

促孕合剂的质量标准研究

邓少荣¹, 曾建武¹, 李靖², 吴云霞^{1*}

(1. 华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030; 2. 武警湖北总队医院, 武汉 430060)

[摘要] 目的: 建立促孕合剂的质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对方中黄芪, 黄芩, 续断进行定性鉴别; 用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)测定黄芪甲苷的含量, 采用 Kromasil C₁₈ 柱, 流动相乙腈-水(35:65), 流速 0.8 mL·min⁻¹。结果: 薄层色谱专属性强, 黄芪甲苷的线性范围 1.02~10.2 μg($r=0.9997$), 平均回收率为 99.96%, RSD 1.01%, ($n=6$)。结论: 该方法简便、准确、灵敏度高, 可用于促孕合剂的质量控制。

[关键词] 促孕合剂; 黄芪甲苷; 高效液相色谱法; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0064-03

Study on the Quality Standard for Cuyun Mixture

DENG Shao-rong¹, ZENG Jian-wu¹, LI Jing², WU Yun-xia^{1*}

(1. Tongji School of Pharmacy, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;
2. Hubei Armed Police's Hospital, Wuhan 430060, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard for Cuyun mixture. **Method:** Radix Astragali Mongolici, Radix Scutellariae Baicalensis and Radix Dipsaci in this prescription were identified by TLC; and the content of astragaloside IV in Cuyun mixture was determined by HPLC. The column of Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used; the mobile phase consisted of acetonitrile-water (35:65); the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. **Result:** TLC spots were clear with strong specificity and easy identification. While the linear range of astragaloside IV was 1.02-10.2 μg ($r=0.9997$), the average recovery rate was 99.96%, RSD 1.01% ($n=6$). **Conclusion:** The method is easy, accurate and reproducible. It can be used effectively for the quality control of this preparation.

[Key words] Cuyun mixture; astragaloside IV; HPLC; quality standard

促孕合剂是根据气能载胎、血能养胎、肾主生长发育, 胎前宜凉的生殖中医理论从经典验方(补肾益气活血方^[1]、帮得孕^[2]、健胎液^[3])中拆选出主要成分黄芪、黄芩、续断组方, 经乙酸乙酯部位进一步提取分离, 并经临床和实验证实的有效复方制剂。方中黄芪为君药, 续断、黄芩为臣药, 君臣结合, 调节气血平衡, 养肾从而促进生殖。本实验采用 TLC 对

制剂中黄芪、黄芩、续断进行定性鉴别; 同时采用 HPLC-ELSD 对制剂中黄芪甲苷的含量进行测定, 为促孕合剂的质量标准的建立提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HP1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 蒸发光散射检测器(日立 ELSD2000), AG2China 1/万天平(瑞士 METTLER 公司), 硅胶 GF254 薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 试剂 黄芪甲苷(批号 110781-200613), 齐墩果酸(批号 110709-200505), 均购自中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。中药材由武汉江瀚大药房购得, 产自安徽亳州, 均经华中科技大学同济药学院中药系张长弓教授鉴定。

[收稿日期] 20120712(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801538)

[第一作者] 邓少荣, 硕士, 从事中药质量标准研究, E-mail: dengshaorong.111@163.com

[通讯作者] * 吴云霞, 博士, 副教授, 从事中药药理活性及物质基础研究, Tel: 02783692762, E-mail: wyx7419@yahoo.com.cn

2 方法与结果

2.1 定性鉴别^[4-6]

2.1.1 黄芩 TLC 鉴别 取促孕合剂药粉 10 g,加水 20 mL 使溶解,用水饱和的正丁醇提取 3 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,加氨试液提取 3 次,每次 30 mL,分离正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 超声使溶解,作为供试品溶液。另取黄芩对照药材粉末 10 g,加 90 mL 正丁醇超声提取 20 min 后,同法制成对照药材液。再取黄芩甲苷对照品加甲醇制成每毫升含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照《中国药典》2010 年版一部附录 VI B 薄层色谱法试验,吸取上述供试品溶液、对照品溶液和黄芩药材对照液各 10 μ L 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液为展开剂,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,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

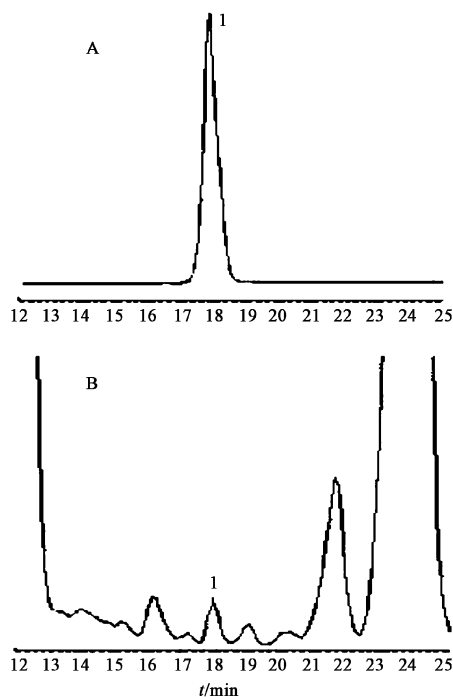
2.1.2 黄芩 TLC 鉴别 取本品 10 g,加乙酸酯-甲醇(3:1)的混合溶液 30 mL,加热回流 30 min,放冷,滤过,滤液蒸干。残渣加甲醇 5 mL 超声使溶解,取上清液作为供试品溶液。另取黄芩对照药材 10 g,同法制成对照药材液。吸取上述供试品溶液和黄芩药材对照液各 10 μ L 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸酯-甲醇-水(8:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。分别置紫外光灯(254 nm)和日光下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2.1.3 续断 TLC 鉴别 取本品 10 g,加浓氨试液 15 mL,拌匀,放置 1 h,加三氯甲烷 40 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液用盐酸溶液 40 mL 分次振摇提取,提取液用浓氨试液调节 pH 至 10,再用三氯甲烷 30 mL 分次振摇萃取,合并三氯甲烷液,浓缩至 1 mL,作为供试品溶液。另取续断对照药材 10 g,同法制成对照药材液。再取齐墩果酸对照品加甲醇制成每毫升含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述供试品溶液、对照品溶液和续断药材对照液各 10 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,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm,

