

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.016

丹桃养肝丸质量标准研究*

张红¹, 孙婷婷¹, 刘洋¹, 薛敬冬², 李粉萍², 杨琳^{3△}

(1. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003; 2. 陕西省中医医院, 陕西 西安 710003; 3. 陕西省杨凌示范区医院药剂科, 陕西 咸阳 712100)

摘要:目的 建立医疗机构制剂丹桃养肝丸的质量标准。方法 采用薄层色谱法定性鉴别丹桃养肝丸中的丹参、当归、黄芪 3 味药材, 采用高效液相色谱法测定该制剂中丹酚酸 B 的含量。结果 丹参、当归、黄芪薄层鉴别方法重复性良好, 阴性对照无干扰; 丹酚酸 B 含量测定方法学考察中的加样回收率、精密度、稳定性、重复性均良好, 线性范围为 0.212~1.060 μg ($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 94.41%, RSD 为 1.64% ($n=9$)。结论 该方法可用于丹桃养肝丸的质量控制。

关键词:丹桃养肝丸; 丹酚酸 B; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)23-0060-04

Quality Standard of Dantao Yanggan Pills

ZHANG Hong¹, SUN Tingting¹, LIU Yang¹, XUE Jingdong², LI Fenping², YANG Lin³

(1. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710003; 2. Shaanxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710003; 3. Department of Pharmacy, Yangling Demonstration Zone Hospital, Xianyang, Shaanxi, China 712100)

Abstract: Objective To establish the quality control standard of Dantao Yanggan Pills. **Methods** The *Radix Salviae Miltiorrhizae*, *Radix Angelicae Sinensis*, *Radix Astragali* were qualitatively identified by the thin layer chromatography (TLC) method, and the content of salvianolic acid B in Dantao Yanggan Pills was determined by the high performance liquid chromatography (HPLC) method. **Results** The TLC identification methods of *Radix Salviae Miltiorrhizae*, *Radix Angelicae Sinensis*, *Radix Astragali* had good repeatability, and the negative control had no interference. The recovery, precision, stability and repeatability of the method for the content determination of salvianolic acid B were good. The linear range of salvianolic acid B was 0.212~1.060 μg ($r=0.999\ 8$), the average recovery was 94.41%, and the RSD was 1.64% ($n=9$). **Conclusion** The method can be used for the quality control of Dantao Yanggan Pills.

Key words: Dantao Yanggan Pills; salvianolic acid B; TLC; HPLC

肝纤维化是各种慢性肝炎发展为肝硬化前共有的可逆性病理组织学改变,若不给予有效的抗肝纤维化治疗。丹桃养肝丸是陕西省中医医院国家名老中医药专家、陕西省名中医成冬生主任医师治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的经验方。慢性乙型肝炎为正虚邪恋,正虚以气虚为主,进一步发展会出现血瘀等,气虚而血瘀,而肝体阴而用阳,主藏血。丹桃养肝丸依据以活血化瘀为本、益气养血柔肝兼重的防治肝纤维化理论基础,治疗慢性乙型肝炎肝纤维化,临床疗效显著,为科室诊疗常规方案。为扩大临床使用范围,使更多患者受益,拟将该方开发为医疗机构制剂。本研究中采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别该制剂中的丹参、当归、黄芪 3 味药材,采用高效液相色谱(HPLC)法对方中君药丹参的主要化学成分丹酚酸 B 进行了含量测定,为该产品的质量控制在提供客观的定性定量评价方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);

Secura125-1CN 型电子分析天平($d=0.01\text{ mg}$), Quintix244-1CN 型电子分析天平($d=0.1\text{ mg}$),均购自北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 试药

丹桃养肝丸(医院制剂,批号分别为 170801, 170802, 170803);黄芪甲苷对照品(供含量测定用,批号为 110781-201314),丹酚酸 B 对照品(供含量测定用,批号为 111562-201313),丹参对照药材(批号为 120923-201414),均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈(色谱纯, Fisher 公司);其他试剂均为分析纯,均购自国药集团;丹参、当归、黄芪药材购自陕西兴盛德药业有限责任公司,经陕西省中医药研究院中药研究所杨智峰研究员鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

