

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.08.005

小儿葛黄止泻颗粒质量标准研究

姚 能¹, 严常开^{1△}, 吴 宁², 郭 皓², 何建华²

(1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065; 2. 武汉药谷科技开发有限公司, 湖北 武汉 430200)

摘要:目的 建立小儿葛黄止泻颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中葛根、黄连、黄芩、木香进行定性鉴别。采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中葛根素含量, 色谱柱为 Sepax BR-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(21:79), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温为 35℃。结果 TLC 法能定性鉴别出葛根、黄连、黄芩、木香, 斑点清晰, 且阴性对照无干扰; 葛根素质量浓度在 3.90~46.76 μg/mL 范围内与峰面积积分值线性关系良好, $r=0.9999$ ($n=6$), 平均加样回收率为 100.35%, RSD 为 1.71% ($n=6$)。结论 该研究中建立的分析方法简便、准确、可靠、重复性好, 可用于小儿葛黄止泻颗粒的质量控制。

关键词: 小儿葛黄止泻颗粒; 质量标准; 葛根素; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)08-0014-04

Study on Quality Standard of Xiao'er Gehuang Zhixie Granules

Yao Neng¹, Yan Changkai¹, Wu Ning², Guo Hao², He Jianhua²

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei, China 430065; 2. Wuhan Yaogu Science and Technology Development Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China 430200)

Abstract: Objective To establish the quality standard for Xiao'er Gehuang Zhixie Granules. **Methods** TLC method was used for quali-

第一作者: 姚能(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物新制剂、新剂型及新技术, (电子信箱)747669723@qq.com。

△通信作者: 严常开(1964-), 主任药师, 研究方向为药物新制剂、新剂型及新技术, (电子信箱)yanchangkai@sohu.com。

供了思路。

同时发现, 丁香酚对 MDR-Ab 抑制作用最强, 其机制可能是丁香酚作为有机酚类, 作用于细菌细胞膜上的脂质和蛋白质^[15], 使之发生变性而发挥抗菌作用的。曾有研究发现, 大部分抑菌中药对细菌的生长和蛋白谱的表达有影响^[16]。本研究结果也表明, 丁香酚可抑制 MDR-Ab 生长期到达峰值, 后期将对丁香酚对 MDR-Ab 蛋白质表达谱的影响及其具体分子作用机制进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 胡云建. Mohnarin 2006~2007 年度报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药性监测[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(10): 597-602.
- [2] 汪 丽, 吕碗飞, 王卫华, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌的分子流行病学调查及耐药机制研究[J]. 浙江检验医学, 2010, 8(3): 14-16.
- [3] 徐小江, 肖文军, 陈 庆, 等. 大蒜素抗菌作用及其机制研究进展[J]. 医药导报, 2010, 29(8): 1048-1051.
- [4] 齐莉莉, 王进波. 姜黄提取物的抗氧化及抗菌活性研究[J]. 中国调味品, 2008(2): 72-73.
- [5] 李京晶, 籍保平, 周 峰, 等. 丁香和肉桂挥发油的提取、主要成分测定及其抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 64-68.
- [6] Murray PR. Manual of clinical Microbiology[M]. 9th ed, Washington DC: American Society for Microbiology, 2007: 1152-1172.
- [7] 倪语星, 尚 红. 临床微生物学与检验[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 60-62.
- [8] 白现英. 6种中药及其联合舒巴坦对鲍曼不动杆菌抑菌活性

研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.

