

安子合剂定性定量方法的优化研究

张传仙 钱 芳 倪文澎

(南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

摘 要 目的:优化安子合剂的薄层鉴别及含量测定方法,提高其质量标准。方法:采用 TLC 对制剂中饮片进行定性鉴别, HPLC 法测定制剂中黄芩苷的含量。结果:建立了续断、黄芩、甘草 3 味中药饮片的薄层色谱方法;建立了黄芩苷含量测定方法,黄芩苷在进样量 0.276~2.76 μ g 内呈良好的线性关系, $r=0.9999$ 。结论:本研究所建立的质量控制方法可准确地进行定性和定量检测,方法可靠,重复性好,可用于安子合剂的质量控制。

关键词 安子合剂 黄芩苷 TLC HPLC

中图分类号 R289.53

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2016)08-0062-04

本院制剂安子合剂是我院中医妇科陆启滨教授的经验方,由续断、寄生、菟丝子、白术、钩藤、当归、甘草等十二味药组成,在临床使用近二十年,疗效显著,临床基础研究较深入^[1]。但作为医院制剂,其质量标准仅有一味药的薄层鉴别,无含量测定指标,与新药要求的质量标准相差甚远。因此,我们拟按照新药审批的技术要求,对安子合剂原质量标准进行优化。

1 实验材料

1.1 仪器 凝胶成像分析仪,型号:WD-9413A,北京市六一仪器厂;电热恒温鼓风干燥箱,型号:DHG-9123A,上海精宏实验设备仪器厂;医用超声波清洗仪,型号:KQ-1000E,昆山市超声仪器有限公司;薄层色谱展开槽、硅胶-0.5CMCNa 板(自制)、硅胶 G 板(自制)、高效硅胶 G 板(批号:20121221,青岛海洋化工厂);Waters2487 紫外检测仪,美国;电子分析天平, BP-211D 型,德国赛多利斯公司;聚酰胺-6-薄膜(薄层层析用,批号:20150413),国药集团化学试剂有限公司;聚酰胺薄膜(薄层层析用,批号:20120210,浙江台州市路桥四甲生化塑料厂)。

1.2 试药 黄芩对照药材(批号:120955-200607),续断对照药材(批号:121033-200608),甘草对照药材(批号:120904-201318),黄芩苷对照品(110715-200514)均购自中国食品药品检定研究院;安子合剂(批号 1301001、1308002、1407001、1505001、1509002),江苏省中医院制剂部提供;乙腈、甲醇为色谱纯,其

他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 续断薄层鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品 50mL,用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次,每次 40mL,合并正丁醇液,用氨水 15mL 洗涤,再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 20mL,分取正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 2mL 使溶解,作为供试品溶液。同法制备阴性供试品溶液。

2.1.2 对照药材溶液的制备 取续断对照药材 0.4g,加甲醇 30mL,超声处理 30min,滤过,滤液蒸干,同供试品溶液制备方法,制得对照药材溶液。

2.1.3 薄层鉴别 参照薄层色谱法试验(中国药典 2010 版一部附录 VI B),吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上。以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性未见干扰,见图 1。

2.1.4 方法的耐用性试验 分别取 3 批制剂各 50mL,按 2.1.1 项下方法制成供试品溶液。分别吸取 3 批制剂的供试品溶液及对照药材溶液各 5 μ L,点于自制的硅胶 G 板及高效预制板上,按薄层鉴别方法进行试验,结果见图 2。由图可知,本鉴别方法稳定性较好, Rf 值变化不大,可以用于质量控制。

基金项目:江苏省中医药局,康缘中医药科技创新基金(HZ0809KY)

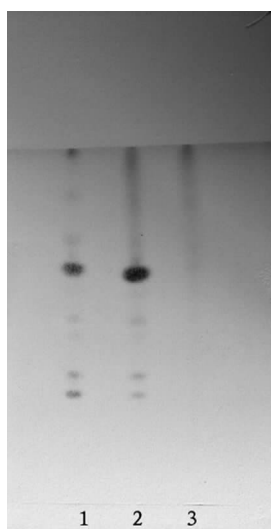


图1 续断薄层鉴别
(1.续断对照药材;2.供试品;3.阴性供试品)