5 μ m),以乙腈-水(35:65)为流动相,柱温 25 $^{\circ}$ C,流速 0.8 mL \cdot min⁻¹,蒸发光检测器(ELSD)参数:漂移管温度为 100 $^{\circ}$ C,氮气流速 2.5 mL \cdot min⁻¹。理论塔板数以黄芩甲苷计不低于 5 000,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 黄芩甲苷

图 1 促孕合剂 HPLC-ELSD

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重黄芩甲苷对照品适量,加甲醇制成 0.51 g \cdot L⁻¹的溶液,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取 3 批干燥至恒重的促孕合剂粉末各 1.0 g,加水 20 mL 使溶解,用水饱和的正丁醇提取 3 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,加氨试液洗涤 3 次,每次 30 mL,充分振摇,静置 1 h 使分层,弃去氨试液,用水洗涤正丁醇液 2 次,每次 20 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇超声使溶解,并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品贮备液(0.51 g \cdot L⁻¹) 2, 4, 8, 10, 15, 20 μ L,依次注入色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以进样量的自然对数为横坐标,峰面积的自然对数为纵坐标。进行线性回归分析,得回归方程 $Y = 1.6038X + 4.2056$ ($r = 0.9997$)。结果表明,黄芩甲苷进样量在 1.02 ~ 10.20 μ g 呈现良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取同一质量浓度(0.51 g \cdot L⁻¹)黄芩甲苷对照品溶液,按色谱条件连续进样 5

次,进样量 20 μL /次,记录峰面积, RSD 0.78%。表明本法精密度较好。

2.2.6 稳定性试验 取本品 1.0 g,按上述含量测定方法制备供试品溶液,按上述色谱条件每隔 6 h 进样 1 次,进样量 20 μL /次,记录峰面积, RSD 2.41%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.2.7 重复性试验 取同一批号样品,按上述含量测定方法,分别配制 6 份供试品溶液进行测定,计算含量, RSD 1.34%。结果表明本法具有良好的重复性。

2.2.8 回收率试验 精密称取已知浓度的供试品 6 份各 1.0 g,加入一定量的黄芪甲苷对照品,按供试品溶液的制备方法处理,进样量 20 μL /次,按上述色谱条件测定,结果表明平均回收率为 99.96%, RSD 1.01%。

2.2.9 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL ,注入高效液相色谱仪中,按上述色谱条件测定,样品测定结果见表 1。

表 1 促孕合剂样品中黄芪甲苷测定

No.	黄芪甲苷/%	RSD/%
1	0.331	1.65
2	0.334	1.79
3	0.328	1.85

3 讨论

应用 TLC 法对黄芪、黄芩、续断进行定性鉴别,结果表明促孕合剂中主药黄芪、黄芩、续断的主斑点均非常明显,且斑点比对照药材更清晰,含量丰度更高,说明复方活性部位的分离纯化有效地富集了单味药的活性成分,有助于提高制剂的药效。黄芪在本方配伍中为君药,黄芪甲苷为其有效成分^[7],因此选择黄芪甲苷为含量测定的指标性成分,能有效控制促孕合剂的质量。

在进行黄芪甲苷色谱条件优化试验中,比较了

文献[8-10]的色谱条件。选择了不同的流动相:不同配比的乙腈-水、甲醇-水,经过比较确定乙腈-水(35:65)为最佳流动相组成。运用 ELSD-2000 选择漂移管温度、气体流量,确定漂移管温度 100 $^{\circ}\text{C}$,气体流量为 2.5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,为最佳色谱条件。在此条件下黄芪甲苷可达到较好分离,且峰形好,理论塔板数较大。

[参考文献]

- [1] 张明敏,黄光英,陆付耳,等. 补肾益气活血汤对多次助孕技术失败患者结局的影响[J]. 微循环学杂志, 2002,12(2):10.
- [2] Wu Y X, Zheng C H, Hu L L, et al. Local immune regulatory effects of Bangdeyun on the endometrium of mice with embryo implantation dysfunction during the implantation time[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(3):372.
- [3] 刘艳娟,黄光英,陆付耳,等. 健胎液对胚泡着床障碍小鼠胚泡着床作用的研究[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(4):46.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:282, 309.
- [5] 刘雪平,严红. 肾康宁合剂质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,17(1): 67.
- [6] 李志金,杨存爱. 清咽颗粒的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(8): 81.
- [7] 程合理. 黄芪根、茎叶中黄芪甲苷的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(5): 57.
- [8] 全立国,梁瑞敏,冯玛莉,等. HPLC-ELSD 测定芪苓益肝颗粒中黄芪甲苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 72.
- [9] 李磊,李志军,周玉新,等. HPLC 测定排氟片中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 37.
- [10] 赵建邦,马潇. HPLC-ELSD 测定补肺丸中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(4): 89.

[责任编辑 顾雪竹]