

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.09.004

垂葛酒肝丸质量标准研究*

王刚¹, 陈向东^{1△}, 罗海龙², 李永佳¹, 李敏清¹

(1. 四川省达州市中心医院, 四川 达州 635000; 2. 成都地奥集团天府药业股份有限公司, 四川 达州 635000)

摘要:目的 建立垂葛酒肝丸的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对垂葛酒肝丸中丹参、山楂、泽泻进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中葛根素的含量,色谱柱为赛分 C₁₈-H 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(25:75),柱温为 30℃,流速为 1 mL/min,检测波长为 250 nm。结果 丹参、山楂、泽泻的薄层色谱斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰;葛根素进样量在 0.025 6~0.153 6 μg 范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.999\ 5$ ($n=6$),平均加样回收率为 100.08%, RSD 为 0.44% ($n=6$)。结论 该方法简便、准确、重复性好,可用于垂葛酒肝丸质量标准控制。

关键词:垂葛酒肝丸;葛根素;质量标准;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)09-0013-04

Study on Quality Standard of Chuigejiugan Pills

Wang Gang¹, Chen Xiangdong¹, Luo Hailong², Li Yongjia¹, Li Mingqing¹

(1. Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan, China 635000; 2. Di'ao Group Tianfu Pharmaceutical Co., LTD, Dazhou, Sichuan, China 635000)

Abstract: Objective To establish the quality standard for Chuigejiugan Pills. **Methods** TLC method was used for qualitative identification of *Salvia miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Crataegi Fructus* and *Alismatis Rhizoma*, the content of puerarin in the preparation was determined by HPLC method. The chromatographic column was Amethyst C₁₈-H column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water (25:75), the column temperature was 30℃, the flow rate was 1 mL/min, and the detection wavelength was 250 nm.

Results The *Salvia miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Crataegi Fructus* and *Alismatis Rhizoma* were identified qualitatively by TLC with clear spots, the degree of separation was good without negative interference. Puerarin showed a good linear relationship within the range of 0.025 6~0.153 6 μg, $r=0.999\ 5$ ($n=6$). The average recovery rate was 100.08%, the RSD was 0.44% ($n=6$).

Conclusion The established method is simple, accurate and reproducibility, which can be used for the quality standard control of Chuigejiugan Pills.

Key words: Chuigejiugan Pills; puerarin; quality standard; TLC; HPLC

垂葛酒肝丸是达州市中心医院名中医经验方,由葛根、丹参、山楂、泽泻、垂盆草等 11 味中药组方,具有清热解毒、除湿祛痰、行气逐瘀、保护肝脏细胞、降低转氨酶的作用,临床用于治疗脂肪肝有显著疗效^[1]。为保证制剂质量和疗效的稳定性,本研究中用薄层色谱(TLC)法对垂葛酒肝丸中的丹参、山楂、泽泻分别进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定葛根中葛根素的含量,对该制剂的质量控制和评价提供理论依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型液相色谱仪(美国安捷伦<中国>有限公司);CPA225D 型电子天平(美国赛多利斯公司);AS10200BDT 型超声清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);TU-1810 型紫外分光光度计(北京普析分析仪器有限公司);电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试剂

丹参酮 II_A 对照品(批号为 110766-201520),熊果

酸对照品(批号为 110742-200517),23-乙酰泽泻醇 B 对照品(批号为 111846-201504),葛根素对照品(批号为 110752-201615,供含量测定用),均由中国食品药品检定研究院提供;垂葛酒肝丸(批号分别为 161203,170216,170321),缺葛根、丹参、山楂、泽泻的阴性样品,均由达州市中心医院提供;水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

丹参:取本品 3 g,研细,加甲醇 10 mL,超声处理 30 min,离心,取上清液作为供试品溶液。另取丹参酮 II_A 对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液作为对照品溶液。取不含丹参的阴性样品 3 g,按供试品溶液的制备方法制备阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》(通则 0502)方法试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(6:4:8:1:4)为展开剂,展开至约 4 cm,取出,晾干,再以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,在日光下检视。

*基金项目:四川省科技计划项目[2015JY0170];2015 年全国中药特色技术传承人才培养项目[国中医药人教函[2015]168 号]。

第一作者:王刚,男,大学本科,主任中医师,研究方向为中医临床内科学,(电子信箱)2475151681@qq.com。

△通信作者:陈向东(1966-),男,大学本科,副主任中医师,研究方向为医院药学、中药学,(电子信箱)chenxddz@foxmail.com。

供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。色谱图见图 1A。

山楂:取本品 2 g,研细,加乙酸乙酯 10 mL,超声处理 20 min,取滤液浓缩至 2 mL,作为供试品溶液。另取熊果酸对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。取不含山楂的阴性样品 2 g,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》(通则 0502)薄层色谱法试验,吸取溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:4:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以硫酸乙醇溶液(3 $\rightarrow$ 10),在 80 $^{\circ}$ C 加热 3 min,日光下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。色谱图见图 1B。

