

软肝缩脾丸的质量标准研究

刘栋¹, 宋晓红^{1*}, 汤长明¹, 王丽军¹, 李明春², 程艳芹² (1.解放军第153中心医院制剂室, 郑州 450042; 2.解放军第401医院药剂科, 山东 青岛 266071)

摘要: 目的 建立并提升软肝缩脾丸的质量标准。方法 采用显微鉴别法、薄层色谱法对软肝缩脾丸中的黄芪、丹参、赤芍、鳖甲、大黄、五味子、桃仁、三七进行定性鉴别; 采用 HPLC 测定芍药苷、丹酚酸 B 的含量。色谱柱为 Wondasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230, 286 nm, 柱温: 30 ℃, 进样量: 10 μL。结果 4 味药材的显微特征明显; 5 味药材的薄层色谱斑点清晰, 分离度良好, 阴性无干扰; HPLC 显示芍药苷在 9.79~195.80 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$)、丹酚酸 B 在 11.45~229.00 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$) 内线性关系良好, 平均回收率分别为 100.6%, 101.9%, RSD 分别为 1.26%, 1.05%。结论 本方法简便、快捷、结果准确、重复性好, 可用于软肝缩脾丸的质量控制。

关键词: 软肝缩脾丸; 显微鉴别; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准; 芍药苷; 丹酚酸 B

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)04-0542-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.015

Study on Quality Standard for Ruangan Suopi Pill

LIU Dong¹, SONG Xiaohong^{1*}, TANG Changming¹, WANG Lijun¹, LI Mingchun², CHENG Yanqin²
(1. Department of Preparation, NO.153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China; 2. Department of Pharmacy, NO.401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish and improve the quality standard of Ruangan Suopi pill. **METHODS** Microscopic identification and TLC were conducted for the qualitative identification of Astragali Radix, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Paeoniae Radix Rubra, Trionycis Carapax, Rhei Radix et Rhizoma, Schisandrae Chinensis Fructus, Persicae Semen, Notoginseng Radix et Rhizoma in Ruangan Suopi pill; HPLC was performed to determine the contents of paeoniflorin and salvianolic acid B. It was performed on column of Wondasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile -0.1% phosphonic acid in linear gradient elution mode at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the UV detection wavelength of 230 nm and 286 nm, the column temperature of 30 ℃ and the volume of 10 μL. **RESULTS** The microscopic identification showed microscopic characteristics of four traditional Chinese medicines. TLC spots of the five traditional Chinese medicines were clear and well-separated without negative interference. The HPLC experiment results showed the good linearities in the range of 9.79~195.80 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$) for paeoniflorin, 11.45~229.00 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$) for salvianolic acid B, respectively. The average recovery rates of two compounds were 100.6%, 101.9%, and RSD were 1.26%, 1.05%. **CONCLUSION** The method is rapid, convenient, accurate, repeatable, and suitable for quality control of Ruangan Suopi pill.

KEY WORDS: Ruangan Suopi pill; microscopic identification; TLC; HPLC; quality standard; paeoniflorin; salvianolic acid B

软肝缩脾丸是解放军第一五三中心医院自主开发的中药复方制剂, 由黄芪、鳖甲、丹参、赤芍、桃仁、三七、大黄、五味子等 12 味药材加工制成, 具有益气活血破瘀, 软坚散结消痞之功效, 适用于各种病因引起的慢性肝炎、肝硬化或无临床症状病毒携带者^[1-4], 二十多年的临床应用显示其疗效确切, 口碑较好。但该制剂的质量标准制定年代久远, 仅有 3 味药材的薄层鉴别和丸剂常规检查, 缺乏含量测定项目, 不能全面控制制剂质量。按照中国人民解放军总后勤部卫生部“军队医疗

机构制剂标准提高计划”中制剂标准研究提高的总体要求, 结合软肝缩脾丸的处方和制备工艺, 对原质量标准中的丹参、赤芍薄层鉴别方法进行优化, 增加了黄芪、鳖甲、五味子、桃仁的显微鉴别, 以及大黄、三七、五味子 3 味药材专属性强的定性鉴别方法, 并在同一色谱条件下测定了活性成分芍药苷、丹酚酸 B 的含量。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-10A 型高效液相色谱仪 (SPD-10A 紫外检

基金项目: 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题重点项目(14ZJZ02)

