

养脑宁心颗粒质量标准研究

赵锐 张丽

(陕西中医药大学第二附属医院, 咸阳, 712000)

摘要 目的:建立养脑宁心颗粒的质量标准。方法:选取薄层色谱法方法养脑宁心颗粒处方中牡丹皮、山茱萸、枸杞子进行定性鉴别;用高效液相色谱法测定养脑宁心颗粒中葛根指标性成分葛根素的含量。结果:在薄层色谱图中,在与对照药材色谱图相应的位置上,可见相同颜色的牡丹皮、山茱萸、枸杞子荧光斑点相对应;葛根素进样量0.23~1.15 μg,呈良好的线性关系, $r=0.999\ 9$,平均回收率:98.5%,RSD为0.81%。结论:该方法简单易行,重复性良好,可作为养脑宁心颗粒制剂质量控制标准。

关键词 养脑宁心颗粒;葛根;葛根素;牡丹皮;山茱萸;枸杞子;薄层色谱法;高效液相色谱法

Research on Quality Standard of Yangnao Ningxin Granules

Zhao Rui, Zhang Li

(The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

Abstract Objective: To establish the quality standard of Yangnao Ningxin Granules. **Methods:** TLC method was used to qualitatively identify the Cortex Moutan Radicis, Fructus Corni and Fructus Lycii in the prescription. The content of puerarin in peony was determined by HPLC. **Results:** In the thin-layer chromatogram, the corresponding spots of the corresponding color of the Cortex Moutan Radicis, Fructus Corni and Fructus Lycii spots correspond to the same color; the puerarin injection volume was 0.23 ~ 1.15 μg, showing a good linear relationship ($r = 0.999\ 9$), average recovery: 98.5%, RSD 0.81%. **Conclusion:** The method is simple, easy to repeat, and can be used as a quality control standard for the preparation.

Key Words Yangnao Ningxin Granule; Radix Puerariae; Puerarin; Cortex Moutan Radicis; Fructus Corni; Fructus Lycii; TLC; HPLC

中图分类号: R289.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.07.007

养脑宁心颗粒由葛根、山茱萸、牡丹皮、枸杞子、甘草等多味中药材组成,具有滋养心肾、安神定志的功效,临床上主要用于心肾阴虚型头晕耳鸣、健忘失眠、腰膝酸软等症。方中熟地黄、山茱萸、枸杞子、麸炒山药、白芍滋补肝肾、养血益精、补脾益气;茯苓、柏子仁养心安神、健脾;葛根、牡丹皮清热凉血、生津止渴;配以甘草补脾益气、调和诸药;全方共奏滋养心肾、安定神志之功效。方中以大量使用的葛根为君药,葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根,多于秋、冬二季采挖。味甘、辛,性凉。归脾胃肺经,具有解肌退热、生津止渴,透疹,升阳止泻的功效,临床多用于外感发热、口渴、消渴等症^[1],其主要成分为皂苷类、异黄酮类及三萜类,其中异黄酮类为葛根的主要活性成分,包括葛根素、3-羟基葛根素、葛根素-木糖苷、3-甲氧基葛根素等^[2]。现代药理学研究发现,葛根素可明显提高心肌细胞 P9C2eNOS 蛋白和基因表达,通过调节一氧化氮含

量及其合酶表达,从而发挥对心血管系统的保护作用,还可通过调节垂体后叶素的分泌,降低心律失常的发生^[3-4]。现代研究还发现葛根素还具有解热、镇痛、降血糖、降血脂、抗氧化等药理作用^[5-8]。

养脑宁心颗粒是陕西中医药大学第二附属医院心脑血管专家,以辨证论治为基础,根据中医药理论,结合临床实践,总结多年的经验组方。临床使用疗效显著,不良反应小,为适应现代化发展及众多患者的需求,我们将传统的中药汤剂进行剂型改良,改良后的颗粒剂方便患者的携带和服用,也在一定程度上改善了该药的口感,市场前景广阔,具有开发意义。为了控制养脑宁心颗粒的质量,保证其疗效,该试验从薄层色谱定性实验和高效液相色谱定量实验入手,探讨该制剂的质量标准,从而为临床应用提供可靠的试验资料和数据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 ZF-20D 型暗箱式紫外分析仪(上海光

基金项目:陕西省中医药管理局 2017~2018 年度中医药科学技术课题(ZYMS015)

