

养正合剂质量标准研究

丛晓东 韦英杰 毛秋媚¹ 陈碧莲² 范光斌³ 何丽华(南京 210009 中国药科大学;¹ 清远 511500 广东清远商检局;² 杭州 310004 浙江省药品检验所;³ 衢州 324000 衢州制药总厂)

摘要 目的:建立养正合剂的质量控制方法。方法:用薄层色谱法对其中枸杞子、人参进行了定性鉴别;用薄层光密度法对黄芪中有效成分黄芪甲苷进行了含量测定。结果:表明本品定性鉴别色谱特征明显,易于区别;本品中黄芪甲苷含量测定线性范围为 $2 \sim 10 \mu\text{g}$,平均回收率 95.8% , RSD 为 2.5% 。结论:建立了该制剂的质量标准,其鉴别与含量测定方法简便、可靠、实用。

关键词 养正合剂;黄芪甲苷;薄层色谱;含量测定;人参;枸杞子

Studies on quality standard of Yangzheng mixture

Cong Xiaodong(Cong XD), Wei Yingjie(Wei YJ), Mao Qiumei(mao Q M), et al(China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** Establish a method for the quality control of Yangzheng mixture. **METHOD:** *Radix Astragali*, *Radix Ginseng*, *Fructus Lycii*, were identified by TLC. A method of thin-layer densitometry to determine astragaloside A, the main effective component from *Radix Astragali* in the mixture, was developed. **RESULTS:** The studies on the quality control showed that the characteristics for identification by TLC were distinct. The quantification method had the linear range of $2 \sim 10 \mu\text{g}$. The average recovery was 95.8% and its RSD was 2.5% . **CONCLUSION:** The quality standard of the mixture was provided. The methods for identification and quantification were simple, reproducible and realizable.

KEY WORDS Yangzheng mixture, mixture, astragaloside A, TLC, determination, *Radix Astragali*, *Radix Ginseng*, *Fructus Lycii*

养正合剂系国家卫生部最近批准的三类中药,由黄芪、人参、枸杞、猪苓等中药组成,具益气健脾、滋养肝肾、升白细胞作用。用于各种肿瘤患者化疗引起的白细胞减少。本合剂处方含有多糖、苷类、水溶性色素等成分,干扰因素较多,经多次实验,建立了薄层色谱检验方法,易检出黄芪、人参、枸杞。对该制剂中黄芪甲苷选择了合适的提取精制方法及色谱条件,进行了薄层光密度法定量测定。

1 仪器、试剂及样品

岛津 CS-9000 型薄层扫描仪;微量注射器(上海医用激光仪器厂);硅胶 G 薄层板(自制);试剂均为 AR 级;黄芪甲苷、齐墩果酸、人参二醇、人参三醇对照品(中国药品生物制品检定所),养正合剂(浙江衢州制药总厂)。

2 制法

按处方配比,称取各药味,加水 10 倍量,煮开后保持微沸,2.5h,取出药汁;药渣再加水 8 倍量,煮开后保持微沸,1.5h,取出药汁;药渣再加水 5 倍量,煮开后保持微沸,1.0h,取出药汁,合并 3 次药汁,浓缩到生药含量为 0.7g/ml 的药液,相对密度不低于 $1.05(60^\circ\text{C}$ 测定),置 2°C 冷藏 48h,过滤,取甜菊苷[卫药准字 90(F-04-02)] 140g ,于适量的热水中溶解后加入药液中,用 5mol/L NaOH(中国药典),调 pH 至 6.0 左右,调整总量到 100L ,使生药含量为 0.6g/ml ,相对密度不低于 $1.02(60^\circ\text{C}$ 测定),灌装,灭菌即得。

3 定性鉴别

3.1 取本品 20ml ,用乙醚萃取 2 次,每次 20ml ,合并醚液,用水洗涤 2 次,每次 20ml ,弃去水液,将醚液用 5g 无水硫酸钠干燥,回收乙醚至干,用展开剂 S_1 [氯仿-乙醚(2:1)] 0.5ml 溶解,作为供试品液,另取枸杞子粉末

5g,用95%乙醇50ml冷浸过夜,过滤,滤液减压回收乙醇至干,用上述展开剂2ml溶解作为对照液。依照薄层色谱法(中国药典1990版一部附录57页)试验,吸取上述2种溶液各5 μ l,点于同一硅胶G薄层板上,以展开剂 S_1 展开,取出,晾干,置紫外灯(365nm)下检视,供试品与对照品色谱相应位置上,呈相同的蓝色荧光斑点(图1)。

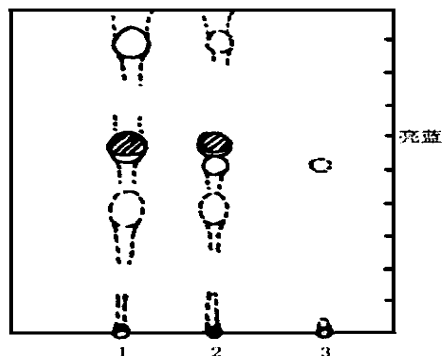


图1 TLC图

1 - 供试品;2 - 枸杞子对照药材;3 - 阴性对照

3.2 取本品30ml,用氯仿萃取2次,每次10ml,取水层并加入95%乙醇30ml,浓硫酸3ml,水浴回流4h,蒸去乙醇,用氯仿萃取2次,每次10ml,合并氯仿液,水洗,蒸去氯仿,另加氯仿0.25~0.5ml,使溶解,作为供试品溶液。

