

· 研究报告 ·

高效液相色谱法测定降脂护肝胶囊中葛根素的含量

郑巍,倪东杰,韦庆,向会,胡兰兰,孙亮(解放军98医院,浙江湖州313000)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定降脂护肝胶囊中葛根素的含量。方法 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-1% 甲酸(11 : 89), 检测波长 250 nm, 流速 1.0 ml/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μl。结果 葛根素在 2~40 μg/ml 范围内($r=0.9998$)呈良好的线性关系, 精密度实验中 RSD 均小于 2%, 加样回收率在 98%~103%。结论 该测定方法简便、准确, 分离效果好, 可用于降脂护肝胶囊的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 降脂护肝胶囊; 葛根素; 含量测定

[中图分类号] R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)03-0259-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.016

Determination of puerarin in Jiangzhi Hupan capsule by HPLC

ZHENG Wei, NI Dongjie, WEI Qing, XIANG Hui, HU Lanlan, SUN Liang (No. 98 Hospital of PLA, Huzhou 313000, China)

[Abstract] **Objective** To develop a HPLC method for determination of puerarin. **Methods** The separation was carried out on a Waters Symmetry C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase was composed of acetonitrile and 1% formic acid(11 : 89), the detection wavelength was set at 250 nm, the flow rate was 1.0 ml/min, the column temperature was 30 °C and the injection volume was 10 μl. **Results** The linearity was obtained over 2~40 μg/ml ($r=0.9998$) for puerarin. The RSD of precision were less than 2%. The average recovery was between 98% and 103%. **Conclusion** This HPLC method was simple, accuracy and suitable for the quality control of Jiangzhi Hupan capsule.

[Key words] HPLC; Jiangzhi Hupan capsule; puerarin; content determination

降脂护肝胶囊为本院配制的纯中药胶囊剂,由山楂、茵陈、葛根、决明子和姜黄 5 味药材组成,具有平肝降脂,清肝明目之功效,适用于高脂血症、脂肪肝、酒精肝、肝硬化、肥胖症等^[1,2]。在现行的质量标准中[NFB-(Z264)-2014],已成功建立了一套质量控制体系,其中以检测熊果酸的含量来控制降脂护肝胶囊的质量^[3],在后续工作中又对绿原酸进行了含量测定^[4]。本着提高标准的原则,我们再增加了葛根素的含量测定,以期进一步完善质量标准,确保该产品质量稳定可靠。

1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪, Waters 2489 双波紫外可见光长检测器, Empower 3 工作站[沃特世科技(上海)有限公司, 美国]; 756PC 紫外可见

光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); KQ2200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Sartorius BS 124S 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司, 德国]。

葛根素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110752-201313, ID: BQ9Z-24NR, 纯度 98%); 降脂护肝胶囊(本院制剂室自制, 规格为每粒 0.4 g, 每瓶 50 粒); 乙腈为色谱纯[霍尼韦尔贸易(上海)有限公司]; 水为重蒸去离子水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-1% 甲酸(11 : 89), 流速 1.0 ml/min, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取葛根素对照品 8.0 mg, 置 10 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到 0.8 mg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取降脂护肝胶囊 10 粒, 将内

[作者简介] 郑巍, 学士, 助理工程师, 研究方向: 天然药物化学。Tel: 15167295527; Email: 279493365@qq.com

[通讯作者] 孙亮, 博士, 主管药师, 研究方向: 中药制剂质量标准研究。Tel: (0572)3269548; Email: 13701764547@163.com

容器混匀,精密称取 0.25 g,置 100 ml 具塞锥形瓶中,加 100% 甲醇约 25 ml,超声 45 min,冷却至室温,过滤,滤液移至 25 ml 棕色容量瓶中,加 100% 甲醇至刻度,摇匀。精密吸取 2 ml 至 10 ml 棕色容量瓶中,加水稀释至刻度,用微孔滤膜(0.22 μm)过滤,即得。

2.2.3 阴性样品溶液

以相同处方比例,按降脂护

肝胶囊制备工艺制备不含葛根的阴性样品,再按照“2.2.2”项下方法制备得到阴性样品溶液。

2.3 系统适用性考察 取供试品溶液及对照品溶液各 10 μl ,按“2.1”项下色谱条件进样。结果表明,葛根素与其他干扰峰分离良好,分离度均大于 1.5,保留时间为 12.8 min,理论塔板数大于 5 000,见图 1。