作者简介:赵锐(1987.09—),女,硕士研究生,主管中药师,研究方向:中药制剂及院内制剂开发,E-mail:929210296@qq.com

通信作者:张丽(1987.04—),女,硕士研究生,主管中药师,研究方向:中药制剂,E-mail:379735536@qq.com

豪分析仪器有限公司),DYQC型医用超声波提取器(连云港欧倍洁医疗设备有限公司),十万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),DHG-9140型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试剂 本实验中所用甲醇为色谱纯,乙醇等化学试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

1.3 分析样品 牡丹皮对照药材(批号121490-201102)、山茱萸对照药材(批号121495-201303)、枸杞子对照药材(批号121072-201410)、葛根素(批号110752-201615)购于中国药品生物制品检定所。养脑宁心颗粒样品(批号160426、160427、160428)由陕西中医药大学第二附属医院制剂室生产提供。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 牡丹皮的薄层色谱鉴别 养脑宁心颗粒研细,准确称取粉末5.6 g,置于圆底烧瓶中,量取并加入乙醚50 mL,加热回流1 h,滤过,滤液低温挥发干,精密量取正己烷0.5 mL使残渣溶解,即为供试品溶液。称取牡丹皮对照药材4.3 g,木香对照药材溶液的制备方法同上。参照《中华人民共和国药典》2015年版四部通则0502,精密吸取供试品溶液4 μ L、木香对照药材溶液5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-丙酮-乙酸乙酯(84:15:1)为展开剂,预饱和15 min,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视^[9-10]。供试品色谱中,可见相同颜色的斑点与对照药材色谱的斑点相对应,且位置相同。见图1。

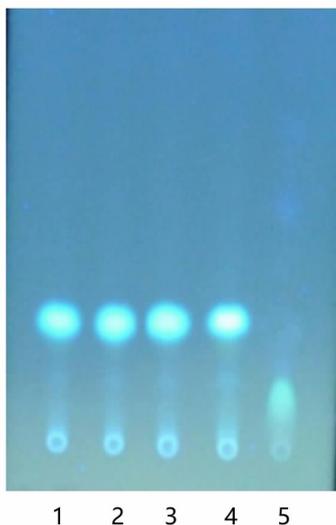


图1 牡丹皮薄层色谱法(TLC)色谱图

注:1~3:供试品;4:对照药材;5:阴性

2.1.2 山茱萸的薄层色谱鉴别 养脑宁心颗粒研

细后,准确称取5.2 g粉末,置于具塞的锥形瓶中,量取并加入10 mL无水乙醇,放入超声仪中15 min,滤过,滤液蒸干,精密量取2 mL无水乙醇使残渣溶解,即为供试品溶液。称取山茱萸对照药材2.8 g,山茱萸对照药材溶液制备方法同上。参照《中华人民共和国药典》2015年版四部通则0502,精密吸取供试品溶液、山茱萸对照药材溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-乙醇-冰醋酸(50:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷显色剂5%香草醛硫酸溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。供试品色谱中可见紫红色的斑点与对照药材相对应,且位置相同。见图2。

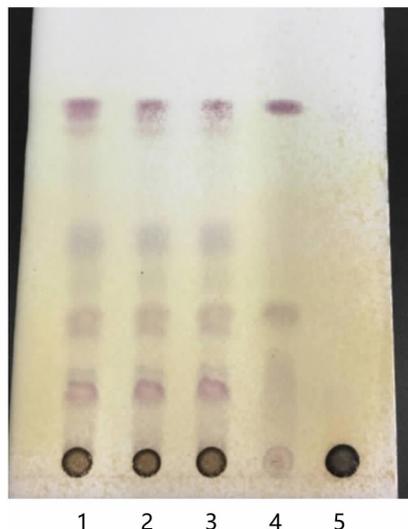


图2 山茱萸薄层色谱法(TLC)色谱图

注:1~3:供试品;4:为对照药材;5:为阴性

2.1.3 枸杞子的薄层色谱鉴别 取适量养脑宁心颗粒研细,准确称取粉末5.4 g,置于烧瓶中,量取并加入35 mL水,煮沸15 min,放冷,滤液放于分液漏斗中,量取乙酸乙酯15 mL振摇提取,分取乙酸乙酯液,置水浴锅上浓缩至1 mL,即为供试品溶液。称取枸杞子对照药材0.57 g,枸杞子对照药材溶液制备方法同上。参照《中华人民共和国药典》2015年版四部通则0502,精密吸取供试品溶液、枸杞子对照药材溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲酸(3:2:1)为展开剂。展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中可见相同颜色的斑点与对照药材相对应,且位置相同。见图3。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为:Angilent C₁₈(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm);流动相:甲醇-水(25:75),柱温:30 $^{\circ}$ C,检测波长:250 nm,理论板数按葛根素峰计应

