

止汗灵冲剂的定性定量方法优化研究

袁加才 邹恺平 高骁君 周琴妹

(江苏省中医院药学部, 江苏南京 210029)

摘要 目的: 补充优化止汗灵冲剂的薄层鉴别及含量测定方法, 提高其质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对止汗灵冲剂中的白芍、黄芪、五味子进行定性鉴别, 高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。色谱条件: Hederac₁₈ ODS-2 柱(4.6mm×250mm, 5μm); 流动相乙腈-0.2%甲酸溶液进行梯度洗脱。结果: 建立了止汗灵冲剂中3味中药饮片的薄层色谱鉴别方法; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷在进样量 9.81~196.2μg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.99941$ 。结论: 本研究建立的质量控制方法可准确地对止汗灵冲剂进行定性和定量检测, 方法可靠, 重复性好, 对完善止汗灵冲剂的内在质量控制标准具有重要的参考价值。

关键词 止汗灵冲剂 TLC HPLC 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 白芍 黄芪 五味子

中图分类号 R289.5 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2016)11-0065-04

本院儿科制剂止汗灵冲剂是在古方黄芪桂枝五物汤基础上加减化裁而成, 用于治疗小儿多汗症辨属营卫不和证者, 具有较好的临床疗效^[1]。目前, 止汗灵冲剂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。本研究我们按照新药审批的技术要求, 在止汗灵冲剂原质量标准的基础上, 增加了黄芪和五味子的薄层色谱鉴别方法, 并进行了方法学考察; 对原标准中白芍的鉴别进行了耐用性试验; 增加了方中君药黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定。

1 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; Agilent1260 高效液相色谱仪, 二元泵(G1312C), 柱温箱(G1316A), DAD 检测器(G1315D), 工作站(Chemstation), 自动进样器(G1367E); 电子分析天平, BP-211D 型, 德国 Sartorius。

1.2 药物与试剂 白芍对照药材(批号 120905-201109, 中国食品药品检定研究院), 芍药苷对照品(批号 110736-201337, 中国食品药品检定研究院), 黄芪甲苷对照品(批号 110781-201314, 中国食品药品检定研究院), 五味子对照药材(批号 120922-200503, 中国食品药品检定研究院), 毛蕊异黄酮葡

萄糖苷对照品(批号 111920-201304, 中国药品生物制品检定所), 止汗灵冲剂(批号 1208001、1308001、1408001, 江苏省中医院制剂部)。水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其余化学试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 白芍的薄层鉴别

2.1.1.1 方法的建立 供试品溶液的制备: 取止汗灵冲剂 10g, 研细, 加乙醇 40mL, 超声提取 10min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10mL 溶解, 用水饱和正丁醇提取 2 次, 每次 10mL, 合并提取液, 水洗 2 次, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加乙醇 1mL 溶解, 作为供试品溶液。同法制备阴性样品溶液。芍药苷对照品的制备: 取芍药苷对照品, 加乙醇制成每 1mL 含 2mg 的溶液作为对照品溶液。薄层色谱法鉴别白芍: 吸取上述三种试液各 4μL, 分别点于同一含 CMC-NA 的硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105℃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。

2.1.1.2 方法的耐用性考察^[2] 观察温湿度对分离度的影响。分别取 3 批制剂各 10g, 按上述供试品溶液制备方法制成供试品溶液。取 3 批次供试品溶液、芍药苷对照品溶液各 4μL, 分别点于两相同来源硅

基金项目: 江苏省高校优势学科项目(中西医结合)(2014)

胶 G 板上,按 2.1.1.1 项下的薄层鉴别条件,分别在温度 25℃、湿度 50%和温度 30℃、湿度 70%两条件下展开,取出,晾干,显色。结果如图 2。结果显示,两种温湿度条件下,分离度较好,重现性好。

2.1.2 黄芪薄层鉴别

2.1.2.1 方法的建立 供试品溶液的制备:取止汗灵冲剂 20g,加甲醇 200mL 溶解,超声 30min,滤过蒸干,用水饱和正丁醇振摇提取 2 次,每次 20mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗至水液无色,弃去洗液,正丁醇层蒸干,残渣加甲醇 0.5mL 溶解,作为供试品溶液;同法制备阴性样品溶液。对照品制备:取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 黄芪甲苷的溶液作为对照品溶液。薄层色谱法,在同一硅胶 G 薄层板上,吸取上述三种试液各 2 μ L 分别点样,展开剂为三氯甲烷-甲醇-20%氢氧化钠(13:7:2)的下层溶液,取出,晾干,喷 10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同棕褐色斑点,见图 3。