泽泻:取本品 3 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 20 mL,超声提取 30 min,滤过,滤液置水浴上浓缩至 1 mL,作为供试品溶液。另取 23-乙酰泽泻醇 B 对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的对照品溶液。取不含泽泻的阴性样品 3 g,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》(通则 0502)薄层色谱法试验,吸取上述溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-丙酮(4:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,用 0.5% 香草醛硫酸-乙醇(4:1)溶液喷雾显色。在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰。供

试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,色谱图见图 1C。

2.2 葛根素含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

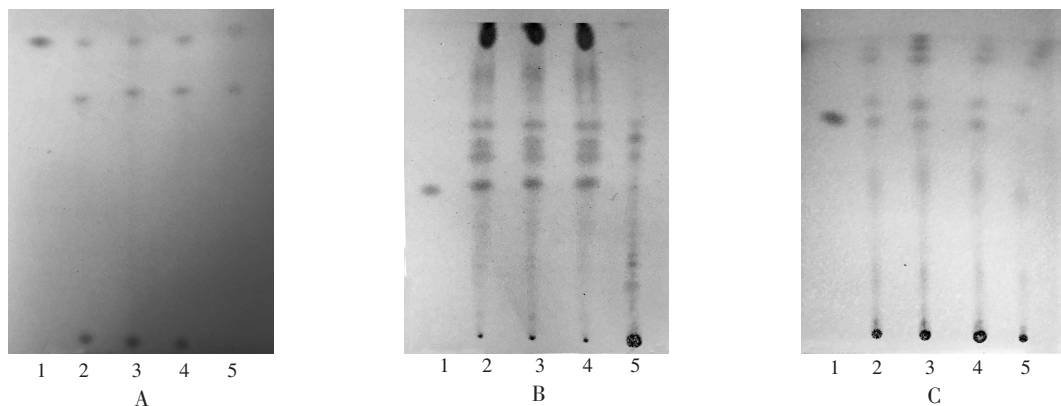
色谱柱:赛分 C_{18} -H 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水(25:75);柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:1 mL/min;检测波长:250 nm。在此色谱条件下,葛根素和样品中其他组分色谱峰可基线分离,葛根素与其相邻色谱峰的分离度符合要求。按葛根素色谱峰计算,理论板数不低于 4 000,拖尾因子符合要求。色谱图见图 2。

2.2.2 溶液制备

取样品 10 g,研细,取约 1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 30% 乙醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,再称定质量,用 30% 乙醇补足减失的质量,摇匀,过滤,即得供试品溶液;称取干燥至恒重的葛根素对照品 2.558 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加 30% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.025 6 g/L 葛根素对照品溶液。取不含葛根的阴性样品适量,照供试品溶液制备方法制得缺葛根的阴性对照品溶液。

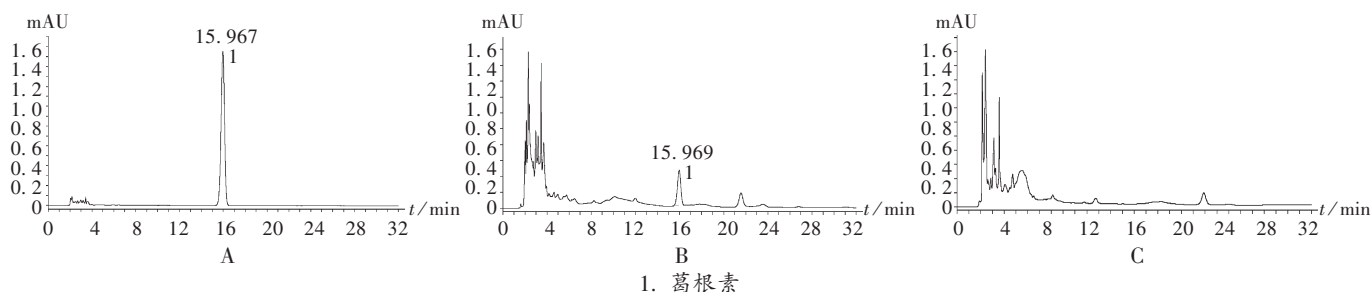
2.2.3 方法学考察

阴性干扰试验:精密吸取 2.2.2 项下 3 种溶液各 10 μ L,依次进样测定。供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,阴性对照品则无此色谱峰,表明阴性对照无干扰,目标峰与相邻色谱峰



1. 对照品溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液
A. 丹参 B. 山楂 C. 泽泻

图 1 薄层色谱图



1. 葛根素
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 2 高效液相色谱图

分离度均大于1.5。

线性关系考察:精密量取对照品溶液(质量浓度为0.025 6 g/L)1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置10 mL容量瓶中,加30%乙醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液,分别进样10 μ L,测定峰面积,记录色谱图,以峰面积值(Y)为纵坐标,对照品进样量(μ g, X)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 424\,217X - 13\,763$, $r = 0.999\,5$ ($n = 6$)。结果表明,葛根素进样量在0.025 6~0.153 6 μ g范围内与峰面积线性关系良好($n = 6$)。

