doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.11.017

止血祛瘀明目片质量标准提升研究

姬于婷,贾丽华,张国跃△

(陕西省食品药品监督检验研究院,陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立止血祛瘀明目片的质量标准。**方法** 采用显微鉴别法鉴别方中的丹参和三七,采用薄层色谱(TLC)法鉴别方中的女贞子;采用高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B 含量,色谱柱为 Ultimate C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇－乙腈－甲酸－水(27∶9∶1∶63,*V*/*V*/*V*/*V*),流速为 1 mL/min,检测波长为 286 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 10 μL。**结果** 丹参和三七显微鉴别可见相应的特征组织和细胞;女贞子 TLC 特征斑点清晰,阴性对照无干扰。丹酚酸 B 进样量在 0.064 17～1.283 45 μg 范围内与峰面积线性关系良好(r=0.999 5);加样回收率为 97.28%,*RSD* 为 1.99%(n=6)。**结论** 该方法简便可靠、准确度高,所拟订质量标准基本可行,可有效控制止血祛瘀明目片的产品质量。

关键词:止血祛瘀明目片;显微鉴别;薄层色谱法;高效液相色谱法;女贞子;特女贞苷;丹参;三七;丹酚酸 B;质量标准

中图分类号:R932;R284.1　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1006－4931(2021)11－0059－04

Improvement of Quality Standard of Zhixue Quyu Mingmu Tablets

JI Yuting, JIA Lihua, ZHANG Guoyue

(*Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065*)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Zhixue Quyu Mingmu Tablets. **Methods** Microscopic identification method was adopted to identify *Radix Salviae Miltiorrhizae* and *Radix Notoginseng*. Thin－layer chromatography(TLC) method was used to identify *Fructus Ligustri lucidi*. High－performance liquid chromatography(HPLC) method was used to determine the content of salvianolic acid B in Zhixue Quyu Mingmu Tablets, the chromatographic column was Ultimate C_{18} column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol－acetonitrile－formic－acid－water(27∶9∶1∶63, *V*/*V*/*V*/*V*), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 286 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The corresponding characteristic tissues and cells of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* were found in the microscopic identification. The TLC characteristic spots of *Fructus Ligustri lucidi* were clearly, and the negative sample had no interference. The linear range of salvianolic acid B was 0.064 17－1.283 45 μg(r=0.999 5). The average recovery of salvianolic acid B was 97.28% with *RSD* of 1.99%(n=6). **Conclusion** The methods are simple and reliable. The established quality standard method is feasible and can be used for the quality control of Zhixue Quyu Mingmu Tablets.

Key words: Zhixue Quyu Mingmu Tablets; microscopic identification; TLC; HPLC; *Fructus Ligustri lucidi*; specnuezhenide; *Salvia miltiorrhiza*; *Panax Notoginseng*; salvianolic acid B; quality standard

止血祛瘀明目片是由丹参、地黄、三七、大黄、黄芩、女贞子等药味经加工制成的片剂,具有化瘀止血、滋阴清肝、明目的功效,主要用于阴虚肝旺、热伤络脉所致的眼底出血等症。本研究中对止血祛瘀明目片的现行质量标准 WS－10258(ZD－0258)－2002－2012Z 中的鉴别、含量测定等项目进行验证,并建立了鉴别女贞子中特女贞苷的薄层色谱(TLC)法、测定丹参中丹酚酸 B 含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LG－20AD 型高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器,日本岛津公司);Waters e2695/2487 型高效液相色谱仪(配有 2487 型紫外检测器和 Empower 工作站,美国 Waters 公司);SartoriusAGME235S 型电子分析天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);KQ－500DE 型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz);BX41 型显微镜与 CCD 成像系统(日本奥林巴斯公司);自制薄层板薄层色谱硅胶 G(青岛海海洋化工有限公司);薄层硅胶 G 预制板(德国 Merck 公司,批号为 HX124891;青岛海洋化工厂分厂,批号为 20120320)。