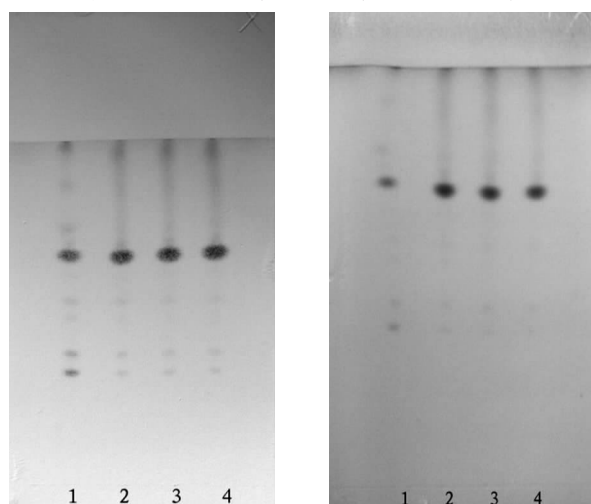


图2 续断薄层鉴别耐用性试验结果
(1.续断对照药材;2.制剂 1301001;3.制剂 1308002;4.制剂 1407001)

2.2 黄芩的薄层鉴别

2.2.1 供试品溶液的制备 取本品 50mL, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 40mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 2mL 使溶解, 作为供试品溶液。同法制备阴性供试品溶液。

2.2.2 对照药材溶液的制备 取黄芩对照药材 1g, 加乙酸乙酯-甲醇(3:1)的混合溶液 30mL, 加热回流 30min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 5mL 使溶解, 取上清液作为黄芩对照药材溶液。

2.2.3 薄层鉴别 参照薄层色谱法(中国药典 2010 版一部附录 VIB)试验, 吸取上述 3 种溶液各 3 μ L, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:3:1:2)为展开剂, 预饱和 30min, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铁试液。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。阴性未见干扰。见图 3。

2.2.4 方法的耐用性试验 分别取 3 批制剂各 50mL, 按 2.2.1 项下方法制成供试品溶液。分别吸取 3 批制剂的供试品溶液及对照药材溶液各 5 μ L, 点于两个不同来源的聚酰胺薄膜上, 按建立的薄层鉴别方法进行试验, 结果见图 4。由图可知, 本方法稳定性较好, Rf 值变化不大, 可以用于质量控制。

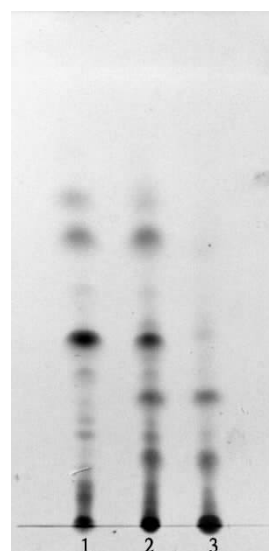


图3 黄芩薄层鉴别
(1.黄芩对照药材;2.供试品;3.阴性供试品)

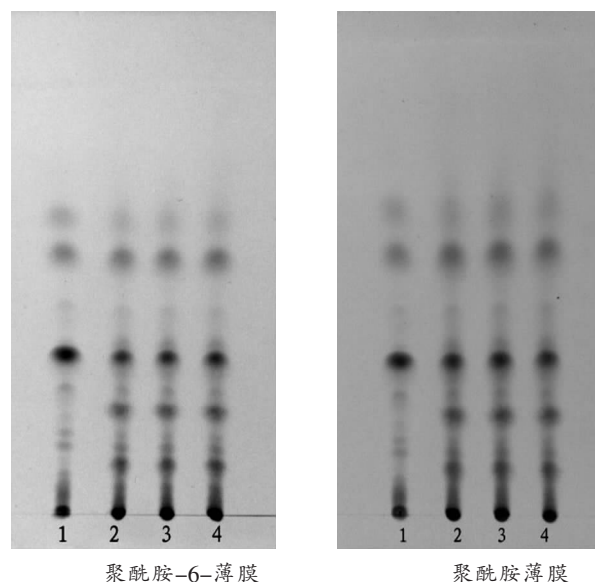


图4 黄芩薄层鉴别耐用性试验结果
(1.黄芩对照药材;2.制剂 1301001;3.制剂 1308002;4.制剂 1407001)

2.3 炙甘草的薄层鉴别

2.3.1 供试品溶液的制备 取本品 50mL, 加水 45mL, 盐酸 5mL, 加热回流 1h, 放冷, 滤过, 滤液用乙醚振摇提取 2 次, 每次 40mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇 2mL 使溶解, 作为供试品溶液。同法制备阴性供试品溶液。

2.3.2 对照药材溶液的制备 取甘草对照药材 1g, 同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。

2.3.3 薄层鉴别 参照薄层色谱法(中国药典 2010 版一部附录 VIB)试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸(10:20:10:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性未见干扰。见图 5。