- [9] 郑全喜, 苏显中. 中药体外抑菌作用的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(4): 295-297.
- [10] 黄瑞玉, 穆小萍, 柏彩英, 等. 连翘对多重耐药菌鲍曼不动杆菌主动外排泵编码基因 ade B 的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(2): 111.
- [11] Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, et al. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin[J]. Biomed Research International, 2014, 2014(1): 186864.
- [12] Wu X, Santos RR, Fink - Gremmels J. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of Staphylococcus epidermidis[J]. Food Sci Nutr, 2015, 3(2): 158-168.
- [13] Devi KP, Sakthivel R, Nisha SA, et al. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen Proteus mirabilis[J]. Archives of Pharmacal Research, 2013, 36(3): 282.
- [14] Karumathil DP, Surendran - Nair M, Venkitanarayanan K. Efficacy of trans - cinnamaldehyde and eugenol in reducing acinetobacter baumannii adhesion to and invasion of human keratinocytes and controlling wound infection in vitro[J]. Phytotherapy Research Ptr, 2016, 30: 2053-2059.
- [15] 李巧如, 刘宗智, 任健康, 等. 丁香酚提取物抗菌机理的探讨[J]. 西北药学杂志, 2001, 16(6): 34-37.
- [16] 周 磊, 云宝仪, 汪业莉, 等. 大黄素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(12): 1156.

(收稿日期: 2017-11-12)

tative identification of *Puerariae Lobatae Radix*, *Coptidis Rhizoma*, *Scutellariae Radix* and *Aucklandiae Radix* in Xiao'er Gehuang Zhixie Granules. HPLC method was used for content determination of puerarin in Xiao'er Gehuang Zhixie Granules, the column chromatography was Sepax BR-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water(21:79), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, and the column temperature was 35 °C. **Results** The *Puerariae Lobatae Radix*, *Coptidis Rhizoma*, *Scutellaria Radix* and *Aucklandiae Radix* were identified qualitatively by TLC, the spots were clear without negative interference. Puerarin showed a good linear relationship within the range of 3.90–46.76 μg/mL, $r=0.999\ 9$ ($n=6$), the average recovery was 100.35%, and the *RSD* was 1.71% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, reliable and reproducible, which can be used for the quality control of Xiao'er Gehuang Zhixie Granules.

Key words: Xiao'er Gehuang Zhixie Granules; quality standard; puerarin; TLC; HPLC

小儿葛黄止泻颗粒由葛根、黄连、木香等组方,由中医经典名方葛根芩连汤结合临床经验添加白术、木香演变而成,为中药六类新品种,有解肌清热、止泻止痢功效,适用于小儿因湿热蕴结所致的泄泻、痢疾、泄泻腹痛、便黄而黏、肛门灼热^[1333]。方中葛根味甘、辛,性凉,性清轻升发,入脾胃经,既能解表退热,又能升发脾胃清阳之气而治下利,是一物而二任也,故为君药^[2];黄芩和黄连清热泻火、清热燥湿利尿,为臣药^[3];木香行气止痛、健脾消食,炒白术健脾益气、燥湿利水,二者共为佐药;甘草甘缓和中,调和诸药,为使药^[4]。合而为方,可升阳止泻、清热燥湿、泻火解毒、行气止痛、健脾消食。为了有效控制产品质量,本研究中建立了鉴别葛根、黄连、黄芩、木香的薄层色谱(TLC)法及测定葛根素含量的高效液相色谱(HPLC)法,现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪,含LC-15型色谱泵,SPD-15C型紫外检测器,LC-20AT型色谱泵,SIL-20A型紫外检测器,岛津LC Solution Lite工作站(日本岛津公司);UV-170型紫外分光光度计(日本岛津公司);613T超声波清洗机(深圳市洁拓电子科技有限公司,360 W,40 kHz);204AL型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试剂

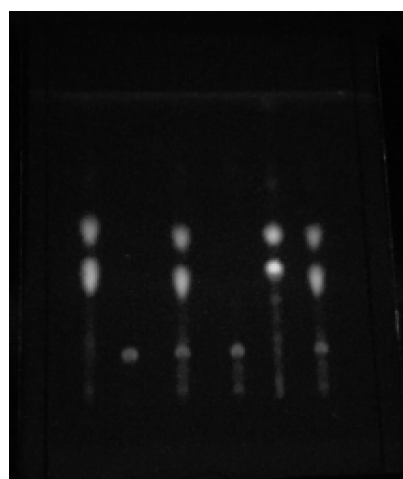
小儿葛黄止泻颗粒(10批,武汉药谷科技发展有限公司,规格为4 g/袋);葛根素对照品(批号为110752-201514,含量为95.5%),去氢木香内酯对照品(批号为111525-201510,含量为99.8%),黄芩素对照品(批号为111595-200905,含量为98.5%),黄连对照药材(批号为121551-201404),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,甲醇等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

