

311-315.

[13] 韩强, 陈辉, 李银洁, 等. HPLC法同时测定银黄制剂中9个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(10): 1686-1692.

[14] 何兵, 杨世艳, 张燕. HPLC法同时测定银黄含片中10个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1853-1857.

[15] 杨世艳, 何兵, 张燕. HPLC法同时测定银黄颗粒中7种有机酸及4种黄酮类成分[J]. 中草药, 2013, 44(3): 301-304.

[16] 张建伟, 赵倩, 何希荣, 等. UPLC测定银黄颗粒中绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素6种成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 50-53.

[17] 孙晓东, 王文辉, 杨俊, 等. 高效液相梯度洗脱法测定银黄含片中黄芩苷、绿原酸和芦丁[J]. 光谱实验室, 2010, 27(14): 1282-1285.

[18] 王春秋, 李雯霞. RP-HPLC法同时测定金银花中10种化学成分[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1973-1977.

[19] 赖娟华, 徐丽瑛, 饶华, 等. 杜仲叶化学成分和药理作用研究概况[J]. 实用中西医结合临床, 2004, 4(2): 67-69.

## HPLC法同时测定降脂颗粒中5种成分

马赞<sup>1</sup>, 王起文<sup>1</sup>, 徐国华<sup>2</sup>, 纪乐军<sup>2</sup>, 陈建伟<sup>1\*</sup>, 李祥<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023; 2. 江苏神华药业有限公司, 江苏淮安 211600)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定降脂颗粒 (丹参、虎杖、茵陈等) 中 5 种成分的含有量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Hanbon-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈 (A) - 0.1% 磷酸 (B) 为流动相, 梯度洗脱; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 286 nm (0 ~ 30、40 ~ 50 min) 和 203 nm (30 ~ 40 min)。结果 绞股蓝皂苷 A、绿原酸、虎杖苷、丹酚酸 B、大黄素分别在 0.176 ~ 2.46、0.056 ~ 0.84、0.36 ~ 5.40、0.192 ~ 2.88、0.12 ~ 1.80 μg 范围内线性关系良好 (r > 0.999 0), 平均加样回收率 97.17% ~ 102.59%, RSD 1.9% ~ 2.9%。结论 该方法准确简便, 可用于降脂颗粒的质量控制。

**关键词:** 降脂颗粒; 绞股蓝皂苷 A; 绿原酸; 虎杖苷; 丹酚酸 B; 大黄素; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)03-0532-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.018

## Simultaneous determination of five constituents in Jiangzhi Granules by HPLC

MA Yun<sup>1</sup>, WANG Qi-wen<sup>1</sup>, XU Guo-hua<sup>2</sup>, JI Le-jun<sup>2</sup>, CHEN Jian-wei<sup>1\*</sup>, LI Xiang<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Shenhua Pharmaceutical Co., Ltd., Huai'an 211600, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of five constituents in Jiangzhi Granules (*Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Polygoni cuspidati Rhizoma et Radix*, *Artemisiae scopariae Herba*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic Hanbon-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile (A) - 0.1% phosphoric acid (B) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 286 nm (0 - 30, 40 - 50 min) and 203 nm (30 - 40 min). **RESULTS** Gypenoside A, chlorogenic acid, polydatin, salvianolic acid B and emodin showed good linear relationships within the ranges of 0.176 - 2.46, 0.056 - 0.84, 0.36 - 5.40, 0.192 - 2.88 and 0.12 - 1.80 μg (r > 0.999 0), respectively, whose average re-

收稿日期: 2016-04-13

基金项目: 江苏省科技成果转化项目 (BA2014118); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 马赞 (1987—), 女, 硕士生, 从事中药品质评价研究。E-mail: myunok@163.com

\* 通信作者: 陈建伟 (1955—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药品质评价与中药生物技术研究。Tel: (025) 85811280, E-mail: chenjw695@126.com

coveries were 97.17% - 102.59% with the RSDs of 1.9% - 2.9%. **CONCLUSION** This accurate and simple method can be used for the quality control of Jiangzhi Granules.

