

安胎合剂定性定量方法优化研究*

管敏,陈晓斌[△]

(南京中医药大学附属医院,江苏 南京 210029)

摘要:目的 优化安胎合剂的定性定量方法。方法 通过薄层色谱法鉴别处方中的山茱萸和续断。采用高效液相色谱梯度洗脱法同时测定方中芍药苷和川续断皂苷Ⅵ的含量,检测波长为0~21 min时230 nm,21~45 min时212 nm。结果 山茱萸、续断的薄层鉴别图清晰,分离度好,阴性对照无干扰;芍药苷、川续断皂苷Ⅵ质量浓度分别在12.625~404 μg/mL和62.687 5~2 006 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。结论 优化的薄层鉴别方法专属性强,结果清晰;2个成分的含量测定方法简便,重复性好。

关键词:安胎合剂;芍药苷;川续断皂苷Ⅵ;薄层色谱法;高效液相色谱法

中图分类号:R932;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)07-0119-04

Optimization of Qualitative and Quantitative Methods for Antai Mixture

GUAN Min, CHEN Xiaobin

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210029)

Abstract: **Objective** To optimize the qualitative and quantitative methods of Antai Mixture. **Methods** Fructus corni and Radix dipsaci of the prescription were identified by thin layer chromatography(TLC). The content of paeoniflorin and saponin VI were determined simultaneously using high performance liquid chromatography(HPLC) with gradient elution method; the detection wavelengths were 0-21 min; 230 nm; 21-45 min; 212 nm. **Results** The thin layer identification map of Fructus corni and Radix dipsaci was clear, the separation was good, and the negative control had no interference. The peak area values of paeoniflorin and saponin VI showed good linear relationship within the scope of 12.625-404 μg/mL and 62.687 5-2 006 μg/mL. **Conclusion** The preferred TLC methods are distinct and specific; the content determination method of the two ingredients is simple and reproducible.

Key words: Antai Mixture; paeoniflorin; saponin VI; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography

安胎方是我院中医妇科陆启滨教授的经验方,由炒淮山药、山茱萸、槲寄生、杜仲、菟丝子、苎麻根、太子参、续断、鹿角霜、生黄芪等12味药材组方,具有清热和血、补肾健脾、增强机体免疫力等功效,主要用于封闭抗体缺失习惯性流产、复发性流产,脾肾两虚,血热夹瘀的治疗^[1],以及先兆性流产和复发性流产的预防。现拟将其开发为医院制剂安胎合剂。制剂的质量与疗效息息相关,中药制剂的组分众多、成分复杂,且同种中药不同批次差异大,以单纯某一成分的含量较难控制中药制剂的质量,这些因素严重影响临床用药的安全性、有效性^[2]。本制剂为妇幼用制剂,对安全性和有效性的要求更高,故本研究中建立了安胎合剂的相关质量标准,利用薄层色谱(TLC)法对山茱萸、续断进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定方中主要有效成分芍药苷和川续断皂苷Ⅵ的含量,以控制制剂质量^[3-5]。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AR2140型电子天平(美国Ohaus Corp,精度为万分之一);BP211D型电子天平(Sartorius,精度为十万分之一);AD-03型多功能粉碎机(上海爱德科技有限公司,

150 g);DW型调温电热器(上海平环燃烧设备工程技术有限公司,2 000 mL);HH-2型数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞电器有限公司);SK6200H型超声清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);1260S型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);硅胶G板(青岛海洋化工厂分厂,批号为20151108)。

1.2 试药

芍药苷对照品(批号为110736-201337),川续断皂苷Ⅵ对照品(批号为111685-201305),均购自中国食品药品检定研究院;含量测定所用试剂均为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯;安胎合剂(江苏省中医院自制,批号分别为1805001,1805002,1805003)。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

山茱萸:取安胎合剂50 mL,蒸干,残渣加甲醇20 mL超声30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取山茱萸对照药材5 g,加水50 mL加热回流30 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇20 mL使溶解,作为对照药材溶液。取缺山茱萸的阴性样品溶液50 mL,按供试品制备方法制成阴性对照品溶

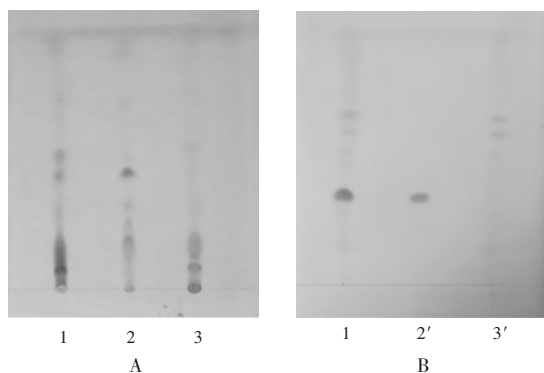
*基金项目:江苏省中医院2018年度院级课题[Y18044]。

第一作者:管敏,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物制剂和质量控制,(电子信箱)guanmin_1987@163.com。

