

## · 研究报告 ·

## 复方生化颗粒的定性鉴别和含量测定研究

陈 华,于波涛,金伟华,蒲志强,宋宗辉,范开华(成都军区总医院药剂科,四川 成都 610083)

**[摘要]** 目的 提高复方生化颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对方中的甘草、丹参进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法鉴别苦杏仁苷;采用 HPLC 法测定处方中的丹酚酸 B 含量,色谱柱为 Agilent HC-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸(23:77),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 286 nm,柱温为 30 ℃。结果 TLC 斑点清晰,分离度较好,专属性强,阴性对照无干扰;HPLC 法定性鉴别更加准确、可靠与客观;丹酚酸 B 在 1.56~49.92 μg/ml 范围内浓度与峰面积呈良好的线性关系( $r=0.9999$ ),平均回收率为 100.07%,RSD 为 1.61% ( $n=9$ )。结论 建立的方法准确、可靠,重复性好,可用于复方生化颗粒的质量控制。

**[关键词]** 复方生化颗粒;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;苦杏仁苷;丹酚酸 B

**[中图分类号]** R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)03-0252-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.014

## Qualitative identification and quantitative determination of Fufang Shenghua granules

CHEN Hua, YU Botao, JIN Weihua, PU Zhiqiang, SONG Zonghui, FAN Kaihua (Department of Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, China)

**[Abstract]** **Objective** To improve quality standard of Fufang Shenghua granules. **Methods** TLC was used to identify chief components in the preparation, Radix et Rhizoma Glycyrrhizae and Salvia Miltiorrhiza. HPLC was applied to identify Amargentin and to determine the content of Salvianolic acid B. Salvianolic acid B assay was performed on Agilent HC-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with Acetonitrile-0.1% phosphoric acid (23:77) as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was set at 286 nm. **Results** The spots on TLC were fairly clear with good separation. There was no interference from the negative control samples. However, HPLC was a more accurate, reliable and objective method for qualitative identification. Salvianolic acid B showed a good linear correlation in the range of 1.56~49.92 μg/ml ( $r=0.9999$ ). The average recovery was 100.07%, RSD 1.61% ( $n=9$ ). **Conclusion** A simple, accurate and reliable method was developed for the quality control of Fufang Shenghua granules.

**[Key words]** Fufang Shenghua granules; quality standard; TLC; HPLC; amargentin; salvianolic acid B

复方生化颗粒是由益母草、丹参、当归、血余炭等 10 味中药材经提取精制而成的医院制剂,批准文号为成制字(2011)F02003 号。具有活血化瘀、止血、抗感染、增强子宫收缩等作用,主要用于产后及各种流产手术后疑有胎盘或胎盘残留。经过多年的临床应用,已成为疗效确切的验方。为应对医院制剂发展要求,更好地控制该制剂质量,在原有标准的基础上修订新增了甘草、丹参的薄层鉴别,增加了

HPLC 法鉴别桃仁的指标成分苦杏仁苷,并采用 HPLC 法对方中的丹酚酸 B 进行含量测定。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** HP 1100 高效液相色谱仪[G1311A Quat Pump 泵,G1315A DAD 紫外检测器,Agilent HC-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm,5 μm)分析柱,美国 Agilent 公司];AB135-S 型精密电子天平(梅特勒-托利多仪器公司,精度:0.01 mg);AE-200S 型电子天平(梅特勒-托利多仪器公司,精度:0.1mg);VGT-1990QTD 型超声仪(苏州江东精密仪器有限公司);TGL-18G-C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DU730 型紫外分光光度计(美国贝克曼仪器公司);HHS11-Ni2 电热恒温水浴锅(北京长安

**[基金项目]** 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ18-2)

**[作者简介]** 陈 华,主管药师.研究方向:药物制剂.Tel:(028)86570428;Email:chhkf168668@sina.com

**[通讯作者]** 范开华,主任药师,硕士生导师.研究方向:医院药学.Tel:(028)86570425;Email:fankeyi@sohu.com

永创科学仪器有限公司);SZ-97型自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

**1.2 试药** 复方生化颗粒样品(成都军区总医院,规格:10 g/袋,批号:140910、140911、140912);甘草对照药材(批号:120904-201318)、丹参对照药材(批号:120923-201414)、苦杏仁苷对照品(批号:110820-201004,纯度:93.6%)、丹酚酸B对照品(批号:111562-201313,纯度:97.0%),均由中国食品药品检定研究院提供;阴性样品均为自制;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为三重蒸馏水;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 TLC鉴别

