

· 工艺与制剂 ·

保济丸中葛根素的含量测定及灭菌方法评价

温金莲, 郭丽冰, 周清, 唐睿, 梁泽铭, 王景芳, 朱盛山\*  
(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立保济丸中葛根素含量的测定方法,评价几种灭菌方法的优劣。方法:以甲醇-水(30:70)为流动相,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 250 nm,柱温 30 ℃,用 RP-HPLC 测定经各种灭菌方法处理的保济丸中葛根素的含量与未经灭菌处理的保济丸中葛根素的含量。结果:葛根素在 4.212 ~ 84.24 mg·L<sup>-1</sup>呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ ),平均回收率 98.18%,RSD 0.44%。湿热蒸汽灭菌方法在 4 种灭菌方法中属最优法。结论:定量测定方法简便、快速、灵敏、结果准确、重复性好,可作为保济丸的质量控制标准。

[关键词] 高效液相色谱法;保济丸;葛根素;钴-60 灭菌法;湿热蒸汽灭菌法;加湿微波灭菌法;微波灭菌法

[中图分类号] R283.6, R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)23-0001-04

Content Determination and Evaluation of Sterilization  
Method in Baoji Pills by HPLC

WEN Jin-lian, GUO Li-bing, ZHOU Qing, TANG Rui, LIANG Ze-ming,  
WANG Jing-fang, ZHU Sheng-shan\*  
(GuangDong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish content determination method of puerarin from Baoji pills, evaluated superiority and inferior of several sterilization method. **Method:** In this method, methanol-water(30:70) at flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> as mobile phase, detection wavelength was 250 nm at 30 ℃. Determined the content of puerarin in Baoji pills by RP-HPLC, which handled by various sterilization methods or without handling by any sterilization method. **Result:** Puerarin showed a good linear relationship at range of 4.212-84.24 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ). Average recovery was 98.18%, and RSD 0.44%. Heat steam sterilization method was the best method in this four methods. **Conclusion:** It was simple, rapid, high sensitivity and accurate with good repeatability and could be used for quality control in Baoji pills.

[Key words] HPLC; Baoji pills; puerarin; cobalt 60 sterilization; heat steam sterilization; humidification microwave sterilization; microwave sterilization

保济丸是广东省名优中成药,具有解表,祛湿,和中的功效<sup>[1]</sup>。为葛根、菊花、厚朴、苍术、白芷、木香等 16 味<sup>[2]</sup>中药粉碎成粉,加辅料制成的丸剂。常用于腹痛吐泻、噎食噎酸、恶心呕吐、肠胃不适、消化不良、舟车晕浪、四时感冒、发热头痛等症,是广东地区乃至东南亚华人家庭常备药品之一<sup>[3]</sup>。在保剂丸的传统工艺中,缺乏良好的灭菌方法,制约了该品种的质量控制。葛根为处方中的主药之一,其主要成分为葛根素等异黄酮类化合物,是保剂丸中水溶性成分的典型代表,但在药典中并未采用其含量作为质量控制指标。为提高保济丸质量控制标准,本文

[收稿日期] 20110708(004)  
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81073045)  
[第一作者] 温金莲,副教授,本科,从事药物分析研究, Tel: 18928842938, E-mail: jinlianwen@126.com  
[通讯作者] \*朱盛山,教授,硕士,从事中药学研究, Tel: 13711186521, E-mail: zhush3@163.com

采用 RP-HPLC 测定保济丸中葛根素含量,以保济丸中葛根素含量为指标,判断不同灭菌方法对药丸中葛根素含量的影响,评价几种灭菌方法的优劣。

## 1 材料

Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪 (G1322A Degasser, G1311A Quat Pump, G1316A TCC, G1314B VWD, 美国安捷伦公司), AUW220D 型电子天平 (SHIMADZU 公司), KH-55AS 型电热恒温干燥箱 (广州市康恒仪器有限公司)。

葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110752-200209), 保济丸成品试样 [未灭菌 ( $W_{未}$ )、钴 60 灭菌 ( $W_{Co-60}$ )] (批号 GG0033, 规格每袋 3.7 g), 保济丸配方粉 A (按配方取各饮片混合后, 先粉碎, 后灭菌所得) 试样 [未灭菌 ( $F_{A未}$ )、湿热蒸汽灭菌 ( $F_{A湿蒸}$ )、加湿微波灭菌 ( $F_{A湿波}$ )、微波灭菌 ( $F_{A微波}$ )]、保济丸配方粉 B (按配方取各饮片混合后, 先灭菌, 后粉碎所得) 试样 [加湿微波灭菌 ( $F_{B湿波}$ )、微波灭菌 ( $F_{B微波}$ )]、野葛阴性对照试样, 均购自佛山冯了性药业有限公司, 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

