

· 论著 ·

新脑灵颗粒的质量标准研究

任新新^{1,2}, 王先友², 陆文铨¹, 朴淑娟¹, 高守红¹ (1. 第二军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003; 2. 河南大学药学院, 河南 开封 475000)

[摘要] 目的 建立新脑灵颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对该处方中的延胡索、白芷、厚朴、甘草、当归、川芎、五味子和菊花进行鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定丹酚酸B的含量,色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:0.5%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min, 24% B; 5~6 min, 24%~19% B; 6~25 min, 19%~20% B);流速:1.0 ml/min;柱温:25℃;检测波长:286 nm;进样量:10 μl。结果 TLC图中特征斑点清晰,专属性强。丹酚酸B在20~1 280 μg/ml范围内线性关系良好,其回归方程为 $Y=13.304 X-117.50$ ($r=0.9999$, $n=7$),平均回收率96.17% (RSD=1.10%)。结论 该方法简便可行、准确可靠、重复性好,可用于新脑灵颗粒的质量控制。

[关键词] 新脑灵颗粒;丹酚酸B;高效液相色谱;薄层色谱

[中图分类号] R93 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)04-0338-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.04.014

Study on quality control of Xinnaoling granules

REN Xinxin^{1,2}, WANG Xianyou², LU Wenquan¹, Piao Shujuan¹, GAO Shouhong¹ (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475000, China)

[Abstract] **Objective** To establish quality control of Xinnaoling granules. **Methods** Thin layer chromatography (TLC) methods were used to identify Rhizoma Corydalis, Radix Angelicae dahuricae, Cortex Magnoliae officinalis, Radix Glycyrrhizae, Rhizoma Ligusticum, Ligusticum wallichii, Schisandra Chinensis, Dendranthema morifolium. The concentration of salvianolic acid B was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The method employed a column of Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a mobile phase of 0.5% formic acid (A)-acetonitrile (B) at a temperature 25℃. The gradient elution program was as follow: 0~5 min 24% B, 5~6 min 24%~19% B, 6~25 min 19%~20% B. The flow rate was 1.0 ml/min, and the injection volume was 10 μl and the detection wavelength was 286 nm. **Results** The spots in TLC plates were clear and specific. As for salvianolic acid B, the linear range was 20-1 280 μg/ml and the equation of linear regression of salvianolic acid B was $Y=13.304 X-117.50$ ($r=0.9999$, $n=7$). The average recovery rate was 96.17% (RSD=1.10%). **Conclusion** The method was proved to be simple, reliable, reproducible, and could be used in the quality control of Xinnaoling granules.

[Key words] Xinnaoling granules; salvianolic acid B; HPLC; TLC

新脑灵颗粒为第二军医大学附属长征医院院内制剂[批准文号:南制字(2011)F51023],是由延胡索、丹参、白芷、当归、川芎、五味子、厚朴、菊花、甘草等十八味中药经水提醇沉的方法制备而成的复方制剂,具有破血逐瘀、行气止痛、宁心安神的功效,主要用于脑外伤综合征、脑血管病后遗症和神经官能症。为能更有效地控制该制剂的质量,保证临床用药安

全、有效,本研究在原质量标准基础上,重新修订薄层色谱(TLC)法鉴别延胡索、白芷、厚朴、甘草、川芎,同时增加 TLC 鉴别当归、五味子和菊花^[1];并采用高效液相色谱(HPLC)法测定丹酚酸B的含量^[2-7],以建立可靠、准确、专属性强的质量控制方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括 G1311A 输液泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1314B-VWD 紫外检测器、Chemstation 色谱工作站(美国 Agilent);台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf);十万分之一天平(德国 Sartorius);

[作者简介] 任新新,硕士研究生。Tel:13526455360;E-mail:13526455360@163.com

[通讯作者] 高守红,硕士,主管药师。研究方向:药物分析及临床药学。Tel:(021)60748763;E-mail:gaoshouhong@126.com

SK7200H型超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药 新脑灵颗粒(批号:130909、131223、150302),延胡索、白芷、厚朴、甘草、当归、川芎、五味子和菊花对照药材均由第二军医大学附属长征医院制剂室提供;丹酚酸B对照品(批号:115939-25-8,大连美仑生物技术有限公司),延胡索乙素对照品(批号:120928-201208,中国食品药品检定研究院),欧前胡素对照品(批号:110827-201109,中国药品生物制品鉴定所),厚朴酚对照品(批号:110729-200412,中国药品生物制品鉴定所),甘草苷对照品(批号:111610-201106,中国食品药品检定研究院),甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯试剂,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 TLC鉴别