不低于 3 000^[11-14]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品 4.633 mg, 置于 100 mL 容量瓶, 30% 乙醇溶液定容, 制成每 100 mL 含 4.633 mg 的对照品溶液。

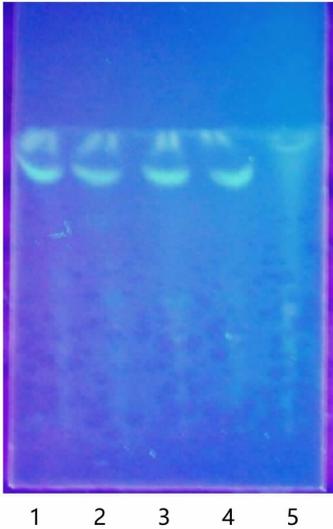


图3 枸杞子薄层色谱法(TLC)色谱图

注:1-3. 供试品;4. 为对照药材;5. 为阴性

2.2.3 供试品溶液的制备 养脑宁心颗粒研细, 精密称取粉末 1.234 4 g, 置于锥形瓶中, 移液管移取 50 mL 的 30% 乙醇, 加入锥形瓶, 密塞, 准确称量并记录, 放入超声仪, 30 min 后取出, 放凉, 称量并记录, 用 30% 乙醇补足此过程减少的重量, 充分摇匀, 取续滤液, 即为供试品溶液。

2.2.4 专属性试验 精密量取葛根素对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL, 分别注入高效液相色谱仪, 设定方法, 测定, 根据高效液相图谱, 阴性对照样品在葛根素相对保留时间处未见色谱峰, 结果显示阴性样品对该方法检测几乎无干扰。见图 4。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取葛根素对照品溶液(C = 46 μg/mL) 5、10、15、20、25 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以葛根素对照品溶液的进样量(X)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线。得出葛根素回归方程 Y = 3 378.5X + 23.745, r = 0.999 9, 结果表明葛根素对照品溶液进样量在 0.23 ~ 1.15 μg, 峰面积线性关系良好。见表 1。

2.2.6 中间精密度试验 取批号为 161105 的养脑宁心颗粒, 制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 每次精密吸取 10 μL, 按上述条件测定, 葛根素峰面积的 RSD:0.06%。见表 2。

2.2.7 供试品溶液稳定性试验 养脑宁心颗粒批

号 161105 的供试品溶液, 精密移取 5 μL, 分别于 0、4、8 h 进样, 测定养脑宁心颗粒中, 葛根素的峰面积。葛根素峰面积 RSD 为 0.26%, 即养脑宁心颗粒供试品溶液稳定性在 8 h 内良好。

2.2.8 重复性试验 养脑宁心颗粒批号 161105 的样品, 均匀分为 6 份, 制备供试品溶液, 每次精密量取 10 μL, 进样, 测定, 根据结果: 葛根素平均含量为 5.560 28 mg/g, RSD 为 1.97%。

2.2.9 回收率试验 取批号为 161105 的养脑宁心颗粒样品, 均匀分为 9 份, 已知葛根素 5.602 8 mg/g, 称取样品约 1 g, 6 份养脑宁心颗粒样品中精密加入一定量的葛根素对照品溶液进行测定, 并计算回收率, 根据结果计算, 平均回收率: 98.50%, RSD: 0.81%。见表 3。

2.2.10 样品测定结果 养脑宁心颗粒 3 批样品, 生产批号分别为 161030、161105、161109, 制成供试品溶液, 注入液相色谱仪, 测定峰面积积分值, 用外标法计算养脑宁心颗粒中葛根素质量分数。见表 4。