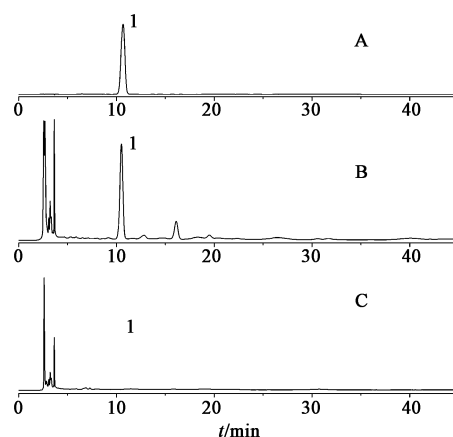
### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取葛根素对照品 10.53 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得含葛根素  $0.2106 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 作为对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取本保济丸研细或保济丸配方粉 A 或保济丸配方粉 B 约 2 g, 精密称定, 置于 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 30% 乙醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用 30% 乙醇补足减失质量, 摇匀, 定量滤纸滤过, 弃去初滤液, 取续滤液,  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 制得供试品溶液。

**2.1.3 野葛阴性对照溶液的制备** 取野葛阴性对照样品, 按 2.1.2 供试品溶液制备方法, 制得野葛阴性对照溶液。

**2.2 色谱条件与系统适用性试验** Welch Materials XB-C<sub>18</sub> 色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), 流动相甲醇-水 (30:70), 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长 250 nm, 柱温  $30^\circ\text{C}$ 。精密吸取葛根素对照品溶液、供试品溶液、野葛阴性对照溶液各  $20 \mu\text{L}$ , 分别进样测定。理论板数以葛根素计算不低于 3000 (图 1)。



A. 对照品; B. 保济丸试样; C. 野葛根阴性对照溶液; 1. 葛根素

图 1 保济丸 HPLC

### 2.3 方法学研究

**2.3.1 标准曲线绘制** 精密吸取葛根素对照品溶液 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 10.00 mL 于 25 mL 量瓶中, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀。分别进样  $20 \mu\text{L}$ , 以葛根素峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标, 对照品溶液质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程  $A = 86.71C + 12.66$  ( $r = 0.9999$ ), 结果表明葛根素在  $4.212 \sim 84.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与峰面积呈良好线性关系。

**2.3.2 精密度试验** 精密吸取 1.00 mL 葛根素对照品溶液于 10 mL 量瓶中, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀。分别进样  $20 \mu\text{L}$ , 日内连续测定 6 次, 日间连续测定 6 d。测得日内葛根素 RSD 0.63%, 日间葛根素 RSD 1.5%。结果表明仪器精密度良好。

**2.3.3 稳定性试验** 精密称取保济丸配方粉 A 试样 [未灭菌 ( $F_{A未}$ )] 2.2414 g, 按照 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 3, 4 d 进样  $20 \mu\text{L}$ , 测得葛根素 RSD 1.3%。结果表明样品在 5 d 内保持稳定。

**2.3.4 重复性试验** 分别取同一批保济丸配方粉 A 试样 [未灭菌 ( $F_{A未}$ )] 6 份, 按照 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 进样  $20 \mu\text{L}$ , 测定葛根素的峰面积, 计算得葛根素平均含量为  $1.024 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 1.0%。结果表明该试验重复性良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 取已知葛根素含量 ( $1.024 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 的保济丸配方粉 A 试样 [未灭菌 ( $F_{A未}$ )] 样品 6 份, 各约 1 g, 精密称定, 分别精密加入葛根素对照品的 30% 乙醇溶液 ( $0.022 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 50 mL, 按照 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 进样  $20 \mu\text{L}$ 。

μL,测得葛根素回收率,结果见表1。葛根素平均回收率为98.18%,RSD 0.44%,结果表明本方法准确可靠。

表1 保济丸中葛根素加样回收率试验

| 取样量<br>/g | 样品中含<br>量/mg | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/% | 平均回收<br>率/% | RSD<br>/% |
|-----------|--------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 1.035 7   | 1.060        | 1.100      | 2.139      | 98.09     |             |           |
| 1.025 4   | 1.050        | 1.100      | 2.138      | 98.91     |             |           |
| 1.027 8   | 1.052        | 1.100      | 2.134      | 98.36     | 98.18       | 0.44      |
| 1.024 9   | 1.049        | 1.100      | 2.126      | 97.94     |             |           |
| 1.045 5   | 1.070        | 1.100      | 2.144      | 97.64     |             |           |
| 1.035 2   | 1.060        | 1.100      | 2.140      | 98.18     |             |           |