2.1 延胡索 取本品粉末24g,研细后加热水100ml使其溶解,加适量浓氨水调溶液至碱性,超声30min后过滤,滤液用二氯甲烷萃取3次,每次50ml,将萃取液合并蒸干后的残渣用甲醇1ml溶解,得样品溶液。分别取延胡索对照药材1.5g和缺延胡索药材的阴性对照品,同法制得对照药材、阴性对照溶液。另取延胡索乙素标准品,加甲醇制得1mg/ml的标准品溶液。按照文献[1]所列方法,分别吸取上述4种溶液10 μ l,点于同一硅胶G板上,用展开剂正己烷-二氯甲烷-甲醇(8:4:1)展开,取出晾干后用碘化铯钾显色。样品色谱在与对照药材和标准品色谱相应位置显同一颜色斑点(图1A)。

2.2 白芷 样品溶液的制备同“2.1”项下方法。分别取白芷对照药材1.5g和缺白芷药材的阴性对照品,同法制得对照药材、阴性对照溶液。另取欧前胡素标准品,加甲醇制得1mg/ml的标准品溶液。按照文献[1]所列方法,分别吸取上述4种溶液10 μ l,点于同一硅胶GF₂₅₄板上,用展开剂正己烷-乙酸乙酯(4:1)展开,取出晾干后在365nm紫外线下检视。样品色谱在与对照药材和标准品色谱相应位置显同一颜色荧光斑点(图1B)。

2.3 厚朴 取本品粉末12g,研细后加热水50ml使其溶解,超声30min后过滤,滤液用乙酸乙酯萃取3次,每次30ml,将萃取液合并蒸干后的残渣用甲醇1ml溶解,得样品溶液。分别取厚朴对照药材1g和缺厚朴药材的阴性对照品,同法制得对照药材、阴性对照溶液。另取厚朴酚标准品,加甲醇制得1mg/ml的标准品溶液。按照文献[1]所列方法,分别吸取上述4种溶液10 μ l,点于同一硅胶GF₂₅₄板上,用展开剂石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯-冰醋酸

(8.5:1.5:0.2)展开,取出晾干后在254nm紫外线下检视。样品色谱在与对照药材和标准品色谱相应位置显同一颜色荧光斑点(图1C)。

2.4 甘草 取本品粉末10g,研细后加甲醇50ml超声30min,过滤,滤液蒸干后的残渣加水30ml使其溶解,用水饱和正丁醇萃取3次,每次30ml,将萃取液合并蒸干后的残渣用甲醇1ml溶解,得样品溶液。分别取甘草对照药材1.5g和缺甘草药材的阴性对照品,同法制得对照药材、阴性对照溶液。另取甘草苷标准品,加甲醇制得1mg/ml的标准品溶液。按照文献[1]所列方法,分别吸取上述4种溶液10 μ l,点于同一硅胶G板上,用展开剂正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5)的上清液展开,取出晾干后,喷以10%硫酸乙醇液,并在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。样品色谱在与对照药材和标准品色谱相应位置显同一颜色斑点(图1D)。

2.5 当归、川芎 样品溶液的制备同“2.3”项下方法。分别取当归和川芎对照药材各1.5g,及缺当归药材、川芎药材、当归和川芎2种药材的阴性对照品,同法制得上述对照药材、阴性对照溶液。按照文献[1]所列方法,分别吸取上述6种溶液10 μ l,点于同一硅胶GF₂₅₄板上,用展开剂正己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(4:1:1:0.1)展开,取出晾干后在254nm紫外线下检视。样品色谱在与对照药材色谱相应位置显同一颜色荧光斑点(图2E)。