**KEY WORDS:** Jiangzhi Granules; gypenoside A; chlorogenic acid; polydatin; salvianolic acid B; emodin; HPLC

降脂颗粒是治疗脂肪肝的中药复方颗粒剂，由绞股蓝、丹参、虎杖、茵陈、荷叶5味中药组成<sup>[1]</sup>，该制剂源于上海中医药大学附属龙华医院治疗脂肪肝的医院制剂，疗效确切，其采用水提醇沉工艺制备而成，具有清热利湿化痰，活血祛瘀的功效，可有效改善单纯性脂肪肝患者症状，减轻脂肪肝程度<sup>[2]</sup>。方中绞股蓝为君药，绞股蓝皂苷A为其主要有效成分之一，具有降血脂、保肝、抗炎、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤、保护心脑血管等药理活性<sup>[3-7]</sup>；虎杖、茵陈为臣药，虎杖苷、大黄素、绿原酸为其主要成分，具有保肝、利胆、调节血脂等作用<sup>[8-11]</sup>；丹参为佐药，丹酚酸B为其主要有效成分之一，具有清除氧自由基、抗氧化、抗炎、抗纤维化等药理活性，对心脑血管系统、肝脏、肾脏、肺都有保护作用<sup>[12]</sup>。目前，降脂颗粒仅以大黄素为指标成分进行含有量测定，存在一定局限性，为了更加全面控制该制剂的质量，本试验在对处方组成药味有效成分研究的基础上，采用HPLC法同时测定其中绞股蓝皂苷A、虎杖苷、大黄素、绿原酸、丹酚酸B的含有量，以提升该制剂质量控制标准。

### 1 材料

1.1 仪器 2695型高效液相色谱仪，配置Waters2489型PDA检测器、Empower工作站（美国Waters公司）；AG285型电子天平（瑞士Mettler-Toledo公司）。

1.2 试药 绞股蓝皂苷A（含有量>98%，批号MUST-15090910，成都曼思特生物科技有限公司）；绿原酸（含有量>98%，批号20150331，西安沃森生物科技有限公司）；虎杖苷（含有量>98%，批号10201-201209，南昌贝塔生物科技有限公司）；丹酚酸B（含有量>98%，批号115939-25-8，上海源叶生物科技有限公司）；大黄素（含有量>98%，批号110756-200110，中国食品药品检定研究院）。降脂颗粒（批号20151129、20160104、20160117）由江苏神华药业有限公司提供。乙腈为色谱纯（德国Merck公司）；磷酸为分析纯（广东光华化学厂有限公司）；水为超纯水。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hanbon-C<sub>18</sub>色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1%磷酸（B），梯度洗脱（0~15 min，10%~20% A；15~50 min，20%~70% A）；柱温30℃；体积流量1.0 mL/min；检测波长286 nm（0~30、40~50 min）和203 nm（30~40 min）；进样量10 μL。

#### 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取绞股蓝皂苷A、绿原酸、虎杖苷、丹酚酸B、大黄素对照品适量，甲醇配制成质量浓度分别为0.088、0.028、0.180、0.096、0.060 mg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 将降脂颗粒研成粉末，过60目筛，精密称取1.0 g，置于100 mL锥形瓶中，精密加入甲醇20 mL，密塞，称定质量，超声处理30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照处方量，分别制备缺绞股蓝、虎杖、丹参、绿原酸的阴性样品，HPLC检测，发现各药材间无干扰，同时在“2.1”项色谱条件下，对照品、供试品、阴性对照溶液中的目标成分均达到基线分离。具体见图1。

#### 2.3 方法学考察

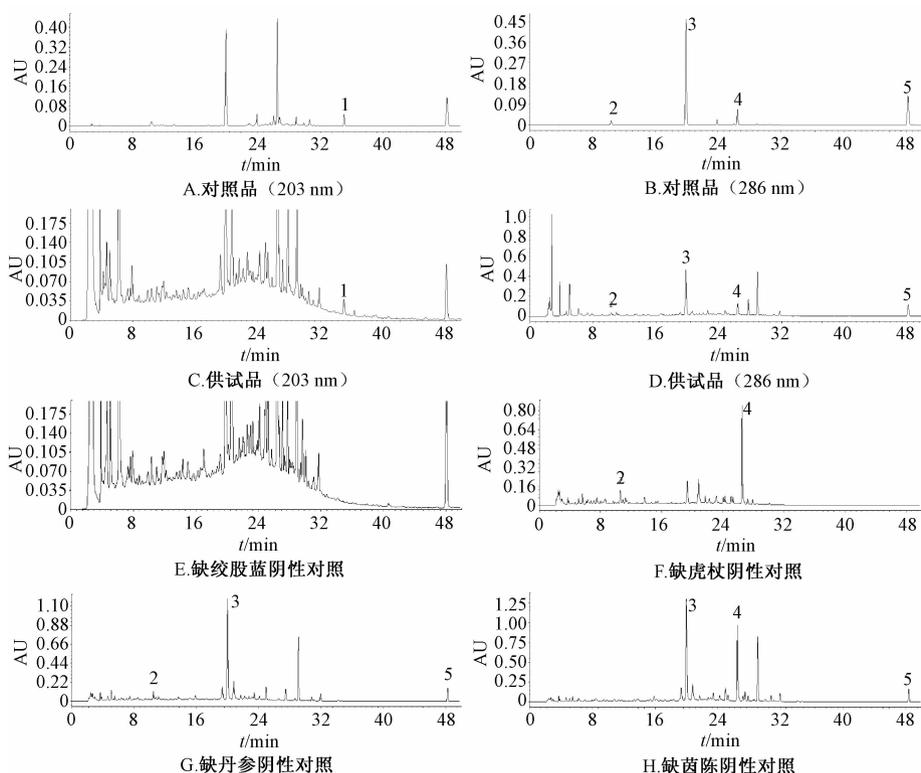
2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液2、5、10、20、30 μL，注入色谱仪，在“2.1”项色谱条件下分析，以峰面积为纵坐标（Y），进样量为横坐标（X）进行回归，结果见表1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表1 5种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of five constituents