2.3.4 方法耐用性试验 分别取 3 批制剂各 50mL, 按 2.3.1 项下方法制成供试品溶液。分别吸取 3 批制剂的供试品溶液及对照药材溶液各 5 μ L, 点于自制的硅胶 G 板及高效预制板 G 上,按建立的薄层鉴别方法试验,结果见图 6。由图可知,方法稳定性较好, Rf 值变化不大,可以用于质量控制。

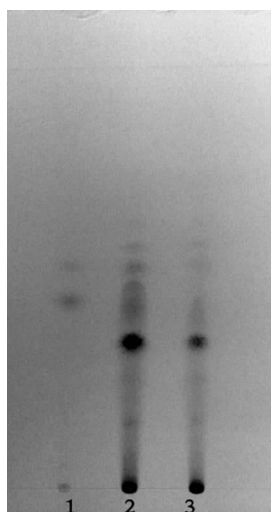
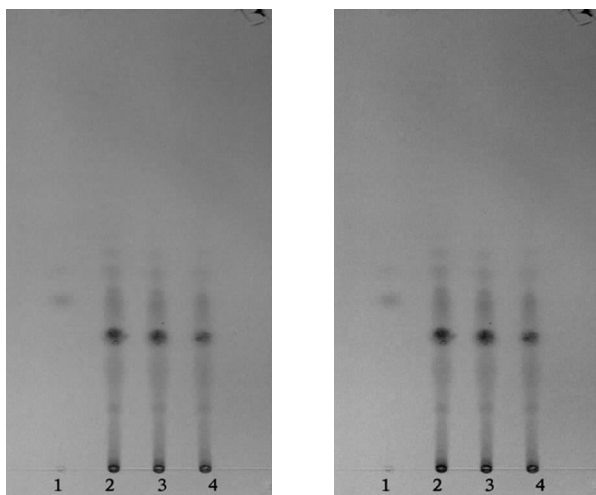


图 5 炙甘草薄层鉴别

(1.甘草对照药材;2.供试品;3.阴性供试品)



自制硅胶 G 板

高效硅胶 G 板

图 6 炙甘草薄层鉴别耐用性试验结果

(1.甘草对照药材;2.制剂 1301001;3.制剂 1308002;4.制剂 1407001)

2.4 黄芩含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:KR100-5C18(4.6mm $\times$

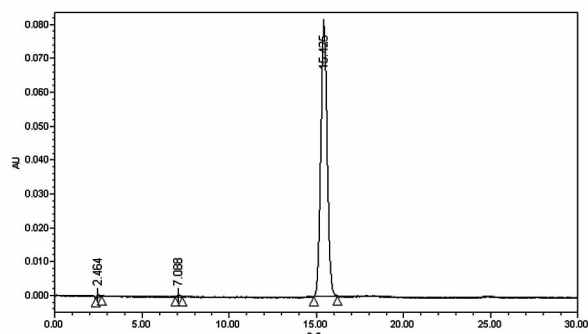
250mm,5 μ m);流动相:甲醇-水-磷酸(47:53:0.2);流速:1.0mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;供试品进样量:10 μ L;检测波长 280nm。

2.4.2 对照品溶液的制备 取经 60 $^{\circ}$ C 减压干燥 4h 的黄芩苷对照品适量,精密称定,置 10mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,制成浓度为 552 μ g/mL 的黄芩苷对照品溶液。

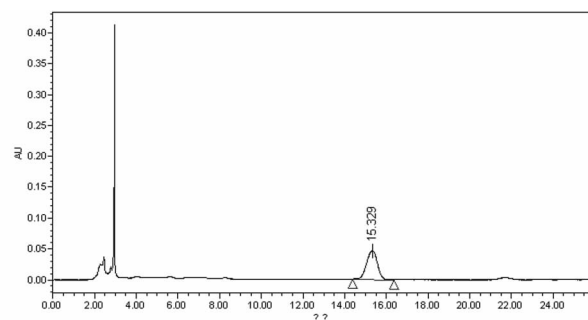
2.4.3 供试品溶液的制备 精密吸取本品 1mL 于 50mL 容量瓶中,边加甲醇边振摇,稀释至刻度,摇匀,滤过。弃去初滤液,取续滤液作为供试品溶液。