作者简介: 刘栋, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0371)60653569 E-mail: liudong13673546650@163.com *通信作者: 宋晓红, 女, 副主任药师 Tel: (0371)60653567 E-mail: 153zjzx@371.net

测器, 手动进样器, LCsolutionLite 色谱工作站, 日本 Shimadzu 公司); BT125D 型 1/10 万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司); DM2500M 显微镜(德国 Leica 公司); pHs-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂); ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂); AS3120A 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(天津华北实验仪器有限公司); 800 型离心机(上海手术器械厂); 硅胶 G 薄层板、硅胶 H 薄层板、硅胶 GF254 薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试剂与药品

丹酚酸 B 对照品(批号: 111562-201313, 纯度: 97.0%)、芍药苷对照品(批号: 110736-201136, 纯度: 96.0%)、大黄酚对照品(批号: 110796-201319, 纯度: 99.6%)、大黄素对照品(批号: 110756-200110)、人参皂苷 Rb₁ 对照品(批号: 110704-201424, 纯度: 93.7%)、人参皂苷 Rg₁ 对照品(批号: 110703-201529, 纯度: 95.0%)、三七皂苷 R₁ 对照品(批号: 110745-201318, 纯度: 94.0%)、丹参对照药材(批号: 120923-201414)、赤芍对照药材(批号: 121093-201303)、大黄对照药材(批号: 120984-201202)、三七对照药材(批号: 120941-201409)、五味子对照药材(批号: 120922-201309)均购于中国食品药品检定研究院; 软肝缩脾丸(批号: 150316, 150419, 150420, 规格: 每瓶 48 g)和阴性样品均为解放军第一五三中心医院自制; 乙腈为色谱纯; 水为自制蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 鉴别^[5]

2.1.1 黄芪、鳖甲、五味子、桃仁的显微鉴别 取样品数丸, 除去包衣, 置乳钵中研成粉末, 过四号筛, 挑取过筛粉末适量, 按显微鉴别法(中国药典 2015 年版四部通则 2000)观察(目镜×10, 物镜×10): 纤维成束或散离, 壁厚, 表面有纵裂纹, 两端断裂成帚状或较平截(黄芪), 见图 1A; 不规则碎块淡灰黄色, 表面有裂隙或细纹理(鳖甲), 见图 1B; 种皮表皮石细胞淡黄色或淡黄棕色, 表面观类多角形, 壁较厚, 孔沟细密, 胞腔含暗棕色物(五味子), 见图 1C; 石细胞橙黄色, 贝壳形, 壁较厚, 较宽的一边纹孔明显(桃仁), 见图 1D。

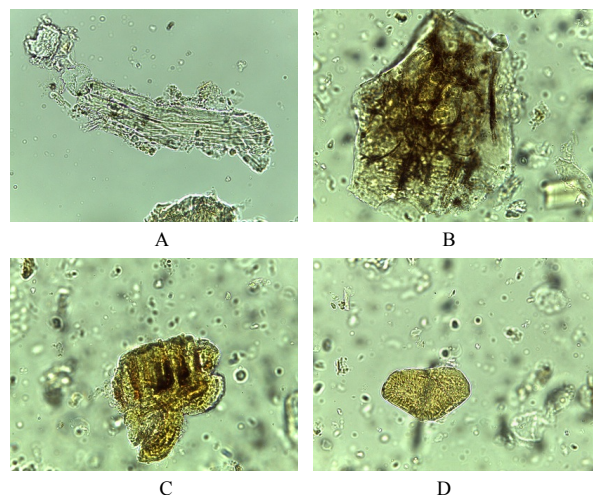


图 1 软肝缩脾丸的显微鉴别

A-黄芪; B-鳖甲; C-五味子; D-桃仁。

Fig. 1 Microscopic identification of Ruangan Suopi pill

A-Astragali Radix; B-Trionycis Carapax; C-Schisandrae Chinensis Fructus; D-Persicae Semen.