**2.1.1 甘草的TLC鉴别**<sup>[2,3]</sup> 取本品20 g,研细,加三氯甲烷50 ml,加热回流1 h,滤过,弃去三氯甲烷液,药渣挥干溶剂,加水10 ml搅拌湿润,加水饱和和正丁醇100 ml,超声处理30 min,滤过,取正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取甘草对照药材1 g和缺甘草阴性样品20 g,同法制成对照药材溶液和阴性对照溶液。参照2010年版《中国药典》一部中TLC法<sup>[1]</sup>,吸取对照药材溶液6  $\mu$ l、供试品和阴性对照溶液各10  $\mu$ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105  $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。结果,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,阴性对照无干扰。甘草色谱图见图1。

**2.1.2 丹参的TLC鉴别**<sup>[4,5]</sup> 取本品20 g,研细,加乙酸乙酯50 ml,回流30 min,弃去乙酸乙酯,残渣水浴锅上挥去乙酸乙酯,加无水乙醇30 ml,超声30 min,过滤,滤液蒸干,残渣加无水乙醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。取缺丹参阴性样品20 g,同法制成阴性对照溶液。取丹参对照药材1 g,加入75%甲醇30 ml,加热回流1 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml,作为对照药材溶液。参照2010年版《中国药典》一部中TLC法<sup>[1]</sup>,分别吸取对照药材、供试品、阴性对照溶液各10  $\mu$ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(8:6:1)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,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。丹参色谱图见图2。

**2.2 HPLC法鉴别苦杏仁苷**<sup>[6,7]</sup>

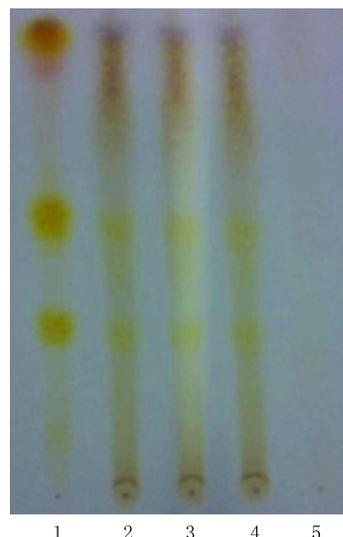


图1 甘草TLC图

1.甘草对照药材;2-4 供试品;5 阴性对照

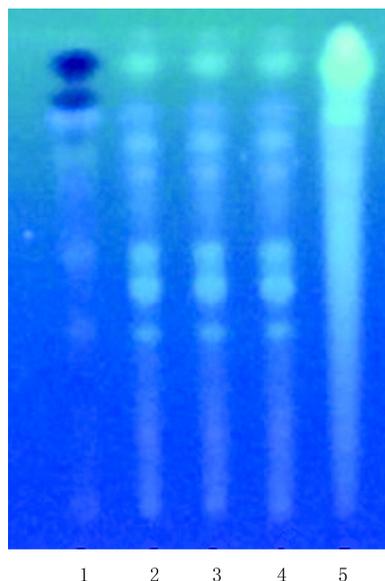


图2 丹参TLC图

1.丹参对照药材;2-4. 供试品;5. 阴性对照

**2.2.1 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱:Agilent HC-C<sub>18</sub>(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu$ m);流动相:甲醇-水(20:80);流速:1 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:34  $^{\circ}$ C;进样量:10  $\mu$ l;理论塔板数按苦杏仁苷峰计算应不低于3 000,分离度大于1.5。

**2.2.2 鉴别试验** 取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成200  $\mu$ g/ml的溶液,作为对照品溶液。取供试品约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 ml,称定重量,加热回流1 h,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,再用微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。另取缺桃仁阴性对照品,同法制得阴性对照溶液。分别精密吸取对照品、供试品、阴性对照

溶液各 10  $\mu\text{l}$ ,按“2.2.1”项方法测定,即得。结果显示,供试品溶液主峰的保留时间与对照品溶液主峰的保留时间一致,阴性对照无干扰。色谱图见图 3。

### 2.3 丹酚酸 B 的含量测定<sup>[8,9]</sup>

**2.3.1 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱:Agilent HC-C<sub>18</sub> (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈-0.1%磷酸(23:77);流速:1 ml/min;检测波长:286 nm;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:10  $\mu\text{l}$ ;理论塔板数按丹酚酸 B 峰计算应不低于 2 000,分离度大于 1.5。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取丹酚酸 B 对照品适量,精密称定,置棕色容量瓶中,加 75% 甲醇制成 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取供试品适量,研细,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 50 ml,密塞,称定重量,超声处理 30 min,放冷,称定重量,用 75% 甲醇补足减失的重量,摇匀,离心,滤过,取续滤液置棕色瓶中,即得。