[△]通信作者:陈晓斌,女,大学本科,主任中药师,研究方向为中药制剂,(电子信箱)chxb67@163.com。

液。分别吸取上述3种溶液各10 μL , 点于同一硅胶G薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以10%硫酸乙醇溶液显色, 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点。详见图1A。

续断: 取安胎合剂30 mL, 用水饱和正丁醇萃取3次, 每次20 mL, 合并正丁醇溶液, 用新配制氨试液洗2次, 每次30 mL, 分取正丁醇层, 蒸干, 使用4 mL甲醇溶液溶解, 作为供试品溶液。另取川续断皂苷VI对照品, 加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液, 作为对照品溶液。取缺续断的阴性样品溶液, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。分别吸取上述3种溶液各5 μL , 点于同一硅胶G薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-10%NaOH(26:15:4, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以10%硫酸乙醇溶液显色, 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点。详见图1B。



1. 安胎合剂 2. 对照药材溶液 2'. 对照品溶液
3. 阴性对照药材溶液 3'. 阴性对照品溶液

A. 山茱萸 B. 续断

图1 薄层色谱图

2.2 芍药苷和川续断皂苷VI含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%磷酸水溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~21 min时14% B, 21~23 min时30% B, 23~40 min时30% B, 40~45 min时14% B); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速:

1.0 mL/min; 检测波长: 0~21 min时230 nm, 21~45 min时212 nm。

2.2.2 溶液制备

精密量取样品10 mL, 置50 mL容量瓶中, 加80%乙醇适量, 超声处理(功率240 W, 频率45 kHz)15 min, 放冷, 加80%乙醇至刻度, 摇匀, 过0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。分别称取芍药苷对照品14.40 mg与川续断皂苷VI对照品37.60 mg, 精密称定, 置200 mL容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成混合对照品溶液。各取缺白芍与续断的阴性样品溶液, 按供试品溶液制备方法得白芍阴性对照品溶液和续断阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

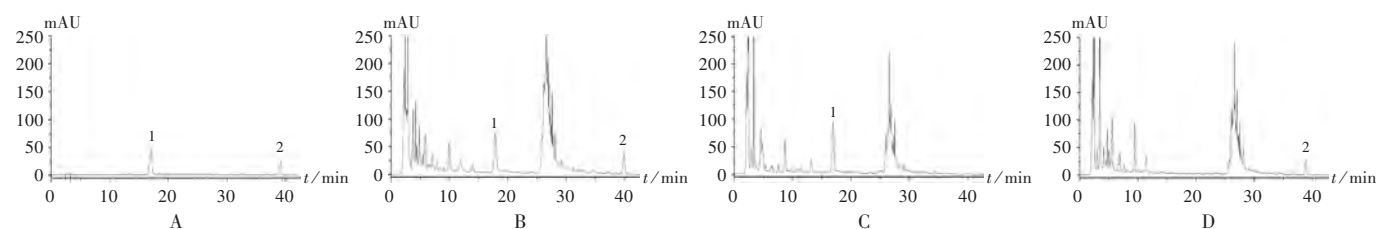
专属性考察: 按拟订色谱条件, 进样测定芍药苷和川续断皂苷VI对照品、安胎合剂供试品、缺续断和白芍的阴性对照品溶液, 结果见图2。可见, 芍药苷和川续断皂苷VI的色谱峰有效板数、分离度、拖尾因子均符合要求, 阴性对照无干扰。

线性关系考察: 取芍药苷对照品10.10 mg、川续断皂苷VI 50.15 mg, 精密称定, 加甲醇配置成25 mL的溶液作为母液, 并依次稀释2, 4, 8, 16, 32倍, 过0.45 μm 微孔滤膜制成系列对照品溶液。分别进样10 μL , 以溶液质量浓度(X)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归, 得芍药苷和川续断皂苷VI回归方程 $Y_{\text{芍}} = 13445X + 7.2881$ ($R^2 = 0.9995$) 和 $Y_{\text{川}} = 2139.1X + 10.048$ ($R^2 = 0.9998$)。结果表明, 芍药苷和川续断皂苷VI质量浓度在12.625~404 $\mu\text{g/mL}$ 和62.6875~2006 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取对照品溶液, 按拟订色谱条件连续进样6次。结果芍药苷与川续断皂苷VI峰面积的RSD分别为2.89%和0.56% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 平行量取同一批供试品溶液, 共6份, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件测定。结果芍药苷和川续断皂苷VI峰面积的RSD分别为1.48%和1.40% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取同一份供试品溶液, 分别于0, 2, 4,



1. 芍药苷 2. 川续断皂苷VI

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 续断阴性对照品溶液 D. 白芍阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

表 1 加样回收试验结果 ($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3.555 1	9.361 1	3.65	10.50	7.187 5	19.843 7	99.52	99.83				
3.555 1	9.361 1	3.65	10.50	7.155 3	19.469 7	98.63	96.27				
3.555 1	9.361 1	3.65	10.50	7.250 7	20.147 5	101.25	102.73	100.65	99.61	1.90	2.18
3.555 1	9.361 1	3.65	10.50	7.287 9	19.680 1	102.27	98.28				
3.555 1	9.361 1	3.65	10.50	7.165 2	19.890 4	98.91	100.28				
3.555 1	9.361 1	3.65	10.50	7.325 1	19.890 4	103.29	100.28				