1.2　试药

止血祛瘀明目片(批号分别为 131201,131202,130903),不含女贞子、丹参的阴性样品,均由厂家制备并提供。特女贞苷对照品(批号为 111926－201203,含量为 100%),丹酚酸 B 对照品(批号为 111562－200908,含量为 100%),均购于中国食品药品检定研究院;试验用水分别采用纯化水和超纯水;乙腈、甲醇为色

第一作者:姬于婷,女,大学本科,初级药师,研究方向为药品标准,(电子信箱)363586040@qq.com。

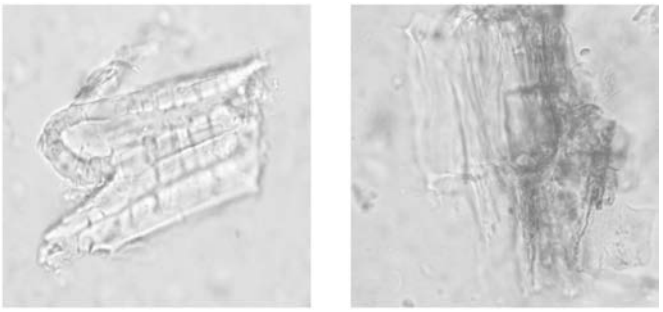
△**通信作者:**张国跃,男,大学本科,副主任药师,研究方向为中药检验与质量标准,(电话)029－62288434。

谱纯，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参和三七的显微鉴别

本研究中采用显微鉴别丹参和三七，结果可见相应的特征组织和细胞。详见图1。



A B

A. 丹参中的石细胞 B. 三七中的树脂道

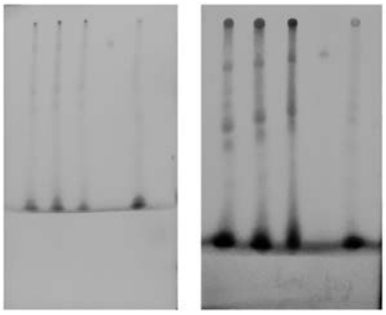
图1 显微鉴别特征图(10×40)

A. Sclerotic cells in *Salvia miltiorrhiza* B. Resin channels in *Panax notoginseng*

Fig. 1 Microscopic identification characteristics(10×40)

2.2 女贞子的TLC鉴别

取样品20片，剥去包衣，研磨成细粉，加入甲醇30 mL，超声处理30 min(功率为500 W，频率为40 kHz)，滤过，滤液浓缩至2 mL，加入中性氧化铝3 g，拌匀，置水浴上蒸干，研细，加在中性氧化铝柱(100～200目，规格为2 g，内径为1～1.5 cm)上，用甲醇5 mL洗脱，收集洗脱液，作为供试品溶液。取不含女贞子的阴性样品，同法制成阴性对照药材溶液。另取特女贞苷对照品适量，精密称定，并加甲醇适量，制成每1 mL含2 mg的溶液，即得对照品溶液。照TLC法试验，吸取上述3种溶液各5 μL，点于同一硅胶GF_{254}薄层板上，以乙酸乙酯－甲醇－水(20∶2∶1，*V*/*V*/*V*)为展开剂，展开，取出，晾干，在紫外光灯(254 nm)下检视。供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色的荧光淬灭斑点，阴性对照品溶液无干扰，斑点分离度符合要求，方法可行。详见图2。



1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

A B

1－3. 供试品溶液 4. 对照品溶液 5. 阴性对照药材溶液

A. 预制板(室温为18 ℃，相对湿度为48%) B. 自制版(室温为21 ℃，相对湿度为56%)

图2 女贞子的薄层色谱图

1－3. Test solution 4. Reference solution 5. Negative reference medicinal materials solution

A. Precast board(the room temperature is 18 ℃ and the relative humidity is 48%) B. Self－made board(the room temperature is 21 ℃ and the relative humidity is 56%)