葛根与黄连^[5-6]:取小儿葛黄止泻颗粒约0.4 g,置50 mL锥形瓶中,加甲醇25 mL,密塞,超声30 min,滤

过,取续滤液,即得供试品溶液;分别取缺葛根、黄连的阴性样品各约0.4 g,同法制成阴性对照品溶液;取黄连对照药材0.4 g,同法制成对照药材溶液;另取葛根素对照品适量,加入甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。分别吸取上述5种溶液各1 μL,点于同一1% NaOH 硅胶GF₂₅₄薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(13:3:5:1)为展开剂展开,取出,晾干,置紫外灯下(345 nm)检视。结果供试品溶液色谱展开效果较好,斑点清晰,阴性样品无干扰,结果见图1。

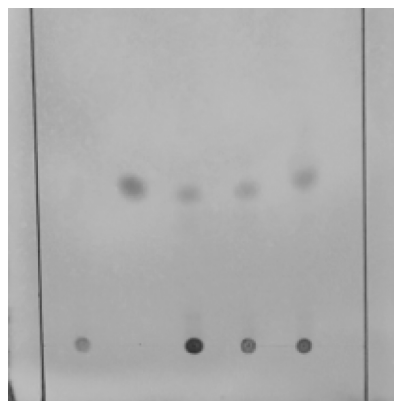


1. 葛根阴性对照品溶液 2. 葛根素对照品溶液
3,6. 供试品溶液 4. 黄连阴性对照品溶液
5. 黄连对照药材溶液

图1 葛根与黄连 TLC 图

木香^[11105]:取小儿葛黄止泻颗粒约0.4 g,加甲醇10 mL,密塞,超声10 min,滤过,溶液蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,得供试品溶液;取缺木香的阴性样品约0.4 g,同法制成阴性对照品溶液;另取去氢木香内酯对照品适量,加入甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。分别吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各5 μL,对照品溶液2 μL,点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)为展开剂展开,取出,晾干,喷以10%香草醛硫酸,加热至斑点清晰。结果供试品溶液色谱展开效果较好,斑点清晰,阴性样品

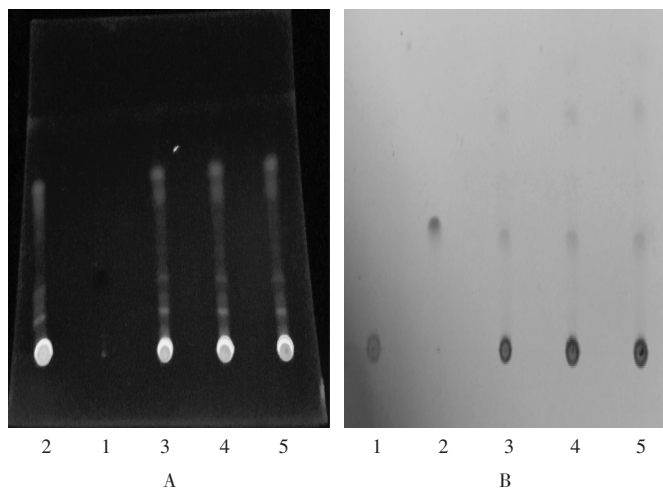
无干扰,结果见图2。



1. 阴性对照品溶液 2. 对照品溶液 3-5. 供试品溶液

图2 木香TLC图

黄芩^{[1]301}:取小儿葛黄止泻颗粒约0.4 g,加甲醇10 mL,密塞,超声10 min,滤过,溶液蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,取上清液,作为供试品溶液;取缺黄芩的阴性样品约0.4 g,同法制成阴性对照品溶液;取黄芩素对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。分别吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各5 μ L,黄芩素对照品溶液2 μ L,点于同一聚酰胺薄膜上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:3:1:2)为展开剂展开,取出,晾干,喷以5% FeCl₃溶液,加热至斑点清晰。结果供试品溶液色谱展开效果较好,斑点清晰,阴性样品无干扰,结果见图3。



