专属性(空白对照试验) 按照上述色谱条件, 精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 测定丹酚酸 B 含量。结果显示, 对照品溶液中丹酚酸 B 的保留时间为



A:对照品; B:样品(批号:140721); C:阴性对照;1: 丹酚酸 B

图 2 专属性试验

18.0 min,健脾和胃颗粒样品溶液中丹酚酸 B 的保留时间为 17.8 min,阴性制剂供试品溶液在丹酚酸 B 对照品色谱的相应位置上无干扰。见图 2。

3.4 线性关系考察 精密吸取对照品储备溶液 1 mL,逐级稀释,摇匀。制得浓度分别为 389.94 μg/mL, 194. 97 μg/mL, 97. 485 μg/mL, 48.7425 μg/mL,24.3713 μg/mL,12.1856 μg/mL 的对照品溶液系列,各取 10 μL 进行测定,进行回归分析。横坐标:对照品浓度 X(μg/mL),纵坐标:峰面积 Y,回归方程为:

$Y=6.5459X-3.7811(r=0.9999,n=6)$

结果表明:丹酚酸 B 含量在 12. 1856 ~ 389.94 μg/mL范围内线性关系良好。

3.5 精密度实验 精密吸取丹酚酸 B 对照品溶液 10 μL,连续重复进样 6 次,记录峰面积,结果 RSD 为 0.47%。

3.6 稳定性试验 精密量取同一批号供试品溶液(批号:140922),分别于配制后 0、2、4、6、8 h 测定峰面积,丹酚酸 B RSD 为 0.86%(n=5)。结果表明,供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

3.7 重复性试验 取同一批号(批号:140721)的健脾和胃颗粒 6 份,按“3.2”项下方法制备供试品溶液,并进行色谱测定。结果样品中丹酚酸 B 的平均含量为 0.9552 mg/g,RSD 为 1.07%,表明此法重复性良好。

3.8 加样回收率试验 称取已知含量的同一批样品(批号:140721)约 0.5 g(9 份),精密称定,分别置量瓶中,于①②③号量瓶中各精密加入丹酚酸 B 对照品溶液 3 mL(每 mL 中含丹酚酸 B 0.2328 mg),④⑤⑥号量瓶中各精密加入 5 mL,⑦⑧⑨号量瓶中各精密加入 7 mL,按“3.2”项下供试品溶液的制备方法,依色谱条件测定,记录峰面积,结果见表 1。

3.9 样品含量测定 按“3.2”项下方法制备不同批号共 3 批健脾和胃颗粒供试品溶液,分别精密吸取供试品溶液 10 μL 进样,以峰面积计算样品中丹酚

酸 B 的含量,结果见表 2。

表 1 加样回收率试验结果

试验号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
1	0.9828	0.6984	1.6776	99.49		
2	1.0047	0.6984	1.6990	99.42		
3	1.0155	0.6984	1.7073	99.05		
4	1.0404	1.164	2.1953	99.25		
5	1.0320	1.164	2.1816	98.74	99.97	1.07
6	1.0367	1.164	2.1986	99.82		
7	1.0008	1.6296	2.6524	101.3		
8	0.9973	1.6296	2.6439	101.1		
9	0.9901	1.6296	2.6461	101.6		

表 2 丹酚酸 B 含量测定结果

样品批号	丹酚酸 B 含量 (mg/g)	平均丹酚酸 B 含量(mg/g)
140721	0.9516	
140919	0.7230	0.7941
141205	0.7078	

3.10 提取方法的选择 精密称定同一批号(140721)的样品 1.0 g 若干份,分别加入 10 mL 75% 甲醇进行回流至不同的时间及超声提取不同时间的试验,按照前法处理制备供试品溶液后测定。试验结果(表 3)表明:超声提取要比回流提取效率高,因此选择超声提取,且超声 45 min 时的提取效率最高。

表 3 提取方法的选择

提取方法	提取时间(min)	丹酚酸 B 含量(mg/g)
回流提取	30	2.492
	45	2.4412
	60	2.4411
超声提取	35	2.3841
	45	2.5272
	60	2.4171

