

化浊轻身颗粒的质量标准研究

吴 炜*

(安徽省亳州市人民医院, 安徽 亳州 236803)

[摘要] 目的: 研究化浊轻身颗粒中主要药物的鉴别和含量测定方法。方法: 采用薄层层析鉴别主要药物, 用高效液相色谱法测定制剂中四羟基二苯乙烯苷的含量。结果: 建立了制剂中黄芪、大黄、何首乌的鉴别方法, 四羟基二苯乙烯苷的线性范围为 0.164 8~ 3.296 0 μg ($r=0.9996$); 加样回收率为 99.0%, (RSD 为 3.0%, $n=6$)。结论: 该实验建立的鉴别和含量测定方法专属性强、重复性好, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 化浊轻身颗粒; 薄层鉴别; 四羟基二苯乙烯苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)08-0024-03

Study on Qualitative and Quantitative Methods for Huazhuqingshen Granules

WU Wei*

(Bozhou People's Hospital, Bozhou 236800, China)

[Abstract] **Objective:** To study the qualitative and quantitative methods of identification and assay Huazhuqingsheng Granules. **Methods:** The major compounds in this preparation were identified by the thin layer chromatographic methods and the content of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside was determined by high performance liquid chromatography. **Results:** Rhubarb, Fleeceflower root and milkvetch root were identified. The linear range of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside was within 0.164 8~ 3.2960 μg ($r=0.9996$). The average recovery ($n=6$) was 99.0% (RSD= 3.0%). **Conclusion:** The identification and determination methods established were specific, and repeatable. It could be used to control the quality of this preparation.

[Key words] Huazhuqingsheng Granules; TLC; 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside; assay

化浊轻身颗粒是由何首乌、玄参、益母草、龙胆、大黄等 9 味药味组成的复方制剂。具有滋补肝肾、清热降浊之功效, 临床用于单纯性肥胖症伴有高血压、糖尿病、闭经、月经不调等症^[1]。现行质量标准没有薄层鉴别及定量分析方法。实验中我们建立了大黄、黄芪、何首乌的薄层色谱鉴别, 并采用 HPLC 法对方中何首乌的有效成分-四羟基二苯乙烯苷进行含量检测。

1 仪器与试剂

LC-10AT 岛津高效液相色谱仪, SPD-20A 紫外检

测器, DGU-12A 在线脱气机, CTO-10Asvp 柱温箱, N2000 色谱工作站; BP211D 赛多利斯电子天平(十万分之一); FA1604 电子天平(万分之一), 超声波提取器。

药材及药品对照品均由中国药品生物制品检定所提供, 包括: 何首乌(批号: 934-200106), 大黄(批号: 0902-200006), 黄芪甲苷对照品(批号: 110781-200613), 大黄素对照品(批号: 0756-200009), 四羟基二苯乙烯苷对照品(批号 0844-200606); 化浊轻身颗粒(批号: 0705261、0705262、0705263, 合肥神鹿双鹤药业有限责任公司提供)。乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 黄芪的 TLC 鉴别 取本品 4 g, 研细, 加氯仿 50

[收稿日期] 2008-12-01

[通讯作者] * 吴 炜, Tel: (0558) 5536687; E-mail: wufan6218@sina.com.cn

mL, 加热回流 1 h, 弃去氯仿液, 残渣挥干氯仿, 加甲醇 60 mL 回流 1 h, 过滤, 滤液蒸干, 残渣加水 30 mL 微热使溶解, 用水饱和正丁醇溶液振摇提取 3 次, 每次 30 mL, 合并提取液, 再用氨试液洗涤二次, 每次 30 mL, 弃去氨试液, 水饱和正丁醇液蒸干, 残渣加水 5 mL 使溶解, 通过 D101 型大孔树脂柱(内径 1 cm, 长 15 cm), 以水 100 mL 洗脱, 弃去水液, 再用 30% 乙醇 100 mL 洗脱, 弃去 30% 乙醇液, 继用 70% 乙醇 100 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。另取缺黄芪的阴性样品, 参照供试品溶液的制备方法, 制得缺黄芪的阴性对照溶液。吸取供试品溶液、阴性对照溶液和对照品溶液各 5 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 板上, 以氯仿-甲醇-水(13:7:2)(10 $^{\circ}$ C 以下放置过夜)的下层液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇液, 在 105 $^{\circ}$ C 烘约 5 min, 置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的棕褐色斑点, 而阴性对照无干扰。