2.1.2 丹参的薄层色谱鉴别 取样品适量, 除去包衣, 研细, 取约 5 g, 加 70%乙醇 50 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸至近干, 残渣加水 20 mL, 微热使溶解, 离心, 取上清液, 用稀盐酸调 pH 值至 1~2, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取丹参对照药材 1 g, 加乙醇 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液浓缩至 1 mL, 作为对照药材溶液; 再取丹酚酸 B 对照品, 加乙醇制成 2 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液; 取缺丹参的阴性样品适量, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。按薄层色谱法(中国药典 2015 年版四部通则 0502)试验, 吸取上述溶液各 5 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(30~60 °C)-二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(2:3:4:0.5:2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 3%三氯化铁乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 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, 且阴性对照无干扰, 结果见图 2。

2.1.3 赤芍的薄层色谱鉴别 取样品适量, 除去包衣, 研细, 取约 6 g, 加水 30 mL, 超声处理 1 h, 离心, 取上清液, 用水饱和的正丁醇提取 2 次, 每次 30 mL, 弃去水层, 合并正丁醇液, 用正丁醇饱和的水洗涤 2 次, 每次 40 mL, 分取正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取赤芍对照药材 0.5 g, 同法操作制成对照药材

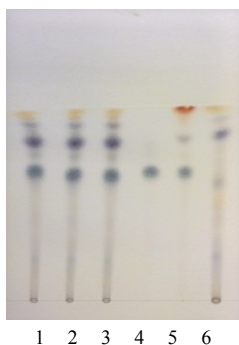


图2 丹参的薄层色谱图

1~3-样品; 4-丹酚酸 B 对照品; 5-丹参对照药材; 6-缺丹参阴性样品。

Fig. 2 TLC chromatogram of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma

1-3-sample; 4-reference substance of salvianolic acid B; 5-reference substance of Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; 6-negative sample without Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma.

溶液;再取芍药苷对照品,加甲醇制成 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液;取缺赤芍的阴性样品适量,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。按薄层色谱法(中国药典 2015 年版四部 通则 0502)试验,吸取上述溶液各 $10 \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(20:2.5:5:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5%香草醛硫酸溶液,在 105°C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,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,且阴性对照无干扰,结果见图 3。



图3 赤芍的薄层色谱图

1~3-样品; 4-芍药苷对照品; 5-赤芍对照药材; 6-缺赤芍阴性样品。

Fig. 3 TLC chromatogram of Paeoniae Radix Rubra

1-3-sample; 4-reference substance of paeoniflorin; 5-reference substance of Paeoniae Radix Rubra; 6-negative sample without Paeoniae Radix Rubra.

2.1.4 大黄的薄层色谱鉴别 取样品适量,除去包衣,研细,取约 1 g ,加甲醇 25 mL ,加热回流 30 min ,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液 20 mL ,超声处理 5 min ,然后加入二氯甲烷 40 mL ,加热回流 30 min ,放冷,置分液漏斗

中,分取二氯甲烷层,水层再用二氯甲烷 20 mL 振摇提取 1 次,合并二氯甲烷液,再用水 30 mL 洗涤 1 次,分取二氯甲烷液,蒸干,残渣加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)混合溶液 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;另取大黄对照药材 0.1 g ,同法操作制成对照药材溶液;再取大黄素对照品和大黄酚对照品,加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)混合溶液,分别制成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液;取缺大黄的阴性样品适量,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。按薄层色谱法(中国药典 2015 年版四部 通则 0502)试验,吸取上述溶液各 $5 \mu\text{L}$,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上,以石油醚(30~60 $^\circ\text{C}$)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;置氨蒸气中熏后,斑点变为红色,且阴性对照无干扰,见图 4。

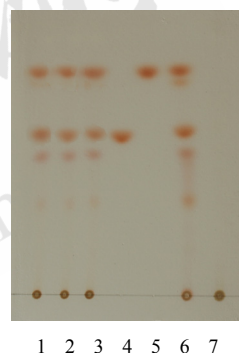


图4 大黄的薄层色谱图

1~3-样品; 4-大黄素对照品; 5-大黄酚对照品; 6-大黄对照药材; 7-缺大黄阴性样品。

Fig. 4 TLC chromatogram of Rhei Radix et Rhizoma

1-3-sample; 4-reference substance of emodin; 5-reference substance of chrysophanol; 6-reference substance of Rhei Radix et Rhizoma; 7-negative sample without Rhei Radix et Rhizoma.