2.6 五味子 样品溶液的制备同“2.3”项下方法。分别取五味子对照药材1g和缺五味子药材的阴性对照品,同法制得对照药材、阴性对照溶液。按照文献[1]所列方法,分别吸取上述3种溶液10 μ l,点于同一硅胶GF₂₅₄板上,用展开剂正己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(4:1:1:0.1)展开,取出晾干后在254nm紫外线下检视。样品色谱在与对照药材色谱相应位置显同一颜色荧光斑点(图3F)。

2.7 菊花 样品溶液的制备同“2.3”项下方法。另取菊花对照药材1.4g和缺菊花药材的阴性对照品,同法制得对照药材、阴性对照溶液。按照文献[1]所列方法,分别吸取上述3种溶液10 μ l,点于同一硅胶GF₂₅₄板上,用展开剂正己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(4:1:1:0.1)展开,取出晾干后在254nm紫外线下检视。样品色谱在与对照药材色谱相应位置显同一颜色荧光斑点(图3G)。

3 丹酚酸B的含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6mm \times 250mm,5 μ m);流动相:0.5%甲酸水溶

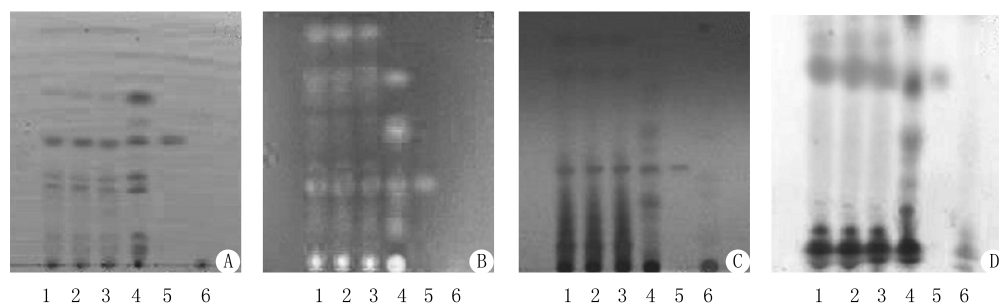


图1 延胡索、白芷、厚朴、甘草 TLC图

A.延胡索(1.批号:130909,2.批号:131223,3.批号:150302;4.延胡索对照药材;5.延胡索乙素对照品;6.缺延胡索的阴性对照);B.白芷(1.批号:130909,2.批号:131223,3.批号:150302;4.白芷对照药材;5.欧前胡素对照品;6.缺白芷的阴性对照);C.厚朴(1.批号:130909,2.批号:131223,3.批号:150302;4.厚朴对照药材;5.厚朴酚对照品;6.缺厚朴的阴性对照);D.甘草(1.批号:130909,2.批号:131223,3.批号:150302;4.甘草对照药材;5.甘草苷对照品;6.缺甘草的阴性对照)

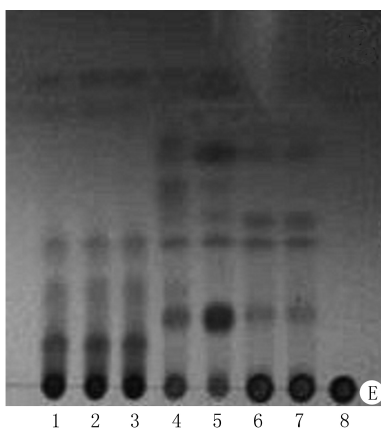


图2 当归、川芎 TLC图

E.当归、川芎(1.批号:130909,2.批号:131223,3.批号:150302;4.当归对照药材;5.川芎对照药材;6.缺当归的阴性对照;7.缺川芎的阴性对照;8.缺当归和川芎的阴性对照)

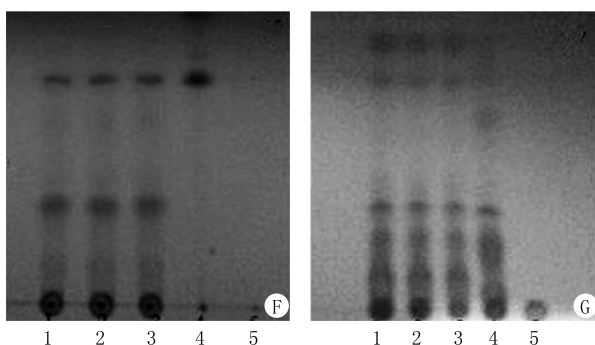


图3 五味子、菊花 TLC图

F.五味子(1.批号:130909,2.批号:131223,3.批号:150302;4.五味子对照药材;5.缺五味子的阴性对照);G.菊花(1.批号:130909,2.批号:131223,3.批号:150302;4.菊花对照药材;5.缺菊花的阴性对照)