2.2 大黄、何首乌的 TLC 鉴别 取本品 1 g, 研细, 加 2.5 mol·L⁻¹ 硫酸溶液 30 mL, 摇匀, 再加氯仿 30 mL 加热回流 40 min, 将提取液转移至分液漏斗中, 分取氯仿层, 提取液再用氯仿 20 mL 振摇提取一次, 合并氯仿液, 蒸干, 残渣加氯仿 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取大黄对照药材 0.1 g、何首乌对照药材 0.25 g, 分别加甲醇 25 mL 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 按上述供试品溶液制备方法, 自“加 2.5 mol·L⁻¹ 硫酸溶液 30 mL ……”起同法制成大黄对照药材溶液和何首乌对照药材溶液。再取大黄素对照品, 加氯仿制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。另取缺大黄、何首乌的阴性样品, 参照供试品溶液的制备方法, 制得缺大黄、何首乌的阴性对照溶液。取供试品液、阴性对照溶液和对照药材、对照品溶液各 5 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 板上, 以正己烷-醋酸乙酯-甲酸(30:10:0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(365 nm)下检视, 供试品色谱中, 分别在对照品色谱相应的位置上, 显相同的橙黄色荧光斑点, 而阴性对照无干扰。

3 含量测定

3.1 供试品溶液的制备 取样品颗粒约 0.2 g, 研

细, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 25 mL, 称定重量, 超声提取(220 V, 40 KHz) 20 min, 放冷, 再称定重量, 用稀乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取四羟基二苯乙烯苷对照品 8.24 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液(浓度: 164.8 μ g·mL⁻¹), 再精密吸取储备液 5 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇定容至刻度, 摇匀, 即得(浓度: 32.96 μ g·mL⁻¹)。

3.3 阴性对照样品溶液的制备 取缺何首乌药材的处方原料, 按工艺制法制成阴性对照样品, 照供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

3.4 色谱条件与专属性试验 色谱条件: 色谱柱, Shim-Pack VP-ODS(150 mm \times 4.6 mm, 0.5 μ m); 流动相: 乙腈-水(20:80); 参照中国药典何首乌项下规定^[2], 我们确定检测波长为 320 nm; 柱温: 室温; 流量: 1.0 mL·min⁻¹。理论板数按四羟基二苯乙烯苷峰计不低于 4 000。在次条件下供试品中的四羟基二苯乙烯苷与相邻成分达到基本分离, 且阴性对照无干扰。色谱图见图 1~3。

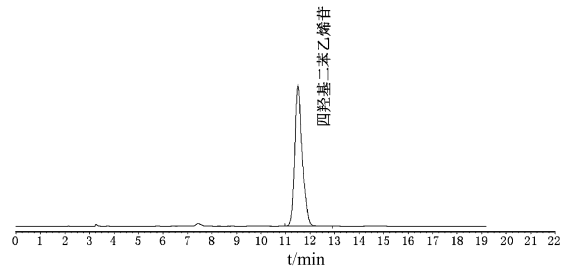


图 1 四羟基二苯乙烯苷色谱图

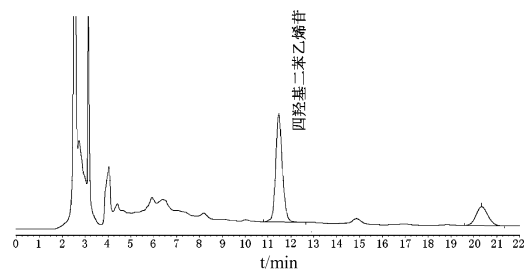


图 2 化油轻身颗粒色谱图

3.5 线性关系考察 精密吸取四羟基二苯乙烯苷对照品储备液(浓度: 164.8 μ g·mL⁻¹) 1, 2, 4, 8, 12, 16 和 20 μ L, 分别按上述色谱条件依法测定峰面积, 并以进样量对峰面积值进行线性回归, 得线性方程为 $Y = 2.53 \times 10^6 X + 1.65 \times 10^4$ ($r = 0.9996$)。结果表明