成分	回归方程	线性范围/μg	r
绞股蓝皂苷A	$Y = 461\ 732X - 11\ 295$	0.176 ~ 2.46	0.999 7
绿原酸	$Y = 603\ 879X + 3\ 308$	0.056 ~ 0.84	0.999 5
虎杖苷	$Y = 2\ 571\ 778X - 105\ 205$	0.36 ~ 5.40	0.999 8
丹酚酸B	$Y = 582\ 751X - 23\ 742$	0.192 ~ 2.88	0.999 9
大黄素	$Y = 2\ 896\ 150X - 81\ 717$	0.12 ~ 1.80	0.999 8

2.3.2 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样6次，测得绞股蓝皂苷A、绿原酸、虎杖苷、丹酚酸B、大黄素峰



1. 绞股蓝皂苷 A 2. 绿原酸 3. 虎杖苷 4. 丹酚酸 B 5. 大黄素  
1. gypenoside A 2. chlorogenic acid 3. polydatin 4. salvianolic acid B 5. emodin

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

面积 RSD 分别为 0.81%、0.88%、0.89%、0.84%、0.85%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取“2.2.1”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下于0、2、4、8、12 h 进样 10  $\mu$ L，测得绞股蓝皂苷 A、绿原酸、虎杖苷、丹酚酸 B、大黄素峰面积 RSD 分别为 0.91%、0.71%、0.78%、1.37%、0.70%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同批样品（批号 20160104）6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，取 10  $\mu$ L 注入色谱仪，测得绞股蓝皂苷 A、绿原酸、虎杖苷、丹酚酸 B、大黄素峰面积 RSD 分别为 0.96%、1.17%、0.55%、1.45%、0.68%，表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取含有量已知的样品（批号 20160104）6 份，每份 1.0 g，按 1:1 的比例加入适量对照品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，计算回收率。结果见表 2。

2.4 样品含有量测定 称取不同批次样品各约

1.0 g，每批 3 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，外标法计算含有量，结果见表 3。

### 3 讨论

3.1 提取条件选择 本实验比较了不同提取方法（冷浸、超声）、提取溶剂（水、甲醇）、提取时间（30、45、60 min），发现以甲醇超声提取 30 min 时，可将 5 种成分提取完全。

3.2 检测波长选择 绞股蓝皂苷 A 的最大吸收波长为 203 nm，而丹酚酸 B、大黄素、绿原酸、虎杖苷分别为 286、254、327、306 nm，不能以单一波长对这 5 种成分进行紫外检测。因此，本实验采用二极管阵列检测器（PDA）的程序可变波长法，发现在 286 nm 波长处的杂峰较少，故选择在 203 nm 和 286 nm 波长处进行检测。

3.3 指标成分选择 由于绞股蓝含有皂苷类成分，虎杖、茵陈、丹参分别含有虎杖苷、大黄素、绿原酸、丹酚酸 B，均为主要活性物质，与降脂颗粒的药效相关，故选择这 5 种成分作为指标成分。

表2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
绞股蓝皂 苷 A	1.002 1	1.44	1.44	2.90	101.2	99.2
	1.000 9	1.44	1.43	2.85	98.5	(2.7)
	1.002 4	1.44	1.44	2.87	99.1	
	1.002 2	1.44	1.44	2.80	94.2	
	1.001 3	1.44	1.43	2.88	100.7	
	1.001 6	1.44	1.45	2.91	101.2	
绿原酸	1.002 1	1.14	1.13	2.31	103.7	102.7
	1.000 9	1.14	1.14	2.28	100.3	(2.9)
	1.002 4	1.14	1.15	2.30	101.0	
	1.002 2	1.14	1.13	2.26	99.3	
	1.001 3	1.14	1.14	2.36	107.3	
	1.001 6	1.14	1.16	2.35	104.5	
虎杖苷	1.002 1	3.75	3.75	7.43	98.2	97.2
	1.000 9	3.74	3.74	7.48	99.9	(2.1)
	1.002 4	3.75	3.73	7.43	98.7	
	1.002 2	3.75	3.74	7.34	96.0	
	1.001 3	3.74	3.72	7.26	94.5	
	1.001 6	3.75	3.74	7.33	95.8	
丹酚酸 B	1.002 1	3.39	3.40	6.82	101.0	98.4
	1.000 9	3.38	3.36	6.69	98.5	(2.4)
	1.002 4	3.39	3.37	6.78	100.7	
	1.002 2	3.39	3.38	6.58	94.5	
	1.001 3	3.38	3.39	6.71	98.2	
	1.001 6	3.38	3.37	6.68	97.8	
大黄素	1.002 1	1.12	1.11	2.21	98.5	99.1
	1.000 9	1.12	1.09	2.19	98.6	(1.9)
	1.002 4	1.12	1.11	2.26	102.9	
	1.002 2	1.12	1.08	2.18	98.4	
	1.001 3	1.12	1.13	2.23	98.6	
	1.001 6	1.12	1.14	2.23	97.7	