2.1.2.2 方法的耐用性考察 观察温湿度对分离度的影响。分别取 3 批制剂各 20g,按上述供试品溶液制备方法制成供试品溶液。取 3 批次供试品溶液、黄芪甲苷对照品溶液各 2 μ L,分别点于两相同来源的硅胶板上,按 2.1.2.1 项下薄层鉴别条件,分别在温度 25℃、湿度 50%和温度 30℃、湿度 70%下展开,取出,晾干,显色。结果见图 4。结果显示,两种温湿度条件下,分离度较好,重现性好。

2.1.3 五味子薄层鉴别

2.1.3.1 方法的建立 供试品溶液的制备:取止汗

灵冲剂 10g,加二氯甲烷 100mL,加热回流 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加二氯甲烷 1mL 使溶解,作

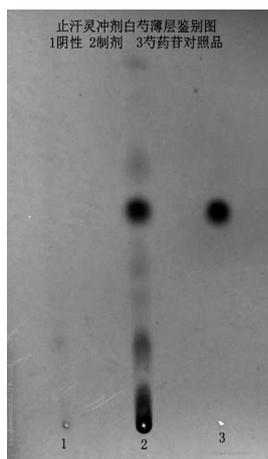


图 1 止汗灵冲剂中白芍薄层鉴别

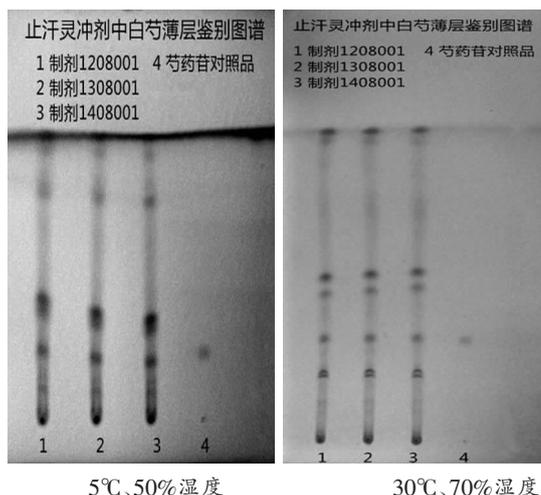


图 2 不同温湿度条件下止汗灵冲剂中白芍薄层鉴别

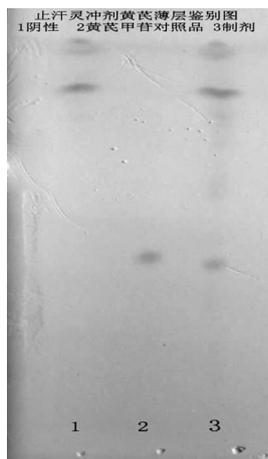


图 3 止汗灵冲剂黄芪薄层鉴别

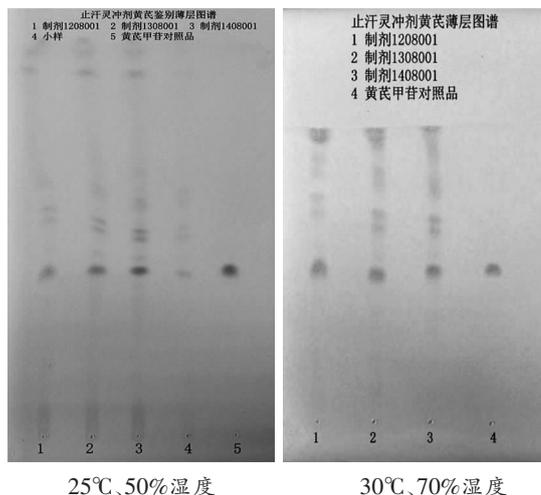


图 4 不同温湿度条件下止汗灵冲剂中黄芪的薄层鉴别

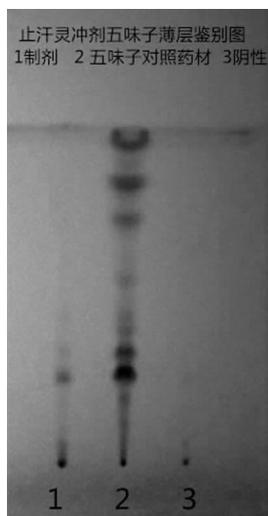


图 5 止汗灵冲剂中五味子薄层鉴别

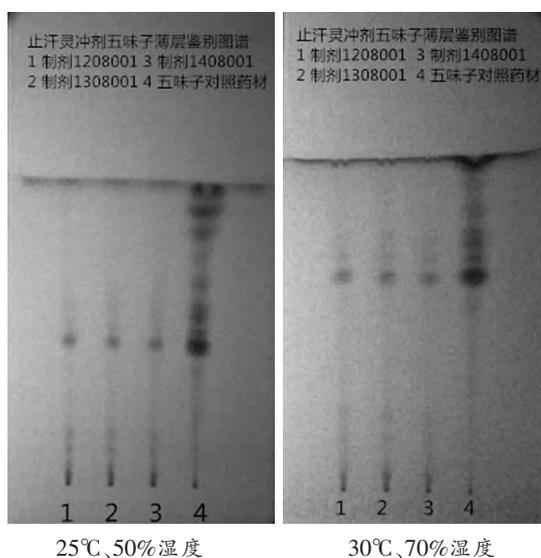


图 6 不同温湿度条件下止汗灵冲剂中五味子的薄层鉴别

为供试品溶液;同法制备阴性样品溶液。对照药材制备:五味子对照药材 1g,加二氯甲烷 20mL,使用相同方法,制得对照药材溶液。薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上,以石油醚(30 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254nm)下检视。与对照药材色谱相应位置上,供试品溶液显相同颜色的斑点。结果见图 5。

2.1.3.2 方法的耐用性考察^[2] 观察温湿度对分离度的影响。分别取 3 批制剂各 10g,按上述供试品溶液制备方法制成供试品液。取 3 批次供试品溶液、五味子对照品溶液各 2 μ L,分别同时点于两硅胶板上,按 2.1.3.1 项下薄层鉴别条件,分别在温度 25 $^{\circ}$ C、湿度 50%和温度 30 $^{\circ}$ C、湿度 70%条件下展开,取出,晾干,显色。结果见图 6。结果显示,两种温湿度条件下,分离度较好,重现性好。

2.2 君药黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定

2.2.1 色谱条件^[3-4] 色谱柱:Hedera ODS-2 C₁₈(250mm \times 4.6mm,5 μ m);流动相:乙腈为流动相 A,0.2%甲酸溶液为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;流速:1.0mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长 260nm;进样量:10 μ L。