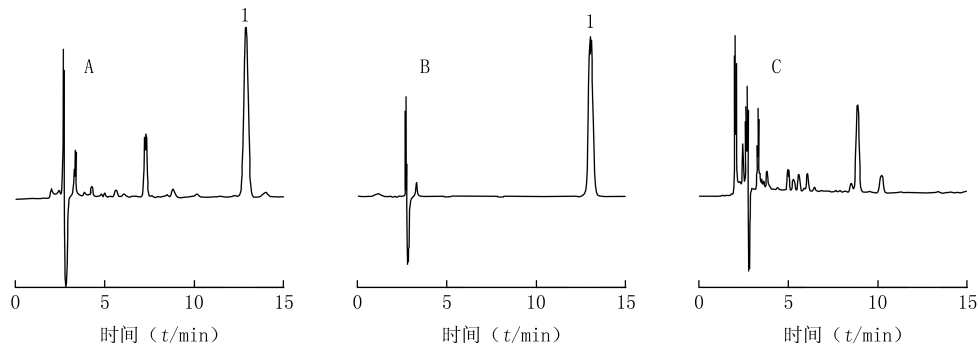


图 1 降脂护肝胶囊液相色谱图

A.降脂护肝胶囊;B.葛根素对照品;C.阴性对照;1.葛根素

2.4 专属性考察 取供试品溶液、阴性样品溶液及对照品溶液各 10 μl ,按“2.1”项下色谱条件进样。结果表明,阴性对照中无其他杂质峰对葛根素形成干扰,见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取葛根素对照品溶液 0.5 ml 和 0.4 ml 分别置 10 ml 容量瓶中,加 25% 甲醇至刻度,配制成 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液。再取上述两种对照品溶液各 5 ml 至 10 ml 容量瓶中,以 25% 甲醇依次对半稀释,分别配制成 20、16、10、8、5、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液。精密吸取上述溶液各 10 μl ,按“2.1”项下色谱条件进样,测定葛根素峰面积值,以葛根素峰面积值(Y)为纵坐标,葛根素浓度(X)为横坐标,作线性回归,绘制标准曲线。结果表明,葛根素在 2~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=41\,972X-12\,558$ ($r=0.999\,8, n=3$)。

2.6 精密度考察 取 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的葛根素对照品溶液,重复进样 6 次,连续 3 d,按“2.1”项下色谱条件进样,记录葛根素的峰面积,其日内 RSD 为 0.51%,日间 RSD 为 0.55%。实验结果表明,本法精密度较好。

2.7 重复性考察 称取降脂护肝胶囊(批号 140305),按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件进样,葛根素的平均含量为 6.55 mg/g ,RSD 为 0.91%,结果表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样,记录葛根素峰面积值,其 RSD 为 0.76%,表明葛根素在 24 h 内稳定。

2.9 回收率考察 精密量取已知含量的降脂护肝胶囊样品 6 份(批号 140305,葛根素含量为 6.59 mg/g),分别精密加入葛根素对照品储备液 1.0 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,按“2.5”项下的标准曲线方程计算葛根素含量,求得回收率,结果见表 1。

表 1 葛根素的加样回收率试验结果($n=6$)

加入量 (m/mg)	取样量 (m/g)	原有量 (m/mg)	实测量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.80	0.123 5	0.81	1.61	99.52	99.83	2.21
0.80	0.120 6	0.79	1.57	96.91		
0.80	0.125 0	0.82	1.63	100.78		
0.80	0.121 8	0.80	1.63	103.42		
0.80	0.120 2	0.79	1.58	98.49		
0.80	0.124 6	0.82	1.62	99.86		

2.10 样品含量测定 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,对 5 批降脂护肝胶囊进行葛根素的含量测定,结果见表 2。

根据结果,可暂定降脂护肝胶囊中葛根素的含量不得低于 5.5 mg/g 。

表2 样品中葛根素含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

批号	含量($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
140305	6.59±0.08
140410	6.23±0.11
140522	5.90±0.05
140724	6.85±0.09
140912	6.44±0.07