2.1.5 三七的薄层色谱鉴别 取样品适量,除去包衣,研细,取约 6 g ,加乙酸乙酯 50 mL ,超声处理 30 min ,放冷,滤过,滤液弃去,滤渣挥干乙酸乙酯,加甲醇 50 mL ,加热回流 1 h ,放冷,滤过,滤液蒸干,加水 30 mL ,超声处理 5 min ,用乙酸乙酯提取 2 次,每次 40 mL ,弃去乙酸乙酯液,水液再用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次,每次 30 mL ,合并正丁醇液,然后用 1%氢氧化钠溶液洗涤 2 次,每次 40 mL ,正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 40 mL ,取正丁醇层,蒸干,残渣加甲醇

1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取三七对照药材 0.5 g, 加甲醇 30 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 加水 30 mL, 微热使溶解, 滤过, 滤液用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次, 同法制成对照药材溶液。再取人参皂苷 Rb_1 对照品、人参皂苷 Rg_1 对照品、三七皂苷 R_1 对照品, 加甲醇制成各含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 作为对照品溶液。按薄层色谱法(中国药典 2015 年版四部 通则 0502)试验, 吸取上述溶液各 $5 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105°C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 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, 且阴性对照无干扰, 见图 5。

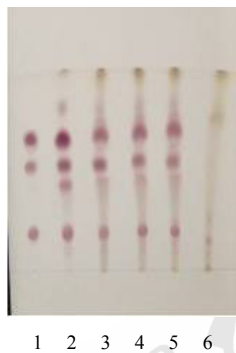


图 5 三七的薄层色谱图

1-混合对照品; 2-三七对照药材; 3-5-样品; 6-缺三七阴性样品。

Fig. 5 TLC chromatogram of Notoginseng Radix et Rhizoma
1-mixed reference substance; 2-reference substance of Notoginseng Radix et Rhizoma; 3-5-sample; 6-negative sample without Notoginseng Radix et Rhizoma.

2.1.6 五味子的薄层色谱鉴别 取样品适量, 除去包衣, 研细, 取约 8 g, 加 2% 氢氧化钾甲醇溶液 50 mL, 加热回流 1 h, 放至室温, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30 mL 使溶解, 二氯甲烷振摇提取 2 次, 每次 25 mL, 合并二氯甲烷液, 用铺有适量无水硫酸钠的滤纸滤过, 滤液蒸干, 残渣加二氯甲烷 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取五味子对照药材 1 g, 同法操作制成对照药材溶液。按薄层色谱法(中国药典 2015 年版四部通则 0502)试验, 吸取上述溶液各 $5 \mu\text{L}$, 分别点同一硅胶 GF254 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯(3:2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254 nm)下检视。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, 且阴性对照无干扰, 见图 6。

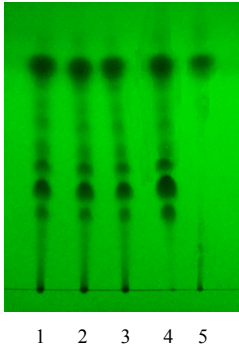


图 6 五味子的 TLC 色谱图

1~3-样品; 4-五味子对照药材; 5-缺五味子阴性样品。

Fig. 6 TLC chromatogram of Schisandrae Chinensis Fructus
1-3-sample; 4-reference substance of Schisandrae Chinensis Fructus;
5-negative sample without Schisandrae Chinensis Fructus.

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件和系统适用性试验 色谱柱:

Wondasil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 按表 1 进行梯度洗脱; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 230 nm(芍药苷); 286 nm(丹酚酸 B); 柱温: 30°C ; 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。理论板数按芍药苷、丹酚酸 B 峰计算 ≥ 2500 。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	检测波长/nm
0~12	18	82	230
12~16	18 $\rightarrow$ 30	82 $\rightarrow$ 70	286
16~27	30	70	286
27~31	30 $\rightarrow$ 18	70 $\rightarrow$ 82	230
31~34	18	82	230

2.2.2 溶液的制备 ①对照品溶液:

精密称取芍药苷对照品 9.79 mg 和丹酚酸 B 对照品 11.45 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加稀乙醇溶解并定容, 摇匀, 得到对照品储备液(每 1 mL 含芍药苷 0.979 mg、丹酚酸 B 1.145 mg)。精密吸取对照品储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(每 1 mL 含芍药苷 $97.90 \mu\text{g}$ 、丹酚酸 B $114.50 \mu\text{g}$)。②供试品溶液: 取样品适量, 除去包衣, 研细, 取 1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 再次称定质量, 用稀乙醇补足缺失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。③阴性样品溶液: 按软肝缩脾丸制备工艺, 分别制备缺赤芍和丹参的阴性样品。然后取 2 种阴性样品各 1 g, 按供试品溶液的制备方法, 分别制成缺赤芍的阴性样品