2.4.4 阴性对照溶液制备 按 2.4.3 项下方法制备缺黄芩的黄芩阴性对照品溶液^[1]。

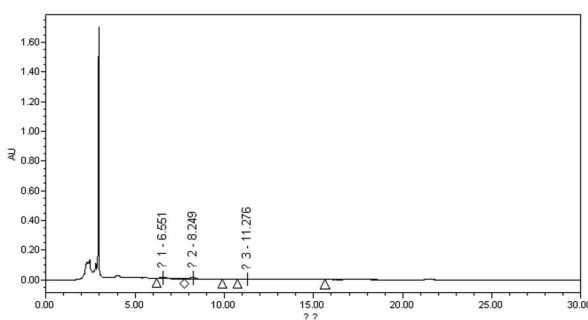
2.4.5 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液以及阴性对照品溶液,分别进样,HPLC 图见图 7。图中可见,样品基线平稳,分离度良好,阴性无干扰,理论塔板数以黄芩苷峰计算不低于 5000。



黄芩苷对照品



供试品



阴性样品

图 7 各检测样品色谱图

2.4.6 线性关系考察 取上述对照品溶液,分别进样 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ L,依法测定峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行回归分析,得方程 $y=404253.8+16056076.09x$, $r=0.9999$,结果表明黄芩苷在进样量 0.276~2.76 μ g 与峰面积呈良好线性关系。

2.4.7 稳定性 取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12h 进行测定,测得峰面积 $RSD=1.26\%$,结果表明供试品溶液在 12h 内稳定。

2.4.8 重复性试验 取同一批号样品,按供试品溶液制备方法,制备 6 份供试品溶液,测定计算含量,平均含量 3.022mg/mL, $RSD=2.39\%$ 。

2.4.9 加样回收试验 精密称取于 60 $^{\circ}$ C 干燥 4h 的黄芩苷 25.4mg 于 100mL 的量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,得加样用对照品溶液;取同批已知含量的样品,精密吸取样品 1mL,共 6 份,置 100mL 量瓶中,加上述加样用对照品溶液 12mL,按 2.4.3 项下方法制备供试液,测定,结果见表 1。

表 1 黄芩苷加样回收试验结果

编号	样品中黄芩苷含量(mg)	黄芩苷加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	3.683	3.048	6.854	104.04		
2	3.683	3.048	6.595	95.55		
3	3.683	3.048	6.605	95.88	99.31	3.66
4	3.683	3.048	6.773	101.39		
5	3.683	3.048	6.722	99.71		

2.4.10 样品测定 取 5 批样品按 2.4.3 项下方法制备供试液,进样,计算黄芩苷含量,结果见表 2。

表 2 5 批样品中黄芩苷含量($n=3$)

样品批号	样本数	含量(mg/mL)
1505001	3	3.022
1509002	3	3.683
1301001	3	3.067
1308002	3	3.277
1407001	3	3.361

3 讨论

由于中药饮片成分复杂,不同药材可能含有相同的化学成分,因此仅以化学成分对照品作为参考,特别是该成分为其非专属性成分时,难以作为饮片的定性鉴别依据。故本研究建立的薄层鉴别方法以续断、黄芩、甘草药材作为对照,使得薄层定性鉴别的成分信息更加丰富,增强了定性鉴别的准确性与可靠性。

我们对原质量标准中当归的鉴别方法进行了耐用性考察^[2],样品用石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)振摇提取,以正己烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,用不同来源的硅胶 G 板,以及在不同的温湿度条件下展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视,未见明显鉴别点或分离不清晰,稳定性较差,原方法不宜用于质量控制。

我们对续断、黄芩、甘草的鉴别方法进行了耐用性考察,研究了不同来源的薄层 G 板、不同的温湿度条件、同一展开系统的分离度,结果表明,薄层色谱的斑点清晰,分离度稳定,方法可用于安子合剂的质量控制。

我们对黄芩药材中黄芩苷的定量研究方法进行了方法学考察,经 3 批样品验证,本方法专属性强、灵敏准确、重现性好、阴性无干扰。上述定量方法有助更科学、全面地进行质量评价,可用于安子合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 陆启滨,任青玲,黄文华,等.安子合剂治疗先兆流产临床研究[J].南京中医药大学学报,2011,27(5):414.
- [2] 尹辉.当归化学成分及药理活性研究进展[J].重庆科技学院学报(自然科学版),2015,17(1):100.

第一作者:张传仙(1965—),女,大专学历,主管中药师,主要从事中药调剂及制剂配制工作。

通讯作者:倪文澎,本科学历,主任中药师。
wenpengni@163.com

收稿日期:2016-03-27

编辑:吴 宁



编辑部现有《江苏中医药》1990—2015 年期间各年度的合订本,价格分别为 90 元/本(1990—2008 年)和 114 元/本(2009—2015 年),邮购另加邮资 23 元/本。欢迎选购。地址:江苏省南京市汉中路 282 号,邮编:210029,电话:025-86612950。

《江苏中医药》编辑部