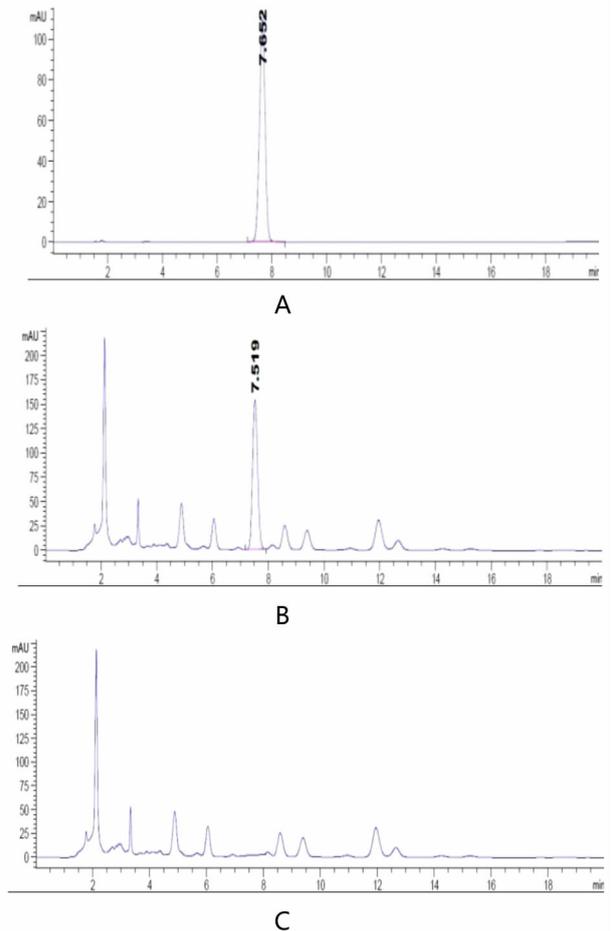


图4 葛根素对照品、养脑宁心颗粒样品和养脑宁心颗粒阴性对照品高效液相图谱

注:A. 葛根素对照品;B. 养脑宁心颗粒样品;C. 养脑宁心颗粒阴性对照品

表1 葛根素标准曲线测定结果

进样量(μg)	峰面积(A_1)	峰面积(A_2)	平均峰面积(A)
0.23	790.2	790.5	790.35
0.46	1 581	1 579.9	1 580.45
0.69	2 362.9	2 363.5	2 363.2
0.92	3 149.3	3 149.5	3 149.4
1.15	3 887.2	3 895.1	3 891.15

表2 精密度试验结果

次数(次)	1	2	3	4	5
面积	1 853.2	1 852.6	1 852.9	1 854.2	1 855.2
RSD(%)	0.06				

表3 回收率试验结果

序号	取样量(g)	已知量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	RSD(%)
1	0.075 0	0.420 210	2.116	2.514 0	98.50	0.81
2	0.068 0	0.380 990	2.116	2.490 9		
3	0.079 2	0.443 742	2.116	2.505 7		
4	0.324 1	1.815 867	2.668	4.422 8		
5	0.509 1	2.852 385	2.668	5.489 6		
6	0.372 7	2.088 164	2.668	4.723 9		
7	0.462 9	2.593 536	3.22	5.775 2		
8	0.452 8	2.536 948	3.22	5.719 9		
9	0.479 2	2.684 862	3.22	5.819 9		

表4 葛根素的测定结果($n=3$)

批号	质量分数(mg/g)			平均质量分数(mg/g)	RSD(%)
	1	2	3		
160426	5.650 6	5.498 1	5.502 8	5.550 5	1.56
160427	5.548 0	5.565 0	5.521 4	5.544 8	0.40
160428	5.039 5	5.042 4	5.051 7	5.044 5	0.13

根据3批养脑宁心颗粒含量测定的结果,暂定养脑宁心颗粒每袋含葛根以葛根素($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$)计,不得少于40 mg。

3 讨论

3.1 提取溶剂浓度的确定 通过预实验,我们对养脑宁心颗粒供试品溶液制备过程中,提取溶剂的浓度进行了方法学的考察及验证,预实验结果显示:30%乙醇提取的养脑宁心颗粒供试品中葛根素的含量高于70%乙醇或甲醇作为提取溶剂,制备的养脑宁心颗粒供试品中葛根素的含量,故结合《中华人民共和国药典》2015年版1部,选定30%乙醇为该实验的提取溶剂^[15-17]。

3.2 供试品溶液制备方法的确定 取养脑宁心颗粒适量,研细后,精密称取1.237 8 g、1.400 5 g、1.302 7 g,分别放于圆底烧瓶及具塞的锥形瓶中,分别用移液管量取并加入30%乙醇50 mL,准确称量并记录,圆底烧瓶放入水浴锅加热回流30 min、锥形