溶液 I 和缺丹参的阴性样品溶液 II。

2.2.3 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液 I 和阴性样品溶液 II 各 10 μL , 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果芍药苷和丹酚酸 B 的保留时间分别在 10.2 min 和 25.6 min 左右, 分离度良好($R>1.5$), 阴性对照 I、II 显示在芍药苷和丹酚酸 B 相应保留时间处无干扰。色谱图见图 7。

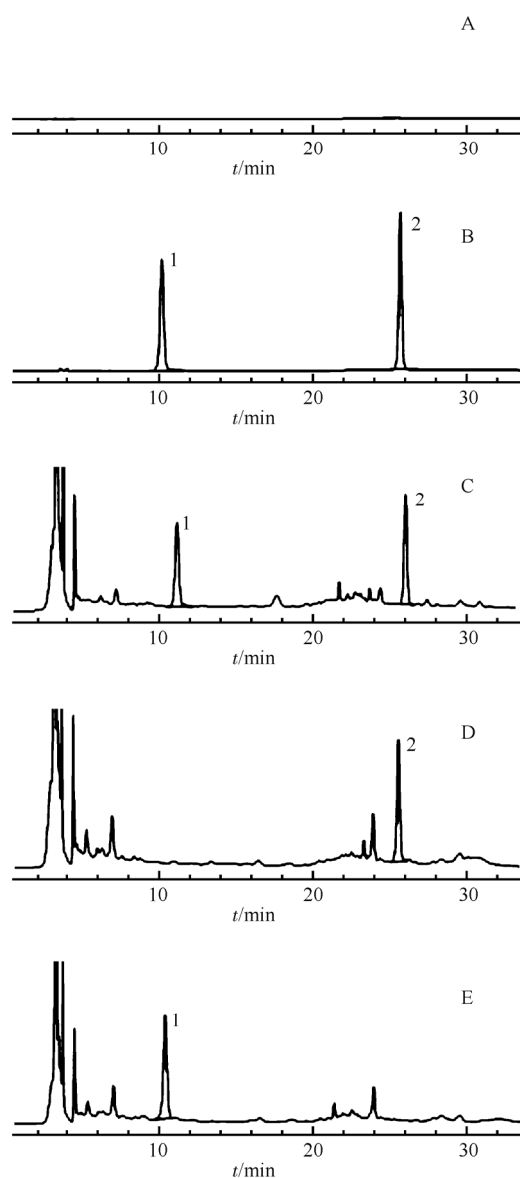


图 7 软肝缩脾丸的高效液相色谱图

A-空白溶剂; B-混合对照品; C-样品; D-缺赤芍阴性样品 I; E-缺丹参阴性样品 II; 1-芍药苷; 2-丹酚酸 B。

Fig. 7 HPLC chromatograms of Ruangan Suopi Pill

A-blank solution; B-mixed reference substances; C-sample; D-negative sample I without Paeoniae Radix Rubra; E-negative sample II without Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; 1-paeoniflorin; 2-salvianolic acid B.

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品储备液适量, 用稀乙醇稀释成一系列浓度。精密量取不同浓度的对照品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图及峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标, 进样浓度(X)为横坐标, 进行线性回归, 得芍药苷回归方程为: $Y=14\,927X-5\,914.1$, $r=0.999\,9$ ($n=6$); 丹酚酸 B 回归方程为: $Y=14\,616X-1\,282.6$, $r=0.999\,9$ ($n=6$)。结果表明, 芍药苷、丹酚酸 B 的进样浓度分别在 9.79~195.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、11.45~229.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 仪器精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液连续进样 6 次, 每次进样 10 μL , 测得芍药苷、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.26%, 0.72%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液(批号: 150420), 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 各进样 1 次, 按“2.2.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析。测得芍药苷、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.85%, 0.80%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取软肝缩脾丸(批号: 150420)适量, 除去包衣, 研细, 精密称取 6 份粉末, 每份 1 g, 按“2.2.2”项下方法, 平行制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析。结果显示, 芍药苷的含量为 2.882 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD=1.17%; 丹酚酸 B 的含量为 2.985 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD=1.14%。表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取软肝缩脾丸(批号: 150420)适量, 除去包衣, 研细, 精密称取 9 份粉末, 每份 0.5 g, 分别加入混合对照品溶液(每 1 mL 含芍药苷 0.551 6 mg 和丹酚酸 B 0.532 0 mg)2.0, 2.5, 3.0 mL, 每一浓度平行制备 3 份, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 测定含量, 并计算回收率。结果见表 2。