Fig. 2 TLC chromatograms of *Fructus Ligustri lucidi*

2.3 HPLC法测定丹酚酸B的含量

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Ultimate C_{18}柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇－乙腈－甲酸－水(27∶9∶1∶63，*V*/*V*/*V*/*V*)；流速：1 mL/min；检测波长：286 nm；柱温：35 ℃；进样量：10 μL。理论板数按丹酚酸B峰计应不低于4 000。

2.3.2 溶液制备

取丹酚酸B对照品适量，精密称定，用75%甲醇制成每1 mL含50 μg的溶液，即得对照品溶液。取样品20片，剥去包衣研磨成细粉，再取0.2 g，精密称定，放入锥形玻璃瓶中，精密加入75%甲醇50 mL，称定质量，水浴加热回流1 h，取出，放冷，再称定质量，用75%甲醇补足减失的质量，摇匀，取续滤液，作为供试品溶液。取不含丹酚酸B的阴性样品，同法制备阴性对照品溶液。

2.3.3 测定波长确定

取丹酚酸B对照品溶液(质量浓度为10 μg/mL)，在200～400 nm波长范围扫描紫外光谱图，结果在285.6 nm波长处有最大吸收。参考2015年版《中国药典(一部)》丹参[1]项下内容，确定测定波长为286 nm。

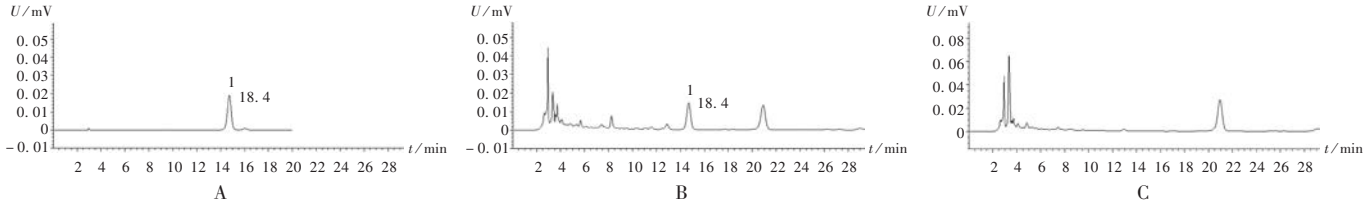
2.3.4 方法学考察

专属性试验：取不含丹参的阴性样品，依法制备丹参阴性对照品溶液，取2.3.2项下对照品溶液和供试品溶液各10 μL，进样测定。结果显示，阴性对照无干扰，专属性强。详见图3。

线性关系考察：分别精密吸取丹酚酸B对照品溶液(质量浓度为64.172 5 μg/mL)1，2，5，10，15，20 μL，按2.3.1项下色谱条件进样测定，以进样量(*X*，μg)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 $Y=69\,650X-644.9$，$r=0.999\,5$($n=6$)。结果表明，丹酚酸B进样量在0.064 17～1.283 45 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：取同一对照品溶液(质量浓度为64.172 5 μg/mL)，重复进样、测定。结果峰面积的*RSD*为0.16%($n=7$)，表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一批(批号为130903)样品6份，精密称定，依法制备供试品溶液，进样测定。结果样品中丹酚酸B平均含量为10.620 6 mg/g，*RSD*为0.64%($n=6$)，表明方法重复性良好。



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 3 专属性试验高效液相色谱图

1. salvianolic acid B

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

图 3 HPLC chromatograms of the specificity test

中间精密度试验:取同一批(批号为 130903)样品按重复性试验方法测定含量。结果丹酚酸 B 含量的 *RSD*% 为 1.69%($n=6$),结果较满意。

稳定性试验:取同一批(批号为 130903)样品 0.2062 g,依法制备供试品溶液,分别于 0,2,3,5,9,12,21 h 时进样测定。结果峰面积的 *RSD* 为 1.23%($n=7$),表明供试品溶液在 21 h 内稳定。