瓶放入超声仪,于超声30 min、45 min后取出,放凉,分别称量并记录,用30%乙醇补足此过程减少的重量,充分摇匀,取续滤液,即为供试品溶液。分别检测3种提取方法制备的供试品中葛根素的含量。结果显示,超声30 min制备的养脑宁心颗粒供试品中葛根素的含量与超声45 min、加热回流30 min供试品中葛根素的含量几乎相同,提示超声30 min供试品中葛根素已完全提取,葛根素的含量并不随超声时间的延长而增加,根据简便易行的原则,故选30%乙醇超声30 min作为制备养脑宁心颗粒供试品的制备方法。

本实验从薄层色谱鉴别和含量检测2方面入手,对方中牡丹皮、山茱萸、枸杞子3味中药材进行薄层色谱鉴别,对方中君药葛根进行指标性成分葛根素含量的测定,从而建立该制剂的质量标准。该试验方法操作简单、重复性高,结果稳定,可用于同种剂型中药制剂的质量检测。目前大多数中药制剂主要从薄层色谱定性鉴别和高效液相色谱法含量检测两方面入手,选取制剂处方中的部分药材进行检测,制定其质量标准。

中药制剂主要为复方制剂,以辨证论治为基础,根据中医药理论组方而成,大多数的院内制剂,为临床使用的经验方,长期临床应用疗效显著,不良反应小,深受患者的好评,但是传统中药以汤剂为主,其口感差,携带不便等缺点降低了患者服药的依从性。随着近年来中药制剂的现代化发展及院内制剂的开发,越来越多的经方、验方被人们发掘出来,为了适应现代化的发展及患者的服用及携带需求,中药汤剂被逐渐改良为现代剂型,同时对中药制剂的质量要求也越来越高,为了确保其原有疗效及临床使用的安全性,运用现代化技术探讨并建立其质量标准,检测中药制剂中指标性成分及其含量范围,对确保中药制剂的质量及稳定性生产具有重要意义。

养脑宁心颗粒由葛根、牡丹皮、山茱萸、枸杞子等10味中药材配伍而成,其发挥的作用是处方中各味中药材共同作用的结果,而且中药成分复杂,为了更进一步研究发挥作用的有效成分及物质基础,这就要求我们在今后的试验研究中,从处方中各味中药材入手,根据中医药理论及药物之间的配伍关系,运用多种检测方法对其进行研究,从而制定更完善的质量标准,为临床安全使用提供可靠的数据和试验研究资料。

参考文献

[1] 赵燕宜,范志霞,黄坤,等.中华人民共和国药典[S].1部.北京:

- 中国医药科技出版社,2015:333.
- [2]张瑞婷,周涛,宋潇潇,等. 葛根的活性成分及其药理作用研究进展[J]. 安徽农业通报,2018,24(1):15-17.
- [3]温霞,陈士林,Cheung F,等. 葛根素对心肌细胞一氧化氮影响的研究[J]. 中国心血管病研究杂志,2006,4(10):777-779.
- [4]周添浓,王艳,侯少贞,等. 葛根素对心脑血管保护作用的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2008,6(3):288-290.
- [5]周扬. 葛根汤加减治疗上呼吸道感染外寒内热证的临床效果分析[J]. 中国处方药,2016,14(12):114-114,115.
- [6]段美婷,王婧,余婧,等. 葛根素与阿片类药物联合应用对神经病理性痛的镇痛作用[J]. 西北药学杂志,2015,30(2):162-164.
- [7]张达,李姝玉,王岩飞,等. 黄芪与葛根素联用对 KKAy 小鼠肾脏内质网应激相关 PERK 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志,2017,33(1):166-169,173.
- [8]王安喜,朱晓雨,黄霞,等. 葛根素对大鼠肾脏草酸钙结石形成的影响[J]. 新中医,2017,49(3):5-9.
- [9]冯建安,李希,万英,等. 高效液相色谱法测定解毒退热颗粒葛根素含量[J]. 亚太传统医药,2017,13(21):24-27.
- [10]吴向阳,仰玲玲,仰榴青,等. RP-HPLC 法同时测定野葛的根、茎

