

健胃合剂质量控制方法研究

黄芳¹, 陈红斌², 杜静^{1*} (1.浙江省中西医结合医院, 杭州 310003; 2.浙江惠松制药有限公司, 杭州 310005)

摘要: 目的 建立健胃合剂质量控制的方法。方法 采用薄层色谱法对甘草、黄连和麸炒枳壳进行定性鉴别; 采用 HPLC 测定柚皮苷含量。色谱柱为 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2%磷酸(40:60), 检测波长为 283 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL。结果 建立的薄层色谱法样品斑点清晰, 分离度好。含量测定结果显示, 柚皮苷在 0.005 33~0.085 23 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 99.42%, RSD 为 0.76%。结论 该方法准确可靠, 专属性好, 可以用于健胃合剂的质量控制。

关键词: 健胃合剂; 甘草; 黄连; 麸炒枳壳; 柚皮苷; 质量控制

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)11-1375-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.013

引用本文: 黄芳, 陈红斌, 杜静. 健胃合剂质量控制方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1375-1378.

Study on Quality Control Method of Jianwei Mixture

HUANG Fang¹, CHEN Hongbin², DU Jing^{1*} (1.Zhejiang Integrated Traditional and Western Medicine Hospital, Hangzhou 310003, China; 2.Zhejiang Huisong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality control method of Jianwei mixture. **METHODS** Thin layer chromatography(TLC) was used to identify Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Coptidis Rhizoma, stir-baked Aurantii Fructus in bran. Determination of naringin content by HPLC. The mobile phase for determining naringin was methanol-0.2% phosphoric acid(40:60), the UV detection wavelength was 283 nm, Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used for the determination, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 5 μL. **RESULTS** TLC showed clear spots and good resolution. The linearity of naringin was in the range of 0.005 33~0.085 23 mg·mL⁻¹, the average recovery of naringin was 99.42%, RSD was 0.76%. **CONCLUSION** The method is accurate, reliable and exclusive, it can be used for the quality control of Jianwei mixture.

KEYWORDS: Jianwei mixture; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; Coptidis Rhizoma; stir-baked Aurantii Fructus in bran; naringin; quality control

健胃合剂是依据浙江省中西医结合医院健胃协定方按传统水煎煮法制成的纯中药制剂, 由黄芪、白术、甘草、黄连、蒲公英及麸炒枳壳等中药饮片制备而成, 用于脾胃虚弱所致的慢性胃炎及功能性消化不良。健胃合剂由笔者所在医院制剂室配制供临床使用和研究已有 5 年多, 临床治疗效果良好, 但目前未建立健全的质量标准, 为了更全面控制该制剂的内在质量, 保证其疗效, 本研究参照《浙江省医疗机构应用传统工艺配制中药制剂质量及稳定性研究技术指南》(以下简称《指南》)的要求, 结合目前医院研究现状, 采用薄层色谱法(TLC)鉴别甘草、黄连和麸炒枳壳, HPLC 测定麸炒枳壳中有效成分柚皮苷, 为健胃合剂质量的控制提供一定的参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo U3000 高效液相色谱仪(DAD 二极管阵列检测器, 赛默飞); AL204 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-201814; 纯度: 86.7%)、柚皮苷对照品(批号: 110722-201714; 纯度: 93.4%)、甘草苷对照品(批号: 111610-201607; 纯度: 93.1%)、枳壳对照药材(批号: 120981-201605)、甘草对照药材(批号: 120904-201620)、黄连对照药材(批号: 120913-201611)等

作者简介: 黄芳, 女, 主管中药师 Tel: (0571)56108628
(0571)56109880 E-mail: dujing1166@sina.com

E-mail: hvonne@163.com

*通信作者: 杜静, 女, 主任药师

Tel:

均购自中国食品药品检定研究院；健胃合剂(浙江省中西医结合医院，批号：181003，181004，181005)；甲醇为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 甘草的鉴别 取健胃合剂 20 mL 蒸干，残渣加甲醇 30 mL，加热回流 1 h，滤过，滤液蒸干，残渣加水 40 mL 溶解，正丁醇萃取 3 次，每次 20 mL，合并正丁醇液，用水洗涤 3 次，弃去水液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 5 mL 溶解，作为供试品溶液。另取甘草对照药材 1 g，同法制成对照药材溶液。再取甘草苷对照品，加甲醇制成 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取除甘草外的其他中药饮片，按处方比例及工艺，制备不含甘草的阴性样品，同法制备阴性对照溶液。

按中国药典 2015 年版四部(通则 0502)TLC 试验，吸取上述 4 种溶液各 1~2 μL ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰，置紫外光灯(365 nm)和日光下检视。供试品色谱中，在与对照药材和对照品色谱相应的位置上，分别显相同颜色的斑点或荧光斑点，阴性样品无干扰。结果见图 1。

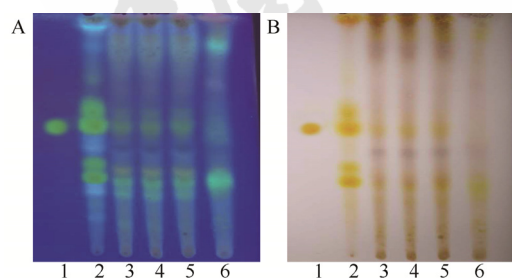


图 1 甘草 TLC 鉴别图

A-紫外光灯(365 nm); B-日光下; 1-甘草苷对照品溶液; 2-甘草对照药材溶液; 3-5-供试品溶液; 6-阴性对照溶液。

Fig. 1 TLC chromatograms of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

A-UV light(365 nm); B-under daylight; 1-liquiritin reference solution; 2-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma reference drug solution; 3-5-sample solution; 6-negative control solution.

2.1.2 黄连的鉴别 取健胃合剂 20 mL 蒸干，残渣加甲醇 25 mL，超声 30 min，滤过，取滤液为供试品溶液。取黄连对照药材 1 g，加水 50 mL，煮

沸 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 25 mL，同法制成对照药材溶液。另取盐酸小檗碱对照品，加甲醇制成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取除黄连外的其他中药饮片，按处方比例及工艺制备不含黄连的阴性样品，同法制备阴性对照溶液。

按中国药典 2015 年版四部(通则 0502)TLC 试验，吸取对照品溶液 2 μL ，供试品溶液和阴性对照溶液各 5 μL ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:0.5:1)为展开剂，置于浓氨试液预饱和 20 min 的展开缸内，展开，取出，晾干，置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中，在与对照药材和对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点，阴性样品无干扰。结果见图 2。

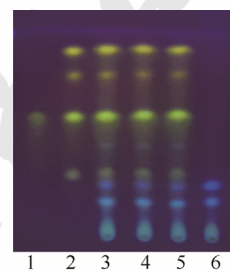


图 2 黄连 TLC 鉴别图

1-盐酸小檗碱对照品溶液; 2-黄连对照药材溶液; 3-5-供试品溶液; 6-阴性对照溶液。

Fig. 2 TLC chromatograms of Coptidis Rhizoma

1-berberine hydrochloride reference solution; 2-Coptidis Rhizoma reference drug solution; 3-5-sample solution; 6-negative control solution.

2.1.3 麸炒枳壳的鉴别 取健胃合剂 20 mL 蒸干，残渣加甲醇 10 mL，超声 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 5 mL 使溶解，作为供试品溶液。另取枳壳对照药材 1 g，加水 50 mL，煮沸 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇 20 mL，同法制成对照药材溶液。再取柚皮苷对照品，加甲醇制成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取除麸炒枳壳外的其他中药饮片，按处方比例及工艺制备不含麸炒枳壳的阴性样品，同法制备阴性对照溶液。

按中国药典 2015 年版四部(通则 0502)TLC 试验，吸取上述供试品溶液、对照药材溶液各 10 μL ，对照品溶液和阴性对照溶液各 20 μL ，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 3%三氯化铝乙醇溶液，在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热约 5 min，

置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性样品无干扰。结果见图 3。

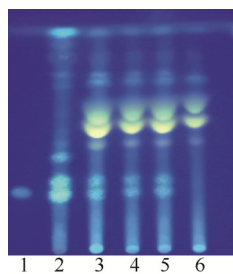


图 3 麸炒枳壳 TLC 鉴别图

1-柚皮苷对照品溶液; 2-枳壳对照药材溶液; 3-5-供试品溶液; 6-阴性对照溶液。

Fig. 3 TLC chromatograms of stir-baked Aurantii Fructus in bran

1-naringin reference solution; 2-Aurantii Fructus reference drug solution; 3-5-sample solution; 6-negative control solution.