表 1 流动相梯度洗脱

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0-20	20 \rightarrow 40	80 \rightarrow 60
20-30	40	60

2.2.2 对照品溶液制备 取经五氧化二磷减压干燥 24h 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 9.81mg,精密称定,置 5mL 量瓶中,加甲醇适量,溶解并稀释至刻度,作为储备液。精密量取 1mL 储备液,置 10mL 量瓶中,加甲醇至刻度,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取样品约 1.0g,研细后精密称定,置 25mL 容量瓶中,加入适量甲醇,超声 15min(功率:280w,频率:53KHZ),加甲醇,稀释到刻度,摇匀,过 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液制备 取缺少黄芪的阴性制剂,按 2.2.3 项下的方法处理,制得阴性对照品溶液^[1]。

2.2.5 专属性试验 分别吸取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液各 10 μ L,注入高效液相色谱仪中,测定,阴性对照无干扰。色谱柱的理论板数以毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算不低于 3000,分离度大于 1.5。见图 7。

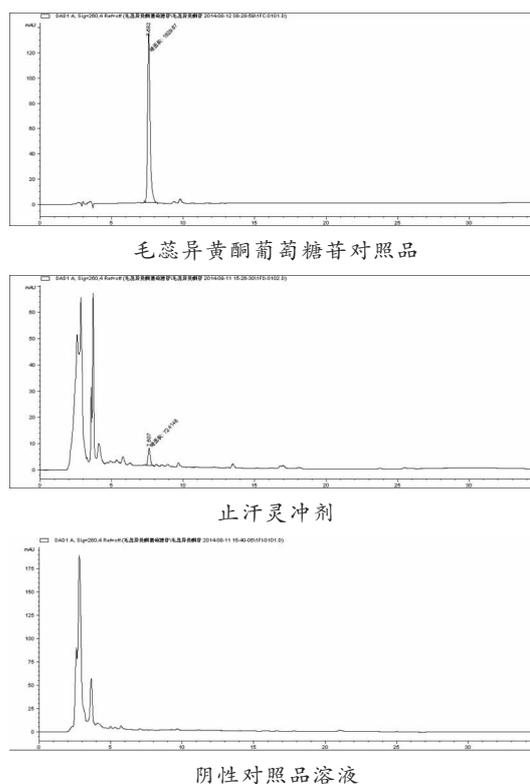


图 7 各组溶液色谱

2.2.6 标准曲线的制备 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液,分别稀释至 0.981、1.962、2.452、4.905、9.81、19.62 μ g/mL,精密吸取不同浓度的对照品溶液各 10 μ L,测定峰面积积分值。得回归方程: $Y=30.199X-0.18806$, $r=0.99941$ 。毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 9.81~196.2 μ g 范围内,线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 精密吸取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 10 μ L,注入高效液相色谱仪,重复进样 6 次,测定,以峰面积积分值计算, RSD 为 0.40%。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批次(1408001)止汗灵颗粒 6 份(每份 1g),依法制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液 10 μ L,注入高效液相色谱仪中,测定,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积计算, RSD 以含量计算为 1.83%。