加样回收试验:取同一批(批号为 130903)样品 0.1 g,精密称定,共 6 份,加入质量浓度为 0.942 8 mg/mL 的丹酚酸 B 对照品溶液 1 mL,依法制备供试品溶液,进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 丹酚酸 B 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test of salvianolic acid B($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
0.100 5	1.067 4	0.942 8	1.987 3	97.57	97.28	1.99
0.103 8	1.102 4	0.942 8	2.050 6	100.57		
0.096 8	1.028 1	0.942 8	1.947 0	97.46		
0.096 5	1.024 9	0.942 8	1.943 6	97.44		
0.100 0	1.062 1	0.942 8	1.958 2	95.05		
0.100 4	1.066 3	0.942 8	1.967 7	95.61		

2.3.5 PDA 光谱扫描与峰纯度检测

取供试品溶液与丹酚酸 B 对照品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,使用二极管阵列检测器进行 PDA 光谱扫描,选定 200~400 nm 波长范围的 PDA 光谱进行比较。结果供试品溶液色谱图中呈现与丹酚酸 B 对照品溶液色谱峰保留时间相同的色谱峰,且色谱峰的特征相同;同时采用 Waters Empower 工作站处理数据,结果样品的峰纯度符合要求。

2.3.6 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定丹酚酸 B 的含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Content determination of salvianolic acid B in the samples($n=3$)

批号	丹酚酸 B 含量(mg/g)	*RSD*(%)
131201	14.84	0.35
131202	14.76	1.94
130903	10.62	0.64

3 讨论

女贞子 TLC 鉴别中,曾将样品经超声处理 30 min 后滤过,滤液浓缩至 2 mL,直接点样,干扰的斑点较多,故增加用中性氧化铝柱除杂的步骤。翟少钦等[2]采用乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水系统作为展开剂,用 1% 香草醛硫酸乙醇溶液显色,发现样品有斑点扩散现象,并有其他斑点干扰,改用拟订方法后效果较满意。丹酚酸 B 的含量测定比较了乙醇和甲醇作为提取溶剂制备供试品溶液,结果用乙醇提取后的溶液,丹酚酸 B 含量低于甲醇;又比较了不同体积分数的甲醇,发现用低体积分数的甲醇作为溶剂,丹酚酸 B 含量虽稍高一些,但杂峰较多,尤其是在目标峰附近有干扰峰,故选择 75% 甲醇作为提取溶剂;考察用不同的提取时间处理样品,结果发现处理时间超过 1 h,丹酚酸 B 的含量并未明显升高。

女贞子的现代药理学研究[3-7]显示,其含有多种具有生理活性的有机酸,如齐墩果酸、油酸、棕榈酸、亚麻酸,还含有 *D*-甘露醇、黄酮类、氨基酸、糖类等化合物。女贞子提取物中的还原性铁离子能清除自由基及抑制 α-葡萄糖苷酶,具有抗氧化、降糖、调脂作用。女贞子素有滋补肝肾、明目乌发的功效,采用 TLC 法对女贞子进行定性鉴别具有实际意义。

丹参活血化瘀,药理作用广泛[8-9],其化学成分可分为两类:脂溶性成分主要是以丹参酮型二萜为主的二萜类,如丹参酮 ⅡA 等;水溶性成分主要是以酚酸为主,如丹酚酸 B。此外,丹参还含有黄酮、甾体、三萜等成分。本研究中测定的丹酚酸 B 是丹参药材中生物活性很强且含量最高的水溶性化合物,可以抗血小板黏附和聚集,具有抗氧化、清除氧自由基、保护缺血性神经损伤和抗炎等重要作用。原质量标准中只收载了丹参酮 ⅡA 的含量测定方法,未控制酚酸类水溶性成分。本研究中旨