2.2 HPLC 含量测定

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2%磷酸(40:60); 检测波长: 283 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C。

2.2.2 柚皮苷对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品适量,加甲醇制成浓度为 0.085 2 mg·mL⁻¹ 的柚皮苷对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇适量超声(250 W, 40 kHz) 30 min, 放冷, 定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2.4 专属性试验 按健胃合剂处方比例及工艺, 同法制成不含麸炒枳壳的阴性样品, 按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液, 精密吸取柚皮苷对照品、供试品及阴性样品溶液各 5 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。结果表明, 阴性样品无干扰。结果见图 4。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下柚皮苷对照品溶液适量, 逐级稀释共得 5 份对照品溶液系列, 浓度依次为 0.085 2, 0.042 6, 0.021 3, 0.010 7, 0.005 3 mg·mL⁻¹, 在“2.2.1”项色谱条件下, 分别精密吸取上述对照品溶液各 5 μL 注入高效液相色谱仪。以峰面积(Y)对浓度(X, mg·mL⁻¹) 线性回归, 回归方程: $Y=10\,294X-4.172\,1$, $R^2=1.000$, 在 0.005 3~0.085 2 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.2.6 仪器精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下柚皮苷对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 5 次, 测定柚皮苷 RSD 为 0.34%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取健胃合剂(批号: 181003), 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 测得柚皮苷平均含量为 0.879 mg·mL⁻¹, RSD 为 1.12%, 表明该方法重复性良好。

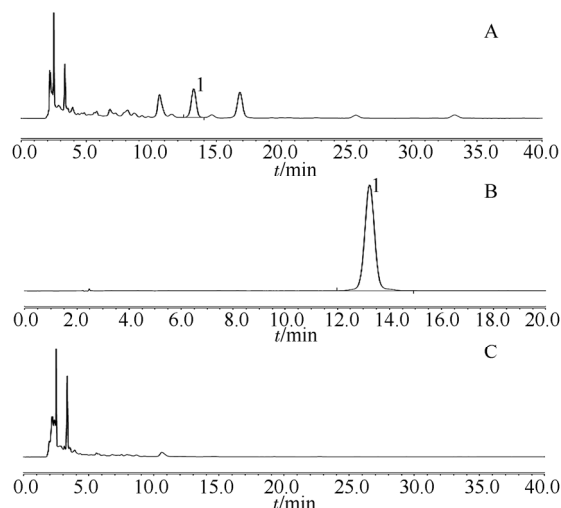


图 4 HPLC 色谱图

A-健胃合剂; B-柚皮苷对照品溶液; C-阴性样品溶液; 1-柚皮苷。

Fig. 4 Chromatogram of HPLC

A-Jianwei mixture; B-naringin reference solution; C-negative sample solution; 1-naringin.

2.2.8 稳定性试验 取健胃合剂(批号: 181003), 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 内测定, 测得柚皮苷 RSD 为 0.23%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.2.9 加样回收率试验 精密量取已知含量的健胃剂(批号: 181003) 0.50 mL 共 6 份, 分别加入一定量柚皮苷标准品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算公式如下。结果回收率平均值为 99.42%, RSD 为 0.76%。结果见表 1。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测得量} - \text{样品含量}}{\text{对照品加入量}} \times 100\%$$

2.2.10 样品含量测定 取 3 个批号的健胃合剂各 2 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 外标法计算含量。结果见表 2。

表 1 柚皮苷加样回收率

Tab. 1 Average recovery of naringin

取样量/ mL	样品中 含量/mg	加入对照 品量/mg	测得量/ mg	加样回 收率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
0.50	0.440	0.359	0.796	99.30	99.42	0.76
			0.793	98.40		
			0.806	101.93		
			0.790	97.39		
			0.802	100.83		
			0.794	98.66		