2.2.9 样品含量测定 取 3 批样品, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 结果见表 3。

从所测的结果可以看到, 3 批样品中的芍药苷和丹酚酸 B 的含量差别不大(RSD 分别为 3.80%, 3.12%), 特别是 150419 和 150420 2 个批次几乎没有差异, 应该是由于它们的原料是同一批次, 由此可见, 该制剂的制备工艺稳定, 含量测定方法可行。

表 2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests(n=9)

成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芍药苷	1.348 8	1.103 2	2.446 8	99.53	100.6	1.26
	1.330 3	1.103 2	2.418 9	98.67		
	1.361 2	1.103 2	2.455 6	99.21		
	1.380 5	1.379 0	2.772 8	100.97		
	1.378 2	1.379 0	2.761 8	100.34		
	1.403 2	1.379 0	2.812 9	102.22		
	1.422 6	1.654 8	3.108 9	101.91		
	1.423 4	1.654 8	3.108 1	101.81		
丹酚酸 B	1.412 8	1.654 8	3.076 8	100.56	101.9	1.05
	1.397 0	1.064 0	2.479 8	101.77		
	1.377 9	1.064 0	2.438 9	99.72		
	1.409 8	1.064 0	2.492 3	101.74		
	1.429 8	1.330 0	2.776 9	101.28		
	1.427 4	1.330 0	2.777 6	101.52		
	1.453 4	1.330 0	2.826 6	103.25		
	1.473 4	1.596 0	3.106 1	102.30		
	1.474 3	1.596 0	3.122 6	103.28		
	1.463 2	1.596 0	3.092 9	102.11		

表 3 样品含量测定结果(n=3)

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

批号	150316	150419	150420
芍药苷	2.698	2.885	2.882
丹酚酸 B	2.793	2.988	2.985

3 讨论

3.1 定性鉴别

软肝缩脾丸中黄芪、鳖甲、五味子、桃仁的显微特征明显且无其他药味干扰,其他药材的显微特征不明显或者相互间有干扰。

TLC 鉴别研究时,由于样品药味较多,所含成分复杂,因而在提取、富集、展开时要比原药材的鉴别复杂的多,同时还要考虑提取溶剂、展开剂的毒性和易燃易爆性。与药典中的方法相比,5 味药材的定性鉴别都有所改善。丹参的鉴别:丹参酮 IIA 分离效果较差,故单独鉴别丹酚酸 B,考虑其结构上有多个酚羟基,故将溶液调至酸性后再提取。赤芍的鉴别:乙醇或甲醇提取,干扰成分较多,考虑到芍药苷水溶性良好,因而采用水提取、正丁醇富集的方法,并将展开剂中的氯仿用二氯甲烷替换,降低展开剂的毒性^[6]。大黄的鉴

别:用硫酸溶液替代盐酸水解,有利于操作保护。三七的鉴别:提取液用 1%氢氧化钠洗涤,可以除去酸性干扰成分,有利于指标成分富集。五味子的鉴别:二氯甲烷或者乙酸乙酯直接提取时,干扰成分较多,斑点不清晰且分离度差;2%氢氧化钾甲醇溶液提取的浸膏,经水溶解,二氯甲烷提取时,酚类、酸类等干扰成分不被提取,有利于指标成分富集。

黄芪的薄层鉴别尝试过多种提取方法,包括使用中性氧化铝柱分离纯化,展开剂三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液、乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1)、二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸-水(1:6:2:2)的上层溶液均不能使黄芪甲苷和其他成分有效分离。鳖甲等 4 味动物药材的薄层鉴别缺乏相应标准,也未找到合适方法。桃仁、莪术按药典方法进行鉴别,斑点不清晰,且分离度差。

3.2 含量测定

赤芍清热凉血,散瘀止痛,对于肝脏疾病能改善肝脏微循环,促进受损肝细胞的恢复和再生^[7-9],其主要有效成分为芍药苷。丹参活血祛瘀,通经止痛,清心除烦,凉血消痈,具有抗肝纤维化、保肝护肝之功效,可用于肝炎、肝硬化等肝脏疾病^[10-13],其主要成分有丹参酮为代表的脂溶性成分和丹酚酸为代表的水溶性成分。经查阅相关文献,兼顾赤芍和丹参的有效成分,采用梯度洗脱法同时测定芍药苷和丹酚酸 B 含量,波长设定为各自的吸收最大吸收波长。