速:1.0 ml/min;柱温:25℃;检测波长:286 nm;进样量:10 μl;运行时间:25 min。

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取丹酚酸 B 对照品 2.56 mg,用甲醇定容于 2 ml 容量瓶,摇匀,即得浓度为 1.28 mg/ml 的储备液,保存于一20℃冰箱。

3.2.2 供试品溶液 精密称取新脑灵颗粒粉末 10 g,用 20 ml 70% 甲醇溶解于 100 ml 锥形瓶中,密塞称重,超声 45 min,放冷,称重,用 70% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,以 5 000 r/min 高速离心 5 min,取上清液 10 ml,挥干溶剂,用 4 ml 纯水复溶,用乙酸乙酯萃取 2 次,每次 4 ml,合并萃取液,取乙酸乙酯液 4 ml,挥干溶剂,用 1 ml 70% 甲醇复溶,即得供试品溶液。

3.2.3 阴性对照溶液 按照“3.2.2”项下方法,按处方比例制备缺丹参的阴性对照溶液。

3.3 方法学考察

3.3.1 专属性考察 分别取丹酚酸 B 对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按已确定的色谱条件进样分析,记录色谱图(图 4)。丹酚酸 B 对照品色谱峰的保留时间为 19.9 min,理论塔板数 > 2 000,分离度 > 1.5,阴性对照溶液在相应位置无干扰。

3.3.2 线性关系考察 采用逐级稀释法,配制丹酚酸 B 浓度为 20、40、80、160、320、640、1 280 μg/ml 的系列标准工作液。按已确定的色谱条件进样分析,以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得标准曲线: $Y = 13.304 X - 117.50$, $r = 0.999 9$ 。结果表明,丹酚酸 B 在 20~1 280 μg/ml 范围内线性关系良好。

3.3.3 精密度试验 取浓度为 160 μg/ml 的丹酚酸

液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min,24% B;5~6 min,24%~19% B;6~25 min,19%~20% B);流

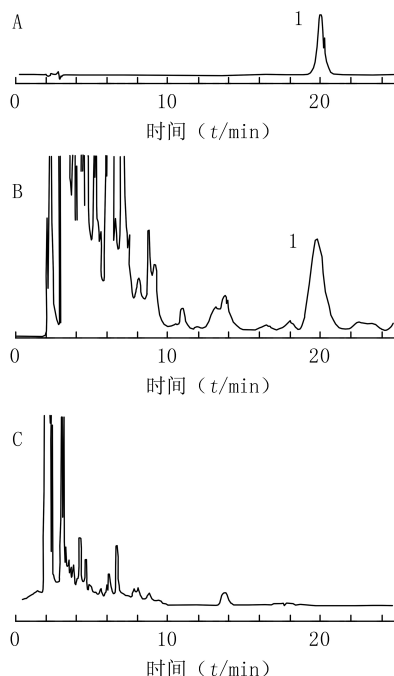


图4 新脑灵颗粒 HPLC 图

A. 丹酚酸 B 对照品; B. 新脑灵颗粒供试品;
C. 阴性对照; 1. 丹酚酸 B

B 标准工作液,按已确定的色谱条件,重复 6 次进样分析,计算峰面积 RSD 为 0.19%,表明该分析方法的精密度较好。

3.3.4 重复性试验 精密称取样品 10 g(批号:150302),按已确定的制备方法,平行制备 6 份供试品,按已确定的色谱条件进样分析,测定峰面积,计算含量 RSD 为 2.90%,表明重复性较好。

3.3.5 稳定性试验 精密称取样品 10 g(批号:150302),按“3.2.2”项下方法制备供试品,分别于 0、4、8、12、24、48 h 按已确定的色谱条件进样分析,计算峰面积 RSD 为 1.26%,表明样品在 48 h 内稳定性良好。