**2.3.4 阴性对照溶液的制备** 取缺丹参的阴性样品适量,按“2.3.3”项方法制备阴性对照溶液,即得。

**2.3.5 专属性试验** 精密吸取上述对照品、供试品、阴性对照溶液各 10  $\mu\text{l}$ ,按“2.3.1”项方法测定,记录色谱图。结果显示,阴性对照溶液在与对照品溶液保留时间相同的位置上无色谱峰出现,表明阴性对照品对测定无干扰。色谱图见图 4。

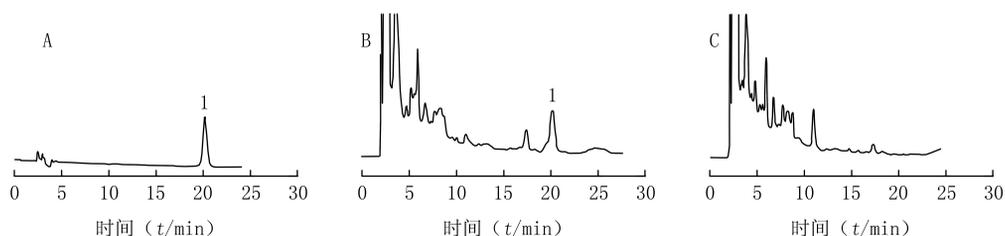


图 3 苦杏仁苷的 HPLC 图

A. 苦杏仁苷对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 苦杏仁苷

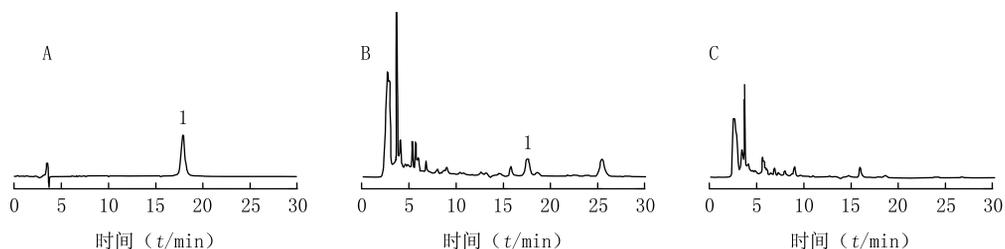


图 4 丹酚酸 B 的 HPLC 图

A. 丹酚酸 B 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 丹酚酸 B

**2.3.6 线性关系考察** 精密称取丹酚酸 B 对照品适量,加 75% 甲醇制成 62.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的对照品储备液。再分别精密量取适量对照品储备液,加 75% 甲醇制成每 1 ml 中含 1.56、3.12、6.24、12.48、24.96、49.92  $\mu\text{g}$  的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液各 10  $\mu\text{l}$ ,按“2.3.1”项方法测定,记录色谱图。以质量浓度( $x$ )为横坐标,峰面积积分值( $y$ )为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为: $y = 6.2748x + 0.5296$  ( $r = 0.9999$ ),结果表明丹酚酸 B 在 1.56~49.92  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内浓度与峰面积积分值呈良好的线性关系。

**2.3.7 精密度试验** 精密吸取“2.3.6”项下 24.96  $\mu\text{g}/\text{ml}$  丹酚酸 B 对照品溶液 10  $\mu\text{l}$ ,按 2.3.1 项方法测定,连续进样 6 次,记录峰面积。RSD 为 0.58% ( $n = 6$ ),结果表明仪器精密度良好。

**2.3.8 稳定性试验** 取同一批样品(批号:140910),按“2.3.3”项方法制备供试品溶液,在室温下放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h 各进样 1 次,按“2.3.1”项方法测定,记录峰面积。RSD 为 0.46% ( $n = 6$ ),结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.9 重复性试验** 分别取同一批号样品 6 份约 1 g (批号:140910),精密称定,按“2.3.3”项方法制备供试品溶液,进样 6 次,按“2.3.1”项方法测定,记录峰面积。RSD 为 1.70% ( $n = 6$ ),结果表明本方法重复性良好。

**2.3.10 加样回收率试验** 取 0.5 g 已知含量的样品 9 份(批号:140910),精密称定,按 3 份为一组,每组中分别按样品中丹酚酸 B 含量的 80%、100%、120% 精密加入对照品溶液,按照“2.3.3”项方法制

备供试品溶液,进样9次,按“2.3.1”项方法测定,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)