丹参^[1]:取样品 2 g,粉碎成细粉,置锥形瓶中,加 2 滴盐酸和 20 mL 70% 甲醇,超声处理 15 min,离心取上清液,水浴蒸干,加甲醇 1 mL 溶解,制得供试品溶液。同法

*基金项目:陕西省科学技术厅创新药物研究中心项目[2017YWZX-02]。

第一作者:张红,女,博士研究生,研究员,研究方向为中药药效物质基础,(电话)029-85413228(电子信箱)zhanghong919919@163.com。

△通信作者:杨琳,女,大学本科,主管药师,主要从事医院药学工作,(电子信箱)584353223@qq.com。

制备缺丹参的阴性对照品溶液。取丹参对照药材 1 g 和丹酚酸 B 对照品, 同法制得对照药材溶液和对照品溶液(含丹酚酸 B 0.5 mg/mL)。分别吸取上述 4 种溶液点于同一聚酰胺薄膜上, 点样量为 2 μ L, 以丙酮-36% 乙酸-浓氨(10:25:2, V/V/V)为展开剂, 展开, 在紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中检出丹酚酸 B 及丹参, 阴性对照无干扰。见图 1 A。

当归^[2]: 取样品 3 g, 粉碎成细粉, 置锥形瓶中, 加 30 mL 乙醚, 超声提取 10 min, 滤过, 挥干乙醚, 加乙醇 1 mL 溶解, 制得供试品溶液。同法制备缺当归的阴性对照品溶液及对照药材溶液。分别取上述 3 种溶液各 10 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂, 展开, 在紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中检出当归, 阴性对照无干扰。见图 1 B。

黄芪^[3]: 取样品细粉 7 g, 置锥形瓶中, 加甲醇 50 mL, 回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 50 mL 溶解, 用水饱和的正丁醇提取, 提取液依次用 1% NaOH 溶液、水溶液洗涤 2 次, 蒸干, 加少量水溶解, 加 D101 型大孔树脂柱顶, 依次以 50 mL 水、30 mL 40% 乙醇洗脱杂质, 弃去, 最后以 50 mL 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 水浴蒸干, 加 1 mL 甲醇溶解, 制得供试品溶液。同法制备缺黄芪的阴性对照品溶液。取黄芪甲苷对照品适量, 加入甲醇, 得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-

甲醇-水(13:7:2, V/V/V)的下层溶液为展开剂, 展开, 用 10% 硫酸乙醇溶液显色, 105 $^{\circ}$ C 加热显色。供试品溶液色谱中检出黄芪甲苷, 阴性对照无干扰。见图 1 C。

2.2 丹酚酸 B 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: M05CLA25 Kromasil 100-5- C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(22:78, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 286 nm。理论板数按丹酚酸 B 峰计应大于 6 000。

2.2.2 溶液制备

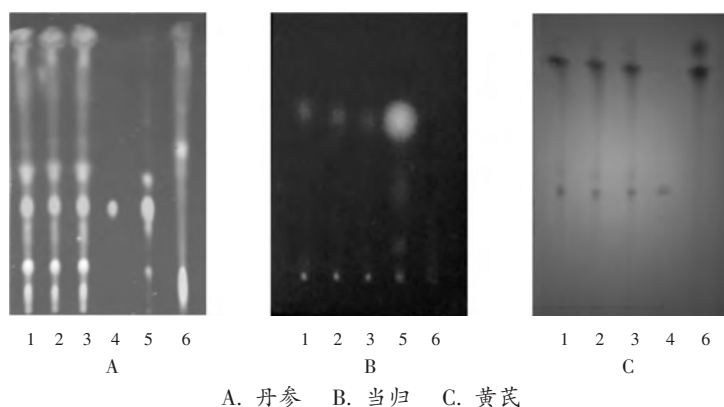
取样品细粉 0.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 50 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 用溶剂补足减失的质量, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液, 备用。

同法制备缺丹参的阴性对照品溶液^[4-5]。精密称取丹酚酸 B 10.6 mg, 溶于 10 mL 甲醇, 得质量浓度为 0.106 mg/mL 的对照品溶液, 避光保存。