2.4 样品含量测定及不同灭菌方法评价 取一定质量的试样,按照2.1.2项下方法制备供试品溶液,或在60℃烘3h,按照2.1.2项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件,进样20 μL,测定葛根素的峰面积,代入回归方程,计算葛根素的含量。结果见表2,3。

表2 保济丸未经烘干的样品葛根素含量测定(n=6)

| 样品        | 灭菌方法              | 葛根素平均质量<br>分数/mg·g <sup>-1</sup> | RSD<br>/% |
|-----------|-------------------|----------------------------------|-----------|
| 保济丸配方粉A试样 | F <sub>A</sub> 湿蒸 | 1.313                            | 1.5       |
|           | F <sub>A</sub> 湿波 | 1.034                            | 1.7       |
|           | F <sub>A</sub> 未  | 1.024                            | 1.0       |
|           | F <sub>A</sub> 微波 | 1.008                            | 1.2       |
| 保济丸配方粉B试样 | F <sub>B</sub> 湿波 | 0.982 9                          | 0.78      |
|           | F <sub>B</sub> 微波 | 0.592 8                          | 0.94      |
| 保济丸试样     | W <sub>未</sub>    | 0.887 5                          | 1.4       |
|           | W <sub>钴-60</sub> | 1.086 4                          | 0.15      |

表3 保济丸经60℃烘干的样品葛根素含量测定(n=6)

| 样品      | 灭菌方法              | 葛根素平均质量<br>分数/mg·g <sup>-1</sup> | RSD<br>/% |
|---------|-------------------|----------------------------------|-----------|
| 保济丸配方粉A | F <sub>A</sub> 湿蒸 | 1.654                            | 0.55      |
|         | F <sub>A</sub> 湿波 | 1.207                            | 0.44      |
|         | F <sub>A</sub> 未  | 0.976                            | 1.40      |
|         | F <sub>A</sub> 微波 | 0.965                            | 0.96      |
| 保济丸配方粉B | F <sub>B</sub> 湿波 | 1.118                            | 1.50      |
|         | F <sub>B</sub> 微波 | 0.640                            | 0.38      |
| 保济丸     | W <sub>未</sub>    | 1.009                            | 0.99      |
|         | W <sub>钴-60</sub> | 1.163                            | 1.30      |

由表2,3可知,无论是不烘干处理或是经60℃烘干处理,葛根素含量均为湿热蒸汽灭菌法最高,加湿微波灭菌法、未灭菌方法、微波灭菌方法依次降低。无论是先做成保济丸粉末再灭菌,还是先灭菌再做成保济丸粉末,葛根素含量均为加湿微波灭菌法高于微波灭菌法。对于丸剂,钴-60灭菌法葛根素含量高于未灭菌法。因此单从中葛根素含量判断,湿热蒸汽灭菌法最好,加湿微波灭菌法次之,有利于提高药效,钴-60灭菌法也有利于葛根素的含量提高。微波灭菌法处理的样品中葛根素含量低于未灭菌处理的样品,不利于葛根素的含量提高。

3 讨论

根据文献报导葛根素提取方法有乙醇浸提、超声提取<sup>[4]</sup>、微波辅助萃取<sup>[5]</sup>等,本文选择超声提取30 min,可基本达到提取充分,且该方法简单、易行。

提取葛根素曾采用水、甲醇、乙醇及不同比例的甲醇-水、乙醇-水溶液,结果表明,样品用甲醇或乙醇提取,阴性试样有干扰。在30%乙醇溶液中<sup>[6]</sup>,葛根素峰形更窄,理论板数更大。因而本文选择用30%的乙醇作为提取溶剂。

分别以甲醇-水(40:60),(30:70),(25:75)为流动相,结果甲醇-水(30:70)条件下阴性没干扰,分离度远大于1.5,且峰形对称性好,出峰时间适当,因而选取了甲醇-水(30:70)为流动相。

曾采用不烘干、60,105℃烘干处理样品,测得试样中葛根素的含量随处理温度升高而升高。而试样水分应随处理温度升高而降低。可见试样水分越多测得葛根素的含量越低,水分会干扰测定结果。为排除样品本身水分干扰,进一步加强不同灭菌方法对试样中葛根素含量影响的说服力,采用在60℃条件下烘干试样3h。据报道60℃烘葛根10h对葛根素的含量基本没影响<sup>[7]</sup>,且不易破坏试样中有效成分的结构和含量。