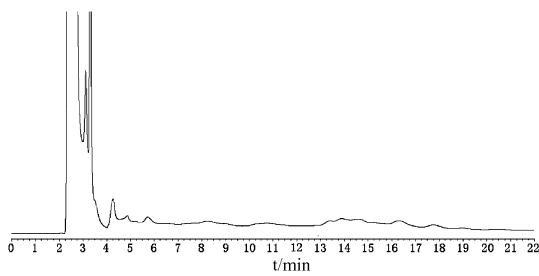


图 3 阴性对照色谱图

四羟基二苯乙烯苷在 0.164 8~ 3.296 0 μg 范围内有良好的线性关系。

3.6 精密度考察 精密吸取四羟基二苯乙烯苷对照品储备液(浓度: 164.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 8 μL , 按色谱条件连续重复进样 5 次, 测定四羟基二苯乙烯苷峰面积, 计算得其 RSD 为 0.64%。结果表明该方法的精密度良好。

3.7 稳定性考察 取供试品溶液, 在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 各进样一次, 依法测定峰面积值, 计算 RSD = 1.8%, 表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

3.8 重复性考察 取同一批化浊轻身颗粒样品 6 份, 按供试品制备方法制备供试品溶液进行测定, 计算四羟基二苯乙烯苷含量结果分别为: 2.99, 2.98, 2.93, 2.86, 2.90, 2.88 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 2.92 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD = 1.8%。结果表明该方法的重复性良好。

3.9 回收率试验 取同一批化浊轻身颗粒样品 6 份(含量 2.92 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), 每份约 0.2 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 分别精密加入四羟基二苯乙烯苷对照品储备液(164.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 mL(相当于四羟基二苯乙烯苷 0.824 mg), 再精密加入稀乙醇 20 mL, 称定重量, 超声提取 20 min, 放冷, 再称定重量, 用稀乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 精密吸取供试品溶液各 20 μL , 按上述方法进行测定, 计算平均回收率。结果表明该方法回收率好, 方法可靠。见表 1。

3.10 样品测定 取 3 批化浊轻身颗粒, 制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL , 按色谱条件进样测定, 计算四羟基二苯乙烯苷含量, 三批样品含量分别为 2.92, 3.40, 3.08($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。

表 1 四羟基二苯乙烯苷的加样回收率试验结果($n=6$)

编号	取样重 (g)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.209 2	0.824	1.471	104.4		
2	0.192 1	0.824	1.356	96.5		
3	0.200 2	0.824	1.408	100.0	99.0	3.0
4	0.195 3	0.824	1.379	98.2		
5	0.186 6	0.824	1.337	96.1		
6	0.199 5	0.824	1.398	99.0		

4 讨论

何首乌为本方中主药, 据文献资料, 何首乌化学成分主要为二苯乙烯苷类、聚合原花青素类和蒽醌类等成分, 包括大黄酚、大黄素、四羟基二苯乙烯苷等^[3], 因本方中的大黄也主含大黄素成分, 考虑到质量控制的专属性, 我们选择何首乌中的特征性成分—四羟基二苯乙烯苷作为实验检测成分。又据报道, 何首乌中四羟基二苯乙烯苷具有显著的降脂作用, 是中药何首乌调节血脂作用的主要活性成分^[4], 其降血脂、抗衰老等功效与本方功能主治相符, 故以四羟基二苯乙烯苷作为质量控制指标成份对于该制剂内在质量的控制具有重要意义。

实验中我们曾采用中国药典 2005 年版一部收载的何首乌项下的流动相乙腈-水(25: 75) 试验, 结果指标峰分离度良好, 但检测时间过长, 又试以乙腈-水(20: 80) (15: 85) 比例流动相试验, 结果以乙腈-水(20: 80) 流动相比比例时分离度良好, 且检测时间适中。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第十七册, 中华人民共和国卫生部, 1998: 26.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 122.
- [3] 李建北, 林 茂. 何首乌化学成分的研究[J]. 中草药, 1993, 24(3): 115.
- [4] 高王宣, 胡英杰, 符林春, 等. 何首乌二苯乙烯苷的调节血脂作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 323.