3.3.6 加样回收率试验 精密称取已知丹酚酸 B 含量的样品 10 g(批号:150302),共 6 份,精密加入一定量的丹酚酸 B 标准品,按已确定的制备方法处理样品,并按已确定的色谱条件测定含量,计算加样回收率,结果见表 1。

3.3.7 样品含量测定 取 3 批(批号:130909、131223、150302)新脑灵颗粒,按已确定的制备方法,每批平行制备 3 份供试品溶液,按已确定的色谱条件测定,计算丹酚酸 B 的含量,其平均含量分别为:0.079 4、0.083 7、0.102 9 mg/g。

4 讨论

4.1 TLC 鉴别 新脑灵颗粒方中同时含有当归和

表 1 丹酚酸 B 的加样回收率试验(n=6)

称样量 (m/g)	丹酚酸 B 含量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)
10.002 6	1.03	1.32	2.29	95.57	96.17	1.10
10.002 7	1.05	1.26	2.26	96.46		
10.003 2	1.06	1.24	2.24	95.05		
10.002 2	0.99	1.28	2.24	98.08		
10.002 3	1.01	1.36	2.32	96.16		
10.002 5	0.99	1.42	2.35	95.70		

川芎药材,而当归和川芎有效成分相近,原标准未进行当归的 TLC 鉴别,无法确定两者之间是否有干扰。故本研究将川芎和当归同时进行 TLC 鉴别。根据文献[1],所用展开剂为石油醚-乙酸乙酯-冰醋酸(15:5:0.1),发现展开时斑点之间距离较小。因此,本研究尝试采用正己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(4:1:1:0.1)作为展开剂,结果发现后者的展开效果较好,故选其作为展开剂。

4.2 提取方法的优化 中药复方制剂由多种中药材组成,经添加各种辅料制备而成。选择合适的提取条件,减少杂质干扰,是进行含量测定的前提。本研究最初尝试超声提取法,发现杂质干扰较大;后尝试文献[1]中的 75% 甲醇加热回流提取的方法,不仅杂质干扰较大,且含量较低。为达到较好的分析结果,最终采用“3.2.2”项下方法。在优化提取方法时,分别以水及 50%、70%、100% 甲醇超声提取样品,同时考察提取时间 30、45、60 min 对提取率的影响,并分别考察以二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醚作为萃取溶剂,结果显示,70% 甲醇超声提取 45 min,乙酸乙酯萃取 2 次,效果最好。因采用乙酸乙酯萃取液直接进样分析,色谱峰形严重拖尾,故挥干萃取液,分别以 30%、50%、70%、95% 甲醇进行复溶,结果显示,以 70% 甲醇复溶,分离度和峰形符合要求。

4.3 流动相的考察 流动相是影响化合物色谱行为的主要因素之一,本研究分别以甲醇-0.2% 甲酸水溶液、乙腈-0.2% 甲酸水溶液、乙腈-0.2% 醋酸水溶液和乙腈-0.5% 甲酸水溶液为流动相,考察在各种梯度洗脱条件下丹酚酸 B 的色谱行为,对其分离度、峰形、出峰时间进行综合比较,最终选择乙腈-0.5% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。

4.4 被测物的选择 选择丹酚酸 B 作为新脑灵颗粒含量测定的指标,是出于实验探索的结果。最初是以君药延胡索中延胡索乙素为含量测定指标,在探索色谱条件的过程中,测得延胡索乙素含量很低,故选择方中臣药丹参的主要成分为测定指标。在测定丹参酮 II A 时,发现含量极低,根据文献[5]报道,

丹参酮 II A 为脂溶性成分,丹酚酸 B 为水溶性成分,新脑灵颗粒主要采取水提醇沉的方法制备而成,因此,本研究以丹酚酸 B 作为含量测定指标。

本研究建立了 HPLC 测定新脑灵颗粒中丹酚酸 B 含量的方法,3 批样品的检测结果显示,不同批次间存在一定差异,主要与不同批次在生产过程中的损耗及丹参药材的质量差异有关,有必要应用本法对新脑灵颗粒中丹酚酸 B 进行含量检测,为制定新脑灵颗粒质量标准提供科学依据。

【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:附录 VI B.
- [2] Koon CM, Woo KS, Leung PC, et al. *Salviae Miltiorrhizae Radix* and *Puerariae Lobatae Radix* herbal formula mediates anti-atherosclerosis by modulating key atherogenic events both

in vascular smooth muscle cells and endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138 (1): 175-183.