在流动相的考察方面,曾考察乙腈-磷酸二氢钾溶液^[14]、甲醇-磷酸溶液^[15]、乙腈-磷酸溶液^[16-17]体系,结果显示乙腈-0.1%磷酸溶液体系分离芍药苷、丹酚酸 B 效果最好。

在供试品溶液的制备方面,先后考察了提取溶剂(75%乙醇、50%甲醇、稀乙醇)、提取方式(超声、回流、浸泡过夜)、提取时间(0.5, 1, 1.5 h)、提取溶剂用量(15, 25, 40 mL)等因素对软肝缩脾丸中芍药苷、丹酚酸 B 提取量的影响。综合考虑提取量、操作难易以及资源节约等因素,最终确定供试品的制备方法:取样品 1 g,加稀乙醇 25 mL,超声处理 1 h。

综上所述,本研究在软肝缩脾丸原标准的基础上改善了丹参、赤芍的薄层鉴别方法,增加了黄芪、鳖甲、五味子、桃仁的显微鉴别和大黄、三七、五味子的 TLC 鉴别,以及芍药苷、丹酚酸

B 的含量测定,方法准确度高、专属性强、耐用性和重复性好,可用于软肝缩脾丸的质量控制。

REFERENCES

- [1] 申德林, 张成道, 王全楚, 等. 软肝缩脾丸治疗慢性肝纤维化的临床与实验研究[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(10): 1199-1200.
- [2] ZHANG C D, WANG Q C, SHEN D L, et al. The effects of lamivudine combined with RuanGan SuoPi Pellet on post-hepatitis cirrhosis and hepatocytes injuries [J]. Pract J Med Pharm(实用医药杂志), 2005, 22(11): 973-974.
- [3] 杜慧芳, 王全楚. 软肝缩脾丸治疗慢性肝病 120 例[J]. 河南中医, 2008, 28(7): 57-58.
- [4] WANG Q C, SHEN D L, ZHANG Y, et al. The anti-fibrosis effects of interferon and Ruangansuopiwan in treating severe hepatitis recovery patients [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol (胃肠病学和肝病学杂志), 2008, 17(9): 741-742.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2015: 23, 66, 277, 302, 384, 476, 1275, 1423, 1637.
- [6] ZHOU Y P, TAN X Z, MAO C Q, et al. Quality control method for Qizhu Yiqi Runchang Granules [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(3): 67-71.
- [7] LIAO Y Q. Clinical observation of a large dose of Radix Paeoniae Rubra on HBV-ACLF [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2014.
- [8] LU L, ZHANG M, WANG Y, et al. Screening and identifying of hepatoprotective compounds in Paeoniae Radix Rubra [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(5): 597-600.
- [9] 戚心广, 稻垣. 丹参赤芍对实验性肝损伤肝细胞保护作用的机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1991(2): 102-104.
- [10] HUANG S C, QU H B. Advances of stability of salvianolic acid B [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(5): 644-648.
- [11] YUAN Y, WU Q, SHI J S, et al. Advance in studies on hepatoprotective effect of *Salvia miltiorrhiza* and its main components [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(4): 588-593.
- [12] LIU H L, LV J, ZHAO Z M, et al. Inhibitory effect of water-soluble components from *Salvia miltiorrhiza* on liver sinusoid endothelial cell function and angiogenesis [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(6): 938-943.
- [13] YUAN C P, HOU H M, ZENG S. Metabolic stability of salvianolic acid B and dimethyl lithospermate B in human liver microsomes and metabolite identification [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(13): 1543-1549.
- [14] HUANG M Q, XIE Y L, WANG D H, et al. Simultaneous determination of paeoniflorin, salvianolic acid B and berberine in Fuyankang pills by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(22): 68-71.
- [15] TAN S J, LIU G, ZHANG H, et al. HPLC determination of salvianolic acid B and paeoniflorin in Kangshuanbaixin tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(7): 1104-1106.
- [16] YU L R, HE X Y, HUANG Y R. Simultaneous determination of paeoniflorin, salvianolic acid B and hydroxysafflor yellow A in Guanxinkang granules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(5): 561-564.
- [17] LIU J, TAN X Z, LU T L, et al. Simultaneous determination of six constituents in Wuqi Mingmu Oral Liquid by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Mater Med(中成药), 2014, 36(8): 1652-1656.

收稿日期: 2016-08-08

(本文责编: 曹粤锋)