- 和叶中葛根素、大豆苷和大豆昔元的含量[J]. 食品科学,2009,30(14):248-252.
- [11]钟宇富,刘国洪,杜英娟,等. 乃乐多薄层鉴别及其葛根素含量测定研究[J]. 中医药导报,2017,23(19):50-52.
- [12]马晓玲,白梦娜,谭睿. 脑复康软胶囊质量标准研究[J]. 中国药业,2015,24(23):94-96.
- [13]刘丽,李军,訾慧,等. 保肝颗粒中葛根素含量测定方法研究[J]. 现代中医药,2015,35(5):186-187,197.
- [14]谢黛,于沫. 高效液相色谱法测定感冒清热软胶囊葛根素含量[J]. 今日药学,2014,24(7):499-501.
- [15]顾菲菲,徐小梅. 小儿热速清口服液中药根素的含量测定[J]. 北方药学,2016,13(9):4-4,5.
- [16]李静,夏成凯,方成武. HPLC 法测定葛酮通络胶囊中葛根素含量[J]. 广州化工,2016,44(4):78-80.
- [17]刘浩文,刘嘉仪,杨妙荣,等. 黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的两种方法的比较研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(6):659-662.

(2018-05-10 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 1657 页)

酮类成分含量最低。这 4 个产地中四川淫羊藿的黄酮类成分含量最高,可能与该产地的地理位置和气候等因素有关。

综上所述,本研究建立的 HPLC 同时测定二仙汤中淫羊藿黄酮类成分中的 4 种主要成分淫羊藿苷、淫羊藿次苷 II、朝藿定 B、朝藿定 C 的含量,这一检测方法不仅操作过程简单便捷,而且方法上具有良好的精密度、稳定性和重复性^[16-17],能够指导临床上二仙汤的复方药物质量控制和新药研发提供研究基础。

参考文献

- [1]薛春苗,张冰,林志健. 仙茅及其有效成分对不同状态 L02 细胞 PXR-CYP3A 的影响研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(19):3348.
- [2]李秀英. 二仙汤合甘麦大枣汤治疗围绝经期综合征的临床疗效分析[J]. 中国医药指南,2018,16(10):191-192.
- [3]吕晓琳,艾浩. 二仙汤对卵巢早衰免疫指标影响的临床观察[J]. 中国妇幼保健,2016,31(9):1811-1813.
- [4]陈世洲,毛国庆. 二仙汤及加减方治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(12):1644-1646,1651.
- [5]刘波,吴琪,刘志文,等. 二仙汤含药血清对过氧化氢诱导成骨细胞骨形成的影响[J]. 中医杂志,2018,59(15):1318-1322.
- [6]石海林. 黄芪桂枝五物汤合二仙汤治疗肩周炎疗效观察[J]. 上海医药,2013,15(2):31-32.

- [7]韩元龙. 加味二仙汤治疗肩周炎 94 例[J]. 浙江中医杂志,2001,36(1):20.
- [8]陈勇,麻丽珍. 二仙汤联合他莫昔芬治疗绝经前晚期乳腺癌的效果[J]. 中国现代药物应用,2019,13(7):144-146.
- [9]花佳佳,张玲燕. 二仙汤加减联合心理干预治疗围绝经期女性失眠的临床分析[J]. 医药前沿,2018,8(28):317-318.
- [10]张乃丹,许红涛,韩婷,等. 用 HPLC 法同时测定二仙汤中 4 种淫羊藿黄酮类成分的含量[J]. 药学服务与研究,2016,16(2):114-117.
- [11]韩晓丽,刘光斌,毛和平,等. 均匀设计法优选金锁二仙口服液的提取工艺[J]. 现代医药卫生,2015,10(3):335-336,339.
- [12]年华,郑汉臣,张巧艳,等. 大孔吸附树脂对复方二仙汤提取物吸附性能的考察[J]. 药学服务与研究,2006,6(4):260-262.
- [13]刘成浩,张蓉,邬国庆,等. HPLC 法测定保健食品中抗坏血酸的组成及稳定性[J]. 食品研究与开发,2018,39(18):172-176.
- [14]陈瑞,糜玲,张丽,等. 高效液相色谱法研究二氢齐墩果酸在人工胃液和肠液中的稳定性[J]. 临床医学进展,2018,8(2):206-209.
- [15]张珊珊. HPLC 在三七总皂苷中 5 种皂苷的含量及稳定性测定中的应用[J]. 医学信息,2015,33(23):279-280.
- [16]傅罗琴,付爱坤,李林,等. 匹多莫德的 HPLC 检测方法及其体外稳定性研究[J]. 中国预防兽医学报,2016,38(5):381-384.
- [17]冉丽红,郭远明,孙秀梅,等. 检测方法精密度的表达与确定——以 HPLC-MS 检测海洋沉积物中六溴环十二烷方法为例[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2017,36(6):540-545,556.

(2019-03-13 收稿 责任编辑:杨觉雄)