序号	取样量 (m/g)	样品含量 (m/mg)	加样量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.5012	0.802	0.640	1.442	100.01	100.47	2.34
2	0.5011	0.802	0.640	1.432	98.39		
3	0.5007	0.801	0.640	1.460	103.03		
4	0.5024	0.804	0.800	1.602	99.78	99.65	0.50
5	0.5001	0.800	0.800	1.601	100.08		
6	0.4998	0.799	0.800	1.592	99.11		
7	0.5017	0.803	0.960	1.757	99.35	100.09	2.02
8	0.4991	0.798	0.960	1.744	98.55		
9	0.5032	0.805	0.960	1.788	102.38		

2.3.11 样品含量测定 分别取不同批次供试品3份,每份约1g,精密称定,分别按“2.3.3”项方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项方法测定,记录峰面积,计算样品中丹酚酸B的含量,结果见表2。

表2 样品中丹酚酸B的含量

样品批号	丹酚酸B含量 (mg/袋)	平均含量 (mg/袋)
140910	15.43	
140911	14.96	15.43
140912	15.90	

### 3 讨论

复方生化颗粒原质量标准较低,仅对丹参和川芎2味药材进行了TLC鉴别,经多次验证,原TLC鉴别方法有重现性较差,斑点间分离度不好,色谱图不清晰等问题,原有质量标准、检测技术等许多方面已跟不上当前国家、军队对药品安全监管的要求。为确保人民群众与官兵用药安全,提高药品质量标准,全面推进医疗机构制剂规范化、标准化、科学化管理,根据军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题相关精神要求,并结合医院自身实际情况,严格遵循安全、有效、稳定、可控的原则组织实施对药品质量标准的提高。

复方生化颗粒药味较多、成分复杂,新质量标准先期的预试验中分别鉴别了蒲黄、炮姜、五灵脂、益母草,均因干扰较多而未获得理想色谱图。经参考多种方法最终完成的甘草、丹参的薄层鉴别,斑点清

晰,重现性好。桃仁为本组方中主要臣药,在对其进行TLC鉴别时未获得理想色谱图,经查阅资料与分析后,改为对桃仁进行HPLC鉴别,结果供试品溶液主峰的保留时间与苦杏仁苷对照品溶液主峰的保留时间一致,阴性对照无干扰,专属性强,重现性好。丹参与益母草均为本组方的君药,对益母草进行TLC与HPLC定性定量鉴别均未取得理想效果,两药相比,与丹参相关的对照品易于获得,查阅相关资料,多有可借鉴的测定方法。《中国药典》2010年版一部丹参含量测定项下有2个有效成分指标,丹参酮IIA和丹酚酸B,含量限度分别为0.2%和3.0%。根据文献资料报道,丹参酮IIA为脂溶性成分,丹酚酸B为水溶性成分;复方生化颗粒的制备工艺主要为水提,因此以丹酚酸B作为含量指标;摸索出丹酚酸B的色谱条件后,色谱图中阴性对照无干扰,目标峰分离度好。

本研究建立的复方生化颗粒TLC定性鉴别方法,特征斑点明显,分离度佳,阴性对照无干扰;HPLC定性鉴别方法专属性强,重现性好;建立的定量方法的精密度、重复性、稳定性均符合要求,故所建标准可用于复方生化颗粒的质量控制。

### 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:282.
- [2] 黄可婧,王丽娟.附子理中片的质量标准研究[J].天津药学,2014,26(5):16-20.
- [3] 高森,李正,王志涛,等.荡石胶囊定性定量方法研究[J].中南药学,2013,11(11):862-855.
- [4] 陈华,范开华,于波涛,等.胃病康颗粒的质量标准研究[J].药学服务与研究,2012,12(3):230-232.
- [5] 尹华,章建华,张春霞,等.芪参健骨颗粒的薄层鉴别研究[J].浙江中医药大学学报,2011,35(1):79-81.
- [6] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定麻杏口服液液中苦杏仁苷的含量[J].解放军药科学报,2013,29(1):57-59.
- [7] 刘学杰,车洪勇.通络祛瘀胶囊中苦杏仁苷的含量测定[J].中国医院药学杂志,2013,33(16):1370-1371.
- [8] 肖作奇,欧阳波,潘涛,等.高效液相色谱法测定盆炎灵合剂中的阿魏酸、延胡索乙素、芍药苷、丹酚酸B及原儿茶醛含量[J].中南药学,2014,12(12):1225-1228.
- [9] 谢琳,庄满贤,王亚琦,等.HPLC法同时测定养心宁神丸中丹参酮IIA和丹酚酸B的含量[J].广东药学院学报,2015,31(1):58-61.

【收稿日期】 2016-01-26 【修回日期】 2016-07-04  
【本文编辑】 顾文华