表3 含量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of content determination(mg/g, n=3)

批号	绞股蓝皂苷 A	绿原酸	虎杖苷	丹酚酸 B	大黄素
20151129	1.44	1.13	3.73	3.42	1.12
20160104	1.42	1.12	3.74	3.33	1.11
20160117	1.45	1.15	3.75	3.38	1.12
平均值	1.44	1.13	3.74	3.38	1.12

3.4 绞股蓝皂苷 A 稳定性探讨 稳定性试验显示, 绞股蓝皂苷 A 及其他 4 个成分在 12 h 内稳定性均良好。但存放时间超过 48 h 后, 绞股蓝皂苷 A 峰面积呈现一定程度下降, 推测可能与温度、光线等因素有关。

## 4 结论

降脂颗粒中的君药绞股蓝尚未收载于《中国药典》, 仅在部分省市的地方标准中出现, 并且无定量测定方法, 而本实验首次测定其中绞股蓝皂苷 A 的含有量。该制剂同时存在多种类型成分, 如绞股蓝皂苷 A 为达玛烷型四环三萜类, 虎杖苷为二苯乙烯苷类, 绿原酸为缩酚酸类, 大黄素为蒽醌类, 丹酚酸 B 为酚酸类, 本实验建立了 HPLC 法同时测定以上 5 种成分的含有量, 其简单准确, 重复性好, 可用于降脂颗粒的质量控制。

## 参考文献:

- [1] Song H Y, Zhang L, Pan J L, et al. Bioactivity of five components of Chinese herbal formula Jiangzhi granules against hepatocellular steatosis[J]. *J Integr Med*, 2013, 11(4): 262-268.
- [2] 王 森, 柳 涛, 魏华凤, 等. 降脂颗粒联合行为干预治疗痰瘀互结型非酒精性脂肪性肝病的临床研究[J]. *上海中医药杂志*, 2010, 44(4): 11-13.
- [3] 程大伟. 绞股蓝总苷对大鼠酒精性脂肪肝的保护作用[J]. *湖北民族学院学报*, 2015, 32(1): 8-11.
- [4] 赵铮蓉, 张 萍, 吴月国, 等. 绞股蓝提取物的抗痛风活性部位筛选[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(11): 2510-2511.
- [5] 郭建军, 雷 晓, 任道远, 等. 绞股蓝茶总皂苷的纯化及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(5): 99-102, 107.
- [6] 苏秋香, 丛 敬, 宫 倩. 绞股蓝皂苷在小鼠皮肤衰老中的抗氧化损伤作用研究[J]. *中国美容医学*, 2015, 24(3): 34-36.
- [7] 吴燕春, 钟振国, 刘舒凌, 等. 绞股蓝正丁醇部位含药血清体外对 Aβ<sub>25-35</sub> 诱导 NG108-15 细胞凋亡的抑制作用[J]. *中药材*, 2014, 37(6): 1029-1033.
- [8] Dang S S, Zhang X, Jia X L, et al. Protective effects of emodin and astragalus polysaccharides on chronic hepatic injury in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(11): 1010-1014.
- [9] 刘 涛, 徐秋玲, 赵 岩, 等. 大黄素对非酒精性脂肪肝大鼠脂质水平及肝脏脂质代谢基因表达的影响[J]. *中草药*, 2010, 41(9): 1516-1518.
- [10] 郑国华, 陈锦秀, 葛 莉, 等. 白藜芦醇预防小鼠高脂血症的形成及其分子机制[J]. *中国自然医学杂志*, 2009, 11(3): 171-174.
- [11] 钟 成, 潘竞鏊, 吕俊华, 等. 茵陈蒿汤对代谢综合征-脂肪肝大鼠增强胰岛素敏感性及抗脂肪肝作用[J]. *临床医学工程*, 2012, 19(4): 520-523.
- [12] 赵 先, 王婧雯, 陆 杨, 等. 丹酚酸 B 药理作用的研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2015, 30(1): 107-110.