2.2.3 方法学考察

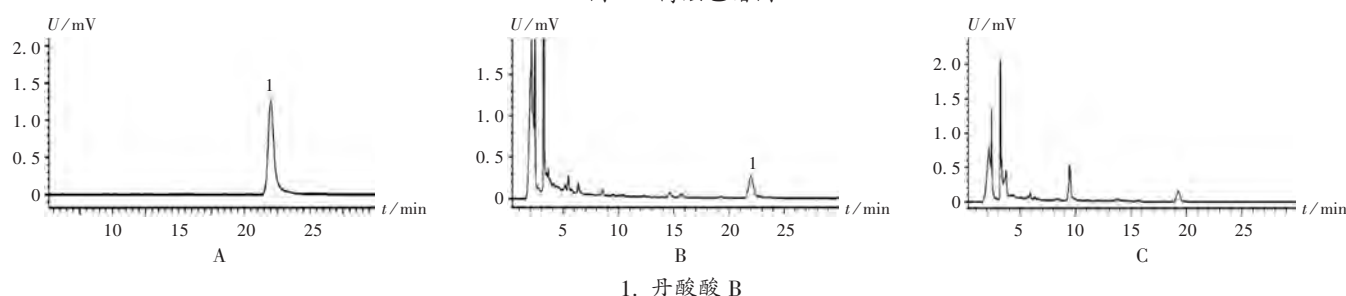
专属性试验: 取 2.2.2 项下 3 种溶液 10 μ L, 按拟订色谱条件检测。结果丹酚酸 B 色谱峰分离良好, 阴性对照无干扰, 色谱图见图 2。

线性关系考察: 精密量取丹酚酸 B 对照品溶液, 置容量瓶中, 用甲醇稀释, 得质量浓度为 0.005 3 mg/mL 的溶液, 精密吸取 2, 4, 6, 8, 10 μ L, 按拟订色谱条件进样测定, 以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X)为横坐标进行线



1-3. 供试品溶液(批号分别为 170801, 170802, 170803) 4. 对照品溶液 5. 对照药材溶液 6. 阴性对照品溶液

图 1 薄层色谱图



1. 丹酚酸 B A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 2 高效液相色谱图

性回归,得回归方程 $Y = 21\,838X - 21\,321$, $r = 0.9998$ 。结果表明,丹酚酸 B 进样量在 $0.212 \sim 1.060\ \mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取丹酚酸 B 对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$,按拟订色谱条件重复进样 6 次。结果丹酚酸 B 峰面积的 RSD 为 0.43% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取 2.2.2 项下供试品溶液 6 份,按拟订色谱条件进样测定。结果丹酚酸 B 含量的 RSD 为 1.91% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 170801),依法制备供试品溶液,取 $10\ \mu\text{L}$,于室温下测定 12 h 内的稳定性(每隔 2 h 测定 1 次)。结果丹酚酸 B 峰面积的 RSD 为 2.78% ($n=6$),表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

加样回收试验:取样品(含量为 $7.6049\ \text{mg/g}$) $0.5\ \text{g}$,共 9 份,分别加入质量浓度为 $0.524\ \text{mg/mL}$ 的丹酚酸 B 对照品溶液 $2,2,2,4,4,6,6,6\ \text{mL}$,制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 丹酚酸 B 加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
2.0959	1.0480	3.0739	93.32		
2.0951	1.0480	3.1167	97.48		
2.0933	1.0480	3.0712	93.31		
2.0974	2.0960	4.0856	94.86		
2.0967	2.0960	4.1130	96.20	94.41	1.64
2.0952	2.0960	4.0533	93.42		
2.0944	3.1440	5.0634	94.43		
2.0936	3.1440	5.0119	92.82		
2.0965	3.1440	5.0457	93.80		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 170801,170802,170803)样品适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果丹酚酸 B 含量分别为 $7.69, 7.79, 7.64\ \text{mg/g}$,平均含量为 $7.71\ \text{mg/g}$ 。