A. 荧光 B. 日光

1. 阴性对照品溶液 2. 对照品溶液 3-5. 供试品溶液

图3 黄芩TLC图

2.2 葛根素含量测定^[7]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Sepax BR-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相:甲醇-水(21:79);流速:1.0 mL/min;检测波长:250 nm;进样量:5 μ L;柱温:35 $^{\circ}$ C。理论板数按葛根

素峰计算应不低于5 000。

2.2.2 溶液制备

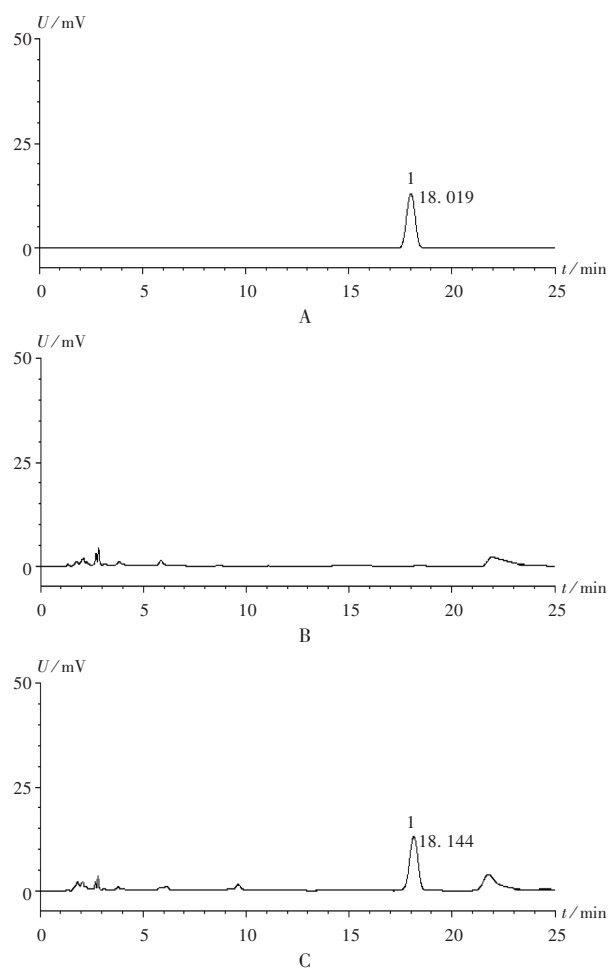
对照品溶液:取葛根素对照品适量,精密称定,用甲醇配制成每1 mL中含葛根素20 μ g的溶液,即得。

供试品溶液:取小儿葛黄止泻颗粒约0.52 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇30 mL,密塞,超声提取20 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 mL置10 mL容量瓶中,再加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:取除葛根外的其余药材,按小儿葛黄止泻颗粒处方制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密量取2.2.2项下3种溶液各5 μ L,在250 nm波长下进样,记录色谱图。结果阴性对照品溶液在与对照品溶液及供试品溶液色谱相应保留时间处无相应色谱峰,表明阴性对照无干扰,专属性强。结果见图4。