2.2.9 稳定性试验 精密称取止汗灵颗粒(批号 1408001)1g,依法制备供试品溶液,按上述色谱条件下,于 0、2、4、8、12、24h 分别进样,测定色谱峰面积,计算 RSD 为 1.68%。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的止汗灵颗粒样品(批号 1408001)6 份,每份 1.0g。每份样品置于 50mL 量瓶中,加入浓度为 2.452 μ g/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 25mL,依 2.2.3 项下操作,制得供试品溶液,进样,测定,计算,结果平均回收率 102.91%, $RSD=0.45%$,见表 2。

表2 止汗灵颗粒中毛蕊异黄酮葡萄糖苷加样回收率

称样量 (g)	样品中含量 (μg)	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 加入量(μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.0005g	59.18	60.63	121.84	102.19	102.91	0.45
1.0014g	59.26	60.63	122.34	102.87		
1.0032g	59.35	60.63	122.83	103.54		
1.0007g	59.02	60.63	122	102.73		
1.0022g	59.18	60.63	122.5	103.27		
1.0039g	59.43	60.63	122.5	102.87		

2.2.11 样品含量测定 分别取不同批号止汗灵冲剂(批号 1208001、1308001、1408001),依上述方法制备成样品供试品溶液,每批取3份,依法测定,结果见表3。

表3 3批止汗灵冲剂中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量(n=3)

样品	样本数	毛蕊异黄酮葡萄糖苷平均含量(mg)
1208001	3	0.5927
1308001	3	0.5910
1408001	3	0.5920

3 讨论

3.1 止汗灵方中白芍、黄芪、五味子的薄层鉴别方法,斑点分离度高,直观,重现性好。耐用性实验考察了不同温度(25°C、30°C)、不同湿度(相对湿度50%、70%)对薄层鉴别的影响,结果表明上述温度、湿度条件对止汗灵冲剂中白芍、黄芪、五味子的薄层鉴别没有明显影响。

3.2 由于方中药材种类较多,中药饮片的成分较复杂,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。故本文建立的薄层鉴别方法中五味子增加对照药材作为参考,使得薄层定性鉴别的信息更加丰富,增强了定性鉴别的准确性与可靠性。

3.3 黄芪作为方中君药,主要含皂苷类、黄酮及其苷类和多糖类成分^[5-6]。黄酮类成分具有改善血循环,提高免疫力作用,其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷活性较高,为主要有效成分,具有抗病毒、抗菌、降血脂、抗氧化自由基等作用,还具有抗缺血和改善血象作用^[7]。现在多采用 HPLC 法测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量^[4,7-8]。

本试验所建立的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定方法,经方法学考察表明该法专属性强,重现性好,可用于止汗灵冲剂的质量控制。黄芪甲苷作为药材黄芪的质量评价指标之一,其检测方法多采用蒸发光散射检测器(ELSD),由于样品处理方法复杂,含量测定稳定性差,故不作为黄芪含量测定方法。

3.4 止汗灵冲剂制剂处方由十味中药组成,原制剂薄层鉴别仅白芍一味饮片的定性鉴别。现建立本制剂中黄芪、五味子薄层色谱鉴别方法和黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷 HPLC 含量测定法。经3批样品验证考察,此方法专属性强,阴性无干扰,灵敏度高,重现性好。通过定性和定量方法两者的结合,可以更科学、更合理、更全面地对止汗灵颗粒进行质量评价。

参考文献

- [1] 袁斌,孙轶秋,韩新民.止汗灵冲剂治疗小儿多汗症气阴两虚型 65 例临床观察[J].河北中医,2009,31(1):54.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:化学工业出版社,2010:附录 131.
- [3] 罗堃,王元清,谢瑜,等.HPLC 法测定益气软皮丸中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量[J].亚太传统医药,2015,11(20):22.
- [4] 杨巧虹,万萌萌,白梦娜,等.高效液相色谱法测定糖肾宝颗粒中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量[J].中国药业,2015,24(16):85.
- [5] 肖培根.新编中药志:第一卷[M].北京:化学工业出版社,2002:876.
- [6] 罗春霞,林平川,谷丽华,等.高效液相色谱法测定黄芪中毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷的含量[J].中国中药杂志,2003,28(7):603.
- [7] 刘书芬,梁倩倩,陈岩,等.HPLC 法同时测定防己黄芪汤中 5 种成分[J].中成药,2014,36(11):2312.
- [8] 刘玲,赵晓莉,狄留庆,等.采用体外肠道菌群实验研究防风对黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷代谢的影响[J].南京中医药大学学报,2015,31(2):170.

第一作者:袁加才(1966—),男,本科学历,副主任中药师,主要从事中药鉴定及制剂工艺研究。
gaoxiaojun88@126.com

收稿日期:2016-03-29

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