4 讨 论

本试验中健脾和胃颗粒提取溶剂选用甲醇,因甲醇提取的效率最高^[8]。经试验证实超声提取要比回流提取效率高^[9],且超声 45 min 时的提取效率最高。本文参照《中国药典》2010 版一部骨碎补中丹酚酸 B 的含量测定方法,选择甲醇-乙腈-1.67%甲酸水溶液(27:9:64)作为流动相,目标峰与杂质峰分离效果亦较好。

【参考文献】

[1] 王 闰,孟 慧,许 勇.复方甘草软膏的制备及含量测定法的建立[J].东南国防医药,2015,17(4):389-391.
[2] 申 欣,查娅妮.风热感冒颗粒质量标准研究[J].中国药业,2008,17(9):25.

[3] 陈明霞,孙万晶,王筱亮.消瘰丸质量标准的研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(6):16.
[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,2010:29-30,70,264.
[5] 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):1658-1660.
[6] 廉 丽,袁 杰.健脾消食中红参、山楂、麦冬的薄层色谱法鉴别[J].中医药学刊,2003,21(12):2168.
[7] 王贤英.参芪颗粒中党参的薄层鉴别[J].重庆中草药,2009,6(1):8-9,13.
[8] 刘 梅,俞桂新,张 勉,等.超高效液相色谱法同时测定丹参药材中丹酚酸 B 和丹参酮ⅡA 的含量[J].中国中药杂志,2008,33(3):319-321.
[9] 王 华.HPLC 法测定丹参颗粒中丹酚酸 B 的含量[J].中国现代药物应用,2008,2(12):13-15.

(收稿日期:2015-07-20;修回日期:2015-09-17)

(本文编辑:徐燕茹; 英文编辑:王建东)

(上接第 578 页)

【参考文献】

[1] Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis [J]. Crit Care, 2009, 13(2): 210-219.
[2] 汪广剑,瞿发林,仲爱芳,等.产后抑郁症与雌激素受体 β 基因的多态性[J].东南国防医药,2013,15(2):177-178.
[3] 徐若男,陈 烁,刘宏滨,等.缓激肽 B2 受体基因多态性在膝骨关节炎发生和发展中的作用[J].东南国防医药,2013,15(4):361-364.
[4] Kadmiel M, Cidowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 2013, 34(9): 518-530.
[5] Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor[J]. Cell, 2011, 145(2):224-241.
[6] Uhlenhaut NH, Barish GD, Yu RT, et al. Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cistromes[J]. Mol Cell, 2013, 49(1): 158-171.
[7] 卫红齐,李泽卿,王秋萍.鼻-鼻窦黏膜中糖皮质激素受体的研究进展[J].医学研究生学报,2007,20(4):434-437.
[8] Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(1):144-151.
[9] Lin RC, Wang XL, Morris BJ. Association of coronary artery dis-

ease with glucocorticoid receptor N363S variant[J]. Hypertension, 2003, 41(3):404-407.
[10] Ukkola O, Rosmond R, Tremblay A, et al. Glucocorticoid receptor Bel I variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding[J]. Atherosclerosis, 2001, 157(1):221-224.
[11] van den Akker EL, Nouwen JL, et al. Staphylococcus aureus nasal carriage is associated with glucocorticoid receptor gene polymorphisms[J]. J Infect Dis, 2006, 194(6):814-818.
[12] van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(4):R159.
[13] Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, et al. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1179:179-198.
[14] Panek M, Pietras T, Fabijan A, et al. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on asthma phenotypes[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(2):572-580.
[15] Kostik MM, Klyushina AA, Moskalenko MV, et al. Glucocorticoid receptor gene polymorphism and juvenile idiopathic arthritis[J]. Pediatr Rheumatol Online J, 2011, 9(1):2.
[16] Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(4):285-298.

(收稿日期:2015-07-15;修回日期:2015-08-23)

(本文编辑:齐 名; 英文编辑:王建东)