1. 葛根素

A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 供试品溶液

图4 葛根素HPLC色谱图

线性关系考察:分别精密量取葛根素质量浓度为 389.64 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液(母液),加甲醇稀释(1 mL $\rightarrow$ 100 mL,1 mL $\rightarrow$ 50 mL,1 mL $\rightarrow$ 25 mL,3 mL $\rightarrow$ 50 mL,2 mL $\rightarrow$ 25 mL,3 mL $\rightarrow$ 25 mL),分别精密吸取上述稀释后溶液各 5 μL ,分别进样后测定。以对照品溶液质量浓度($\mu\text{g/mL}$, X)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4\,772\,911.51X - 858.55$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明,葛根素质量浓度在 3.90 ~ 46.76 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:精密量取质量浓度为 15.59 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,按拟订条件连续进样 6 次,计算峰面积。结果的 RSD 为 0.24% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 20170601)供试品溶液,分别于 0,3,6,9,12,15,18,21,24 h 时进样,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.48% ($n = 9$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 20170601)样品干膏粉 6 份,依法制备供试品溶液。结果葛根素峰面积的 RSD 为 0.56% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密称取已知葛根素含量(重复性试验项下)的样品(批号为 20170601)6 份,每份约 0.26 g,精密称定,分别精密加入质量浓度为 346 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液各 10 mL,依法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 葛根素加样回收试验结果 ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
4.45	3.46	7.903 0	99.80	100.35	1.71
4.39	3.46	7.845 3	99.86		
4.48	3.46	7.951 0	100.32		
4.51	3.46	7.994 8	100.72		
4.56	3.46	8.135 1	103.33		
4.53	3.46	7.923 8	98.09		

2.2.4 样品含量测定

按上述供试品溶液制备方法和测定条件,测定 10 批样品中葛根素含量。结果见表 2。

表 2 10 批样品含量测定结果 (mg/g , $n = 10$)

批号	平均含量	批号	平均含量
20170501	32.98	20170605	36.97
20170601	33.77	20170606	33.89
20170602	31.49	20170607	34.00
20170603	36.58	20170701	33.90
20170604	33.65	20170702	35.32

3 讨论

3.1 定性鉴别

本研究中采用 TLC 法鉴别葛根、黄连,通过对样品的提取方法、点样量、展开剂种类、溶剂比例等条件进行了筛选,发现在鉴别葛根时,在供试品溶液色谱中发现有与黄连对照药材相同颜色的斑点,通过试验证实,该斑点与黄连对照药材斑点一致,故将黄连与葛根采用相同方法进行鉴别,能有效、快速地鉴别出葛根与黄连。该方法分离度良好,专属性强,可作为葛根、黄连定性鉴别的参考方法。

3.2 定量测定

本研究中采用 HPLC 法测定小儿葛黄止泻颗粒中葛根素的含量,参考了 2015 年版《中国药典(一部)》中葛根药材及葛黄芩连丸中含量测定项下的葛根素含量

测定方法,结果保留时间较短,样品中主峰与杂质峰无法分开,分离度、理论板数均不理想,最后通过改变流动相比比例,确定了甲醇-水(21:79)为葛根素含量测定的流动相,结果获得了较好的峰型和分离度。

3.3 提取条件考察

本研究中在测定葛根素含量时,进行了提取方式、提取溶剂、提取时间等诸多项的考察,最终确定了以甲醇为溶剂,超声处理 20 min 为处理方法的制备方法,该方法测得结果含量高,稳定性好,重复性高,对小儿葛黄止泻颗粒质量标准的建立提供了依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 黄泰康,施 诚. 中药方剂现代研究大典[M]. 北京:科学技术出版社,1996:1217.
- [3] 刘 容,司晓莉. 葛根芩连汤对脾胃湿热证大鼠的治疗作用研究[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(3):287-290.
- [4] 汉·张仲景. 伤寒论[M]. 北京:中医古籍出版社,1997:22.
- [5] 宋凤兰,何 洋,何 琳,等. 葛根芩连滴丸的质量标准研究[J]. 广东药学院学报,2014,30(4):439-443.
- [6] 李 希,罗先本,谢守德,等. 黄连配方颗粒质量标准研究[J]. 中成药,2004,26(12):32-34.
- [7] 毛红兵,张爱华,刘梦媛,等. 葛连解糖颗粒的质量标准研究[J]. 中国新药杂志,2013,22(4):486-491.

(收稿日期:2017-11-22;修回日期:2017-12-28)