表 2 样品测定结果

Tab. 2 Results of the measurement samples mg·mL⁻¹

批号	柚皮苷含量	平均含量
181003	0.887	0.881
	0.875	
181004	0.741	0.736
	0.731	
181005	0.852	0.858
	0.865	

3 讨论

本研究对方中的黄芪、白术、甘草、黄连、蒲公英及麸炒枳壳 6 个药味进行 TLC 研究,符合《指南》中处方药味在 10 味以上者应对三分之一以上药味进行研究的要求。结果发现,白术和黄芪 2 个药味存在明显的阴性干扰,蒲公英药味的主斑点分离效果不佳。通过查阅中国药典及相关文献对甘草、黄连及麸炒枳壳 3 味药 TLC 的展开系统、专属性和耐用性进行考察。每个药味都选择了多种展开系统进行展开比较,其中,参考文献中甘草 TLC 展开系统^[1-4],乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2),斑点清晰、圆整度高,易于区分;参考文献中黄连 TLC 展开系统^[5-6],优选环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:0.5:1);参考文献中麸炒枳壳 TLC 展开系统^[7-8],优先选择三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液。同时结果也表明阴性样品无干扰,方法专属性良好,且不同品牌的薄层板及温度、湿度变化可导致色谱效果略有不同,但均能达到良好的分离效果,方法的耐用性较好。

本研究在预实验中选取了处方中君药黄芪的

黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷进行含量测定,结果含量均低于万分之二,不符合《指南》要求,不适合作为含量测定的指标。故选取麸炒枳壳中的柚皮苷作为指标性成分,方法学考察了专属性、线性关系、精密度、重复性、稳定性及加样回收率,结果表明试验方法较好,误差小,可用于健胃合剂中柚皮苷含量的测定。

由于中药化学组成的复杂性,柚皮苷并不能涵盖健胃合剂全部的药效物质和药理作用,但可以作为其化学组成中具有一定药理活性的指标性成分,在某种程度上用于判断制剂工艺或药品稳定性方面的变化趋势。现代研究认为中药具有多组分、多作用、多层次、多途径和多靶点的综合作用。柚皮苷含量的变化,极有可能影响其他活性成分的提取和稳定性,导致药效物质基础发生变化,而此种变化在某些情况下可以通过指标性成分的测定反映。另外,确保中药生产工艺的稳定性也是保证中药制剂物质基础相对一致的重要条件。

本研究仅考察了 3 种成分的含量测定方法,还不能完全反映方内各饮片质量是否符合要求,下一步拟对该方诸药指纹图谱进行深层次的探究,建立更完整的质量控制方法。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y P, XU W X, CHEN J R. Identification method of ganjie liyan granules by TLC [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2008, 20(1): 58-59.
- [2] 洛英霞. 健心颗粒中丹参、黄芪、甘草、玄参的薄层色谱鉴别[J]. 实用中医内科杂志, 2006, 20(1): 91.
- [3] 段国玲, 王丽, 赵春香. 清咽利喉颗粒主成分的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2011, 20(24): 45.
- [4] 王光函, 赵玥, 邹桂欣. 化胃舒颗粒的定性鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1978-1979.
- [5] GUO S J, DENG X M, SHEN Z Q. TLC identification of coptidis rhizoma and Forsythia in qingwen baidu keli [J]. Acta Ecol Animalis Domastici(家畜生态学), 2012, 33(5): 68-70.
- [6] 刘红, 刘华. 薄层色谱法分离黄连素、咖啡因时展开剂的选择[J]. 贵阳医学院学报, 2005, 30(4): 378-381.
- [7] LIU J L. Study on quality standards for tiaogu tablet [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2008, 12(2): 125-126.
- [8] 王维庭, 王雪梅, 徐恒雁, 等. 清肠疏风凉血胶囊的质量标准研究[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(7): 282-284.

收稿日期: 2018-10-03

(本文责编: 沈倩)