葛根素微溶于水,水蒸气的存在,有利于葛根素的溶解,使得湿热蒸汽灭菌法和加湿微波灭菌法处理的样品含量偏高。而微波灭菌产生的热效能,温度较高<sup>[8]</sup>,可能导致分子发生变异,因而微波灭菌法处理的样品含量偏低。钴-60灭菌不会引起温度上升<sup>[9]</sup>,穿透力强,不易破坏产品的有效成分,故有利于提高葛根的素含量。本文定量方法简便,快速和准确,处方中其他药味均不干扰葛根素的测定,可作为保济丸质量控制标准,并为保济丸的生产企业选

天龙抗肿瘤小分子肽纯化工艺

刘玉军<sup>1</sup>,代龙<sup>1\*</sup>,魏永利<sup>2</sup>,马睿<sup>1</sup>,马大龙<sup>1</sup>

(1. 山东中医药大学,济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院,济南 250011)

[摘要] 目的:纯化天龙酶解液,制备小分子肽。方法:用石蜡萃取法除油脂,用 Sephadex G-15 除氨基酸和盐。结果:天龙酶解液中加入药材质量分数 40% 的石蜡,加热使完全融化,搅拌,冷藏(6℃)静置 4 h,弃去石蜡,水液以每 2 mL 加于 Sephadex G-15 柱(1.6 cm×64 cm)上,用去离子水 2 mL·min<sup>-1</sup>洗脱,收集第 60~84 mL 洗脱液。结论:所筛选的纯化工艺简便可行。

[关键词] 天龙;抗肿瘤小分子肽;纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)23-0004-03

Purification Technology of Anti-tumor Small Peptide from Gecko

LIU Yu-jun<sup>1</sup>, DAI Long<sup>1\*</sup>, WEI Yong-li<sup>2</sup>, MA Rui<sup>1</sup>, MA Da-long<sup>1</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional China Medicine, Jinan 250011, China)

[Abstract] Objective: To purify enzymolysis liquid of Gecko, prepared small peptide. Method: Paraffin extraction was used to remove gease, and Sephadex G-15 was adopted to except AA and salts. Result: Added 40% paraffin into enzymolysis liquid of Gecko, melted it, stirred, stilled 4 h at 6℃, discarded paraffin, the remaining water solution was added onto Sephadex G-15(1.6 cm×64 cm) every 2 mL, eluted with deionized water by 2 mL·min<sup>-1</sup>, collected eluate after 60 mL and stopped at 84 mL. Conclusion: The selected purification technology was simple and feasible.

[Key words] Gecko; anti-tumor small peptide; purification

[收稿日期] 20110709(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073031);科技部“重大新药创制”专项(2009ZX09103-411)

[第一作者] 刘玉军,在读硕士,从事中药制剂工艺及质量标准研究,Tel:0531-68684868,E-mail:liuyj8723@163.com

[通讯作者] \*代龙,教授,从事中药新药开发及新剂型研究,Tel:0531-82960689,E-mail:dailongdailong@263.net

择一种比较好的饮片灭菌方法提供依据。

[参考文献]

[1] 杨定乔,曾各平,曾志,等.中成药保济丸挥发性化学成分的研究[J].中草药,2001,32(12):1065.  
[2] 中国药典.一部[S].2010:934.  
[3] 李润萍,朱盛山,邬威尧,等.保济丸中化学成分与药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):200.  
[4] 李佑稷,宋智娟,田宏现,等.水溶性葛根素浸提工艺研究[J].食品与发酵工业,2003,29(6):51.

[5] 张尊听,王小玲,刘谦光,等.秦岭太白野葛根异黄酮成分的研究[J].中国药学杂志,1999,34(5):301.  
[6] 祝世发,陈文,江发寿,等.葛根中葛根素的提取工艺研究[J].时珍国医国药,2004,15(3):144.  
[7] 吴纯洁.葛根素眼用新型给药系统的研究[D].成都:四川大学,2005:14.  
[8] 马俊峰,王随国.丸剂生产中应用微波干燥灭菌机的探讨[J].中成药,2005,27(10):1225.  
[9] 泮红玲.生药干燥灭菌法与辐射灭菌法的比较[J].医药导报,2005,24(4):334.

[责任编辑 全燕]