3 讨论

3.1 定性鉴别中对照品选择

丹参、当归和黄芪分别为方中君、臣、佐药。丹参活血化癥、养血止痛、凉血消肿,针对慢性乙型肝炎肝纤维化中医证候瘀血阻络之主证,为君药;当归补血、活血、止痛,主治血虚诸证,癥瘕积聚、虚寒腹痛等,加强君药活血化癥,养血柔肝之功效,为臣药;黄芪益气养血,治疗气血两虚之兼证,为佐药^[6]。丹参中主要有效成分为脂溶性的丹参酮类^[7]和水溶性的丹酚酸 B、丹参素等^[8]。当归药材中含有主要化学成分包括挥发性成分如藁本内酯、苯乙酮、十二醇、庚烷、烷烃等,其他如阿魏酸、维

生素类、尿嘧啶、腺嘌呤等^[9],其成分复杂,特征性成分不明显。黄芪主要有效成分以黄芪甲苷为代表^[10]。因此,以丹参及丹酚酸 B 为对照品鉴别丹参,以当归药材为对照鉴别当归,以黄芪甲苷为对照品鉴别黄芪。所建立的方法可从丹桃养肝丸样品中检出丹参及丹酚酸 B、当归、黄芪甲苷,阴性对照无干扰。

叶下珠为方中佐药,味苦、性寒,归肝经,清热利湿,解毒平肝,现代常用于慢性病毒性肝炎及肝纤维化的治疗^[11-12]。病毒性肝炎病因共识为湿热疫毒为患,本方取其寒凉清利之性,直清肝经湿热,针对慢性乙型肝炎湿热内蕴而设。叶下珠药材中含有没食子酸、甲氧基鞣花酸、柯里拉京等多种化学成分^[13]。以叶下珠药材为对照鉴别叶下珠,采用 50% 甲醇为提取溶剂,超声提取,再用乙酸乙酯提取制备样品溶液。曾选择硅胶 G 薄层板,甲苯-三氯甲烷-丙酮-甲酸($8:5:7:2, V/V/V/V$)为展开剂;硅胶 G 薄层板,冰醋酸-乙醇-乙酸乙酯-甲酸($8:6:2:0.5, V/V/V/V$)为展开剂;硅胶 GF₂₅₄ 薄层板,三氯甲烷-甲酸乙酯-甲酸($3:5:1, V/V/V$)为展开剂。结果或分离效果较差,或阴性对照有干扰,故未能建立叶下珠的薄层鉴别方法。

3.2 色谱条件选择

丹参在本方中不仅发挥活血化癥、破癥除瘕之功效,且有益气养血、清除邪热之长,可针对肝纤维化血瘀兼气血两虚之病机关键。因此,采用 HPLC 法建立其含量测定方法。丹酚酸 B 为丹参主要有效成分,抗肝纤维化效果明显。丹酚酸 B 检测波长参考 2015 年版《中国药典(一部)》中丹参项下所用波长,流动相采用乙腈与 0.1% 磷酸溶液,对其流动相比比例进行反复调整,以拖尾因子、分离度、理论板数、基线作为评判标准,最终选取流动相为乙腈- 0.1% 磷酸溶液($22:78, V/V$)。经方法学考察,该方法可用于丹桃养肝丸的质量控制。

参考文献:

- [1] 翁燕,陆超,蔡云珊,等. 益气活血颗粒质量标准研究[J]. 中国现代中药,2017,19(11):1625-1630.
- [2] 曹珊珊,王婧雯,杨志福,等. 维耳康片质量标准的提高[J]. 中国药师,2019,22(6):1154-1156.
- [3] 张春婷,邱智东,李博文,等. 滋益颗粒的工艺研究及质量标准的建立[J]. 吉林中医药,2020,40(2):259-262.
- [4] 范智毅,周洪亮,姜誉弘,等. 补肾助孕颗粒特征图谱和含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志,2020,40(1):111-122.
- [5] 康江丽,吴雯. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对丹香清脂颗粒中 5 种有效成分含量的影响[J]. 中国药业,2019,28(20):17-20.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:57.
- [7] 郭龙,薛紫鲸,张丹,等. 丹参酮类成分治疗心脑血管疾病药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药,2019,15(2):190-192.