精密度试验:精密吸取对照品溶液(质量浓度为0.025 6 g/L)、供试品溶液各10 μ L,重复进样,测定峰面积。结果的RSD为0.88% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取葛根素对照品溶液(质量浓度为0.025 6 g/L)及供试品溶液分别于不同时间0, 2, 4, 6, 8, 10 h时进样各10 μ L,测定峰面积值。结果的RSD为0.40% ($n = 6$),表明对照品溶液与供试品溶液均在10 h内稳定性良好。

重复性试验:按拟订含量测定方法,取同一批样品5份,分别制成供试品溶液,测定含量。结果平均含量为0.265 7 mg/g, RSD为0.21% ($n = 5$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取6份已知含量(0.27 mg/g)的样品约1.0 g,分别加入葛根素对照品溶液(质量浓度为0.127 9 g/L)2 mL,依法制备供试品溶液,进样测定含量。结果见表1。

表1 葛根素加样回收试验结果($n = 6$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.000 26	0.270 1	0.255 8	0.525 8	99.96	100.08	0.44
1.000 89	0.270 2	0.255 8	0.526 9	100.35		
1.021 54	0.275 8	0.255 8	0.532 6	100.39		
1.005 36	0.271 4	0.255 8	0.527 2	100.00		
1.000 36	0.270 1	0.255 8	0.524 1	99.30		
1.002 43	0.270 7	0.255 8	0.527 7	100.47		

2.2.4 样品含量测定

取本品,按照拟订的含量测定方法,测得3批(批号分别为20161203, 20170216, 20170321)样品葛根素含量分别为0.27, 0.25, 0.19 mg/g ($n = 3$)。

3 讨论

有效成分选择:垂葛酒肝丸中的葛根,味甘、辛,性凉,具有解肌退热、生津止渴、解酒毒等功效,药理及临床研究证明,可有效拮抗酒精导致的睾丸和肝组织脂质的过氧化损害,具有良好的解酒作用^[2];丹参活血祛瘀;山楂行气散瘀,化浊降脂,具有降血压、调血脂、降血糖等作用^[3-4];泽泻利水渗湿,泄热,化浊降脂,显著改善

肝脏脂质沉积,具有很好的保肝作用^[5]。故上述药物检测可保证制剂中的药物有效成分的质量控制。

TLC鉴别条件选择:通过对丹参、山楂、泽泻的薄层色谱方法^[6-9]研究比较,并参照2015年版《中国药典(一部)》丹参、山楂鉴别项下方法^[10],供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。泽泻鉴别采用药典方法^[10],不能得到理想图谱,泽泻中23-乙酰泽泻醇B以甲醇提取收得率高,杂质含量少^[11]。改用甲醇提取,在硅胶GF254薄层板上用环己烷-乙酸乙酯-丙酮(4:2:1)为展开剂^[12],展开,分离效果满意,斑点清晰,阴性对照无干扰,可作为本品的TLC鉴别系统。

HPLC条件选择:通过对提取溶剂、方法、时间的考察,并参考文献^[13-15],确定了葛根素含量测定中,制备供试品溶液的方法。葛根素的脂溶性和水溶性较差,可溶于甲醇、乙醇^[16-17],故对甲醇、乙醇、30%乙醇进行考察。取样品适量,精密称定,分别精密加入甲醇、乙醇、30%乙醇,称定质量,加热回流30 min,再称定质量,用上述溶液分别补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液进样测定,葛根素在甲醇和乙醇中未分离,在30%乙醇中测得葛根素含量为0.27 mg/g。

样品处理方法选择:葛根素常用提取方法有浸渍、超声、回流^[17]等,但浸渍耗时太长,仅考察超声和回流提取。经考察,超声提取30 min以上,测得样品中葛根素的含量不再增加。故采用30%乙醇提取30 min制备供试品溶液。按处方药味比例,自配不含葛根的阴性对照品,结果液相色谱中阴性对照品溶液在与对照品溶液相同保留时间处未显色谱峰,表明阴性无干扰,说明本方法准确可靠、可行。

综上所述,本试验中建立的鉴别丹参、山楂、泽泻的TLC法,可有效鉴别其特征性斑点,可作为该制剂的定性控制方法;建立的测定葛根素含量的HPLC法,精密度、稳定性、重复性符合要求,可作为该制剂的定量控制方法。上述两种方法为制订垂葛酒肝丸的质量标准提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 王刚,王海涛,李敏清,等.垂葛酒肝丸治疗酒精性脂肪肝疗效观察[J].中外健康文摘,2013(7):17-18.
- [2] 周吉银,周世文.葛根总黄酮及葛根素解酒的药理研究进展[J].中国医院药学杂志,2007,27(9):1280-1282.
- [3] 袁媛,吴芹,石京山,等.丹参及其主要成分保肝作用的研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(4):588-593.
- [4] 李建华,胡金林.山楂的药理作用与临床应用[J].中国药物滥用防治杂志,2011,17(6):334-336.
- [5] 王建平,傅旭春.泽泻的化学成分和药理作用研究进展[J].浙江医学,2012,34(14):1235-1237.
- [6] 谢瑞萍.复方七参片的薄层色谱鉴别[J].云南中医中药杂志,2010,31(7):69-70.