注: A 为芍药苷, B 为川续断皂苷 VI。

6, 8, 12 h 时按拟订色谱条件进样测定。结果芍药苷与川续断皂苷峰面积的 RSD 分别为 1.18% 和 1.14% ($n=6$), 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 精密量取安胎合剂 5 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 加入相当于 3.65 mg 芍药苷, 10.50 mg 川续断皂苷 VI 的混标溶液, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 计算回收率及 RSD 。结果见表 1。

2.2.4 样品含量测定

取安胎合剂样品 3 批, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定安胎合剂中芍药苷与川续断皂苷 VI 的含量。结果见表 2。

表 2 安胎合剂中芍药苷与川续断皂苷 VI 的含量(mg/mL)

批号	芍药苷	川续断皂苷 VI
1805001	0.72	1.87
1805002	0.75	1.80
1805003	0.68	1.78

3 讨论

本试验中建立了安胎合剂中山茱萸、续断的 TLC 鉴别方法, 优化了同时测定主药续断和白芍中川续断皂苷 IV 和芍药苷的 HPLC 法, 经方法学验证, 其精密度、重复性均较好, 可用于安胎合剂质量标准的建立。

安胎合剂处方中共有 12 味药材, 成分复杂, 且几味药中均有同类成分, 如续断和黄芪中均含有皂苷类, 山茱萸和槲皮素中均含有三萜类化合物, 采用 TLC 法鉴别阴性有干扰。山茱萸的 TLC 鉴别参考 2015 年版《中国药典(一部)》^[6], 甲醇超声, 以莫诺昔和马钱苷为对照, 但阴性有干扰, 可能是方中其他药味中含有相似成分, 故以山茱萸对照药材为对照, 鉴别斑点清晰明了。

续断的 TLC 鉴别参考 2015 年版《中国药典(一部)》^[6], 甲醇超声, 以川续断皂苷 IV 为对照, 硫酸乙醇显色, 样品中斑点较多, 背景有干扰, 因此采用正丁醇萃取, 氨试液洗涤方法制备样品溶液, 斑点少, 主斑点清晰, 阴性无干扰, 列入质量标准。

方中其他药材山药、鹿角霜、杜仲在 2015 年版《中国药典(一部)》中无 TLC 鉴别项, 槲寄生、菟丝子、太子

参曾采用《中国药典(一部)》方法^[6], 但供试品溶液中鉴别点均不清晰, 之后又尝试其他方法^[7-8], 依然不能得到理想结果。黄芪采用《中国药典(一部)》方法, 阴性有干扰, 调整展开剂比例后仍有干扰, 故该几味中药的定性鉴别未列入质量标准中。

续断补肝肾、强筋骨、止崩漏, 白芍养血, 两者为该方主药。参考 2015 年版《中国药典(一部)》中续断和白芍项下的含量测定方法^[6], 进行梯度洗脱和检测波长的变换, 同时测定安胎合剂中芍药苷和川续断皂苷的含量。制备供试品溶液时, 考察了不同浓度乙醇的提取率, 结果 60% 乙醇提取的芍药苷和川续断皂苷 VI 最多, 故供试品溶液制备方法确定为取供试品 10 mL, 加 80% 乙醇超声, 定容至 50 mL, 最终乙醇浓度约为 60%。同时考察了超声提取时间对 2 个成分含量的影响, 结果供试品溶液分别超声 15, 30, 60 min 后, 芍药苷和川续断皂苷 VI 的含量无明显差异, 故确定供试品溶液制备时超声 15 min, 放冷后定容。HPLC 法的方法学考察结果表明, 芍药苷和川续断皂苷 VI 的测定方法重复性好、专属性强, 可为安胎合剂质量标准的建立提供依据。

中药制剂含药味多, 成分复杂, 若不同药味中有相似成分时, 可以对照药材为对照, 增加可鉴别的信息。目前制剂质量标准研究过程中, 含量测定指标的选择多考虑主要成分、易得、易测、稳定等因素^[9-12], 部分制剂所测得成分与药效的发挥是否有直接关系不确定, 即便有直接关系的成分, 其在制剂中的含量也不是越高越好。笔者认为在中药制剂开发过程中, 采用“多成分”及“质量标志物”等为综合指标控制中药和制剂的质量是一种趋势^[13-15], 同时在筛选制剂制备工艺时应注重与临床所用汤剂的一致性。

参考文献:

- [1] 陆启滨, 任青玲. 安胎合剂治疗抗心磷脂抗体阳性致先兆流产 191 例临床研究[J]. 中华临床医学杂志, 2006, 11(7): 276-280.
- [2] 梁语珈, 王航. 中药质量的差异与标准化探讨[J]. 世界最新医学信息文摘: 电子版, 2017, 17(99): 1.
- [3] WONG HB. Singapore Kernicterus[J]. Singapore Med J, 1980, 21(3): 556-558.