- [3] Ren ZZ, Wang X, Wang SF, et al. Mechanism of action of salvianolic acid B by module-based network analysis [J]. *Bio-med Mater Engineer*, 2014, 23(1):S1385-S1392.
- [4] 王俊杰,刘弘,于天杰,等. HPLC 法同时测定精制冠心颗粒中芍药苷与丹酚酸 B 含量[J]. *中国药师*, 2013, 16 (8): 1175-1177.
- [5] 谢琳,庄满贤,王亚琦,等. HPLC 法同时测定养心宁神丸中丹参酮 II A 和丹酚酸 B 的含量[J]. *广东药学院学报*, 2015, 31 (1):58-61.
- [6] 李怀斌,王毅. 丹芍生脉胶囊中丹酚酸 B 与芍药苷的含量测定 [J]. *陕西中医*, 2013, 34 (8): 1059-1061.
- [7] 马慧萍,李兰茹,董志臣,等. HPLC 法测定安神益智胶囊中丹酚酸 B 的含量 [J]. *中国药师*, 2014, 17 (2):314-316.

[收稿日期] 2015-09-28 [修回日期] 2015-12-01

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 323 页)

散体使药物溶出加快,故 t_{max} 减小。固体分散体使得相对生物利用度提高的原因可能在于:①药物的非结晶存在状态和高度分散性,有利于药物快速溶出;②较快的溶出导致药物在胃肠道中的浓度较高,高浓度梯度有利于药物的扩散吸收^[10];③纳米尺寸及较大的表面积利于载药体系吸附在胃肠黏膜表面,并长时间滞留,利于促进药物吸收^[11,12];④药物浓度迅速升高,可能使代谢药物的酶饱和,从而使药物的降解比例降低。固体分散体与 SFN 微粉的 $t_{1/2}$ 和消除速率常数 (K_e) 没有明显差异,说明固体分散体未能改变药物的消除速率。

【参考文献】

- [1] Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24):11851-11858.
- [2] Furuse J. Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *Biologics*, 2008, 12 (4): 779-788.
- [3] Wang XQ, Fan JM, Liu YO et al. Bioavailability and pharmacokinetics of sorafenib suspension, nanoparticles and nanomatrix for oral administration to rat [J]. *Int J Pharm*, 2011, 419(1-2): 339-346.
- [4] Kim MS. Soluplus-coated colloidal silica nanomatrix system for enhanced supersaturation and oral absorption of poorly water-soluble drugs [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2013, 41 (6): 363-367.
- [5] Wang L, Cui FD, Sunada H. Preparation and evaluation of solid dispersions of nitrendipine prepared with fine silica parti-

cles using the melt-mixing method [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(1): 37-43.

- [6] Charnay C, Bégu S, Tourné-Péteilh C, et al. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property [J]. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004, 57 (3): 533-540.
- [7] Gupta P, Chawla G, Bansal AK. Physical stability and solubility advantage from amorphous celecoxib: the role of thermodynamic quantities and molecular mobility [J]. *Mol Pharm*, 2004, 1 (6): 406-413.
- [8] Salonen J, Laitinen L, Kaukonen AM, et al. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs [J]. *J Control Release*, 2005, 108 (2-3): 362-374.
- [9] Blanchet B, Billemont B, Cramard J, et al. Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49 (4): 1109-1114.
- [10] Wang XQ, Dai JD, Zhang H, et al. Absorption mechanism of cyclosporine A loaded pH-sensitive nanoparticles in rats [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2008, 8(5): 2422-2431.
- [11] Miller DA, Di Nunzio JC, Yang W, et al. Targeted intestinal delivery of supersaturated itraconazole for improved oral absorption [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(6), 1450-1459.
- [12] Janssens S, De Zeure A, Paudel A, et al. Influence of preparation methods on solid state supersaturation of amorphous solid dispersions: a case study with itraconazole and Eudragit E100 [J]. *Pharm Res*, 2010, 27(5), 775-785.

[收稿日期] 2015-09-09 [修回日期] 2016-01-14

[本文编辑] 李睿旻