3 讨论

3.1 葛根素的选择 降脂护肝胶囊为本院协定处方,其中,山楂为君药,茵陈为臣药,决明子为佐药,葛根与姜黄活血行气散瘀,同为使药。葛根素是葛根中的主要成分,具有扩张冠状动脉、改善缺血心肌的代谢;降低血液黏稠度,减慢心率,减少心肌耗氧量;降血糖,降血脂,消除自由基和抗脂质过氧化;抗动脉粥样硬化,改善脑循环,抑制血小板凝聚;解酒等多种作用^[5-7],与降脂护肝胶囊的功效相符。《中华人民共和国药典》对葛根药材也以葛根素作为质控指标^[8],其他含有葛根的中成药制剂也大多如此^[9-12]。因此,葛根素可作为降脂护肝胶囊质量控制的指标性成分。

3.2 提取条件的优化 本研究以超声为提取方法,对超声时间、提取溶剂种类与浓度进行了考察。分别考察了同等溶剂条件下,超声 30、45、60 min 的提取效率。结果表明,超声 30 min 的提取效率稍低,而 45 min 和 60 min 的提取效率无统计学意义上的差异,因此,确定超声时间为 45 min。在《中华人民共和国药典》中^[8]以 30% 乙醇来提取葛根素,我们对比了 30% 乙醇与 30% 甲醇对葛根素的提取效率,结果表明两者之间并无明显差异,因此选择了相对易得的甲醇作为提取溶剂。对 10%、30%、50%、80%、100% 甲醇的提取效率进行对比,发现提取效率与甲醇浓度之间并无特定关联,50% 甲醇与 100% 甲醇提取效果最好,其次为 10% 甲醇与 30%

甲醇,80% 甲醇的提取效果最差。这可能与葛根素的结构有关,葛根素为碳-碳苷结构的异黄酮衍生物,脂溶性与水溶性均较差,有一定的特殊性。另外,所有浓度的甲醇提取液均产生絮状不溶物或沉淀,但是除 100% 甲醇外,其余浓度甲醇提取液过滤速度非常缓慢,这也是选择 100% 甲醇为提取溶剂的另一个主要原因。

【参考文献】

- [1] 郭良君,孔飞飞.降脂护肝胶囊辅助治疗高血脂症疗效及安全性评价[J].现代中西医结合杂志,2014,23(18):1967-1968.
- [2] 邱一华,谭俊铭,沈洁,等.降脂护肝胶囊治疗脂肪肝临床观察[J].中国医药,2013,8(10):1422-1424.
- [3] 陆萍,谭兴起,郭良君,等.降脂护肝胶囊质量标准研究[J].中国医药导报,2010,7(34):49-51.
- [4] 陆萍,倪东杰,郭良君.HPLC法测定降脂护肝胶囊中绿原酸含量[J].中国药师,2013,16(6):847-848.
- [5] 白群华,李文明,刘洪涛,等.葛根素对脂多糖诱导 N9 小胶质细胞激活的抑制作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(3):227-230.
- [6] Zheng P, Ji G, Ma Z, et al. Therapeutic effect of puerarin on non-alcoholic rat fatty liver by improving leptin signal transduction through JAK2/STAT3 pathways [J]. Am J China Med, 2009,37(1):69-83.
- [7] 葛晓航.纳络酮联合维生素 C、葛根素救治急性酒精中毒疗效分析[J].山东医药,2009,49(25):92-93.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2010 年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010,312-313.
- [9] 黄樱华,黄月纯,王祝彬,等.葛根骨康宁颗粒中葛根素的含量测定研究[J].中国药师,2012,15(2):186-188.
- [10] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定苍苓止泻口服液中药根素的含量[J].实用药物与临床,2013,16(8):714-715.
- [11] 毕何锋,张婕,蒋东旭,等.HPLC法测定柴葛解肌汤中葛根素的含量[J].中国药师,2014,17(1):161-162.
- [12] 范云飞,梁爱君,贾永慧,等.冠舒滴丸中葛根素的含量测定[J].解放军药学报,2012,28(2):159-161.

【收稿日期】 2015-03-13 【修回日期】 2015-07-12

【本文编辑】 顾文华