取齐墩果酸、人参二醇、人参三醇标准品各1mg,分别置1ml量瓶中,加氯仿定容,作为对照品溶液。

照薄层色谱法(中国药典1990版一部附录,下同)试验,吸取供试品与对照品溶液各5 μ l,点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-甲酸甲酯-甲酸(10:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,用10%硫酸乙醇液显色,于105℃下烘烤5min,在供试品色谱中,与对照品色谱相在相应的位置上至有相同颜色的斑点相对应(图2)。

4 含量测定

黄芪系本品方中主要药味,所含黄芪苷为黄芪的特征成分与有效成分。关于黄芪甲苷的含量测定方法主要为TLC扫描方法^[1,2],本标准的建立主要参考文献^[1],并加以改进。

4.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品,用甲醇溶解,定容,制成浓度为1mg/ml的溶液,作为对照品溶液。

4.2 供试品溶液的制备 精密吸取本品20ml,以水饱和和正丁醇,萃取3次(20,20,20ml),合并正丁醇提取液,以氨试液(中国药典1990版一部附录95页)洗2次,合并正丁醇层。氨试液层以水饱和和正丁醇洗2次(10ml,

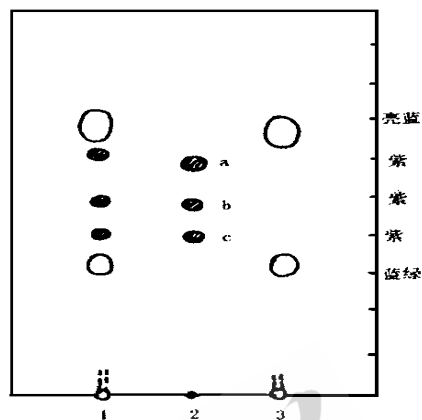


图2 TLC图

1 - 供试品;2 - 对照品;3 - 阴性对照;a - 齐墩果酸;b - 人参二醇;c - 人参三醇

10ml),正丁醇层与前次正丁醇层合并,减压回收正丁醇至干,用水3~5ml溶解至10l,大孔树脂柱上(1.5×12cm),流速为1.5ml/min,分别以水50ml,40%乙醇30ml冲洗,弃去洗脱液,再用70%乙醇50ml洗脱,收集洗脱液,蒸干以适量甲醇溶解,定容至2ml,置冰箱内静置,即为供试品。

4.3 薄层色谱仪扫描条件 取供试品上清液4.0~10.0 μ l,对照品溶液4 μ l(低剂量),8 μ l(高剂量),间隔点于硅胶G薄层板上,以氯仿-甲醇-水(65:35:10,下层)为展开剂,展开,取出,晾干,喷10%硫酸乙醇液,105℃烘5min,盖上玻璃板,胶布密封,放置0.5h后,扫描测定, $\lambda_S=520nm$, $\lambda_R=700nm$,反射锯齿扫描,按外标两点法计算含量(仪器其它参数: SX=3;SLIT=2×2mm;DELTY=0.5)。

4.4 线性关系 精密吸取对照品溶液2,4,6,8和10 μ l,点于同一薄层板上,按拟定条件展开,显色,放置0.5h后扫描测定。结果见表1所示。以对照品为横坐标,斑点峰面积积分为纵坐标作图(图3),除1 μ l点外,均呈良好线性关系。回归方程为: $Y=3847.7X+844.6$, $r=0.9996$,因此用外标两点法计算含量。

表1 养正合剂中黄芪甲苷的线性关系测定结果

X点样体积/ μ l	X点样量/ μ g	Y积分面积
2	2.00	8141
4	4.00	16643
6	6.00	24007
8	8.00	31847
10	10.00	39016

4.5 稳定性试验 取对照品溶液点于薄层板上,展

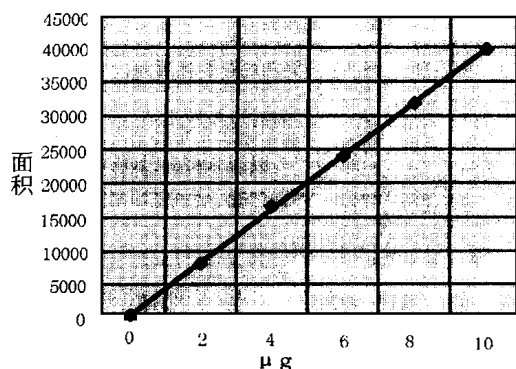


图3 黄芪甲苷线性关系图

开,显色,于0.5~2.5h内测定,结果(表2)表明薄层显色后,0.5~2.5h内测定结果稳定。

表2 养正合剂中黄芪甲苷显色稳定性测定结果/6μl

		时间/h					
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
1	峰面积*	24480	24210	24600	23680	23900	22489
2	峰面积*	25141	24864	25264	24320	24545	23100

注:*2次平均值 RSD小于2%

4.6 精密度实验 于同一薄层板上,分别取对照品溶液6次,各6.0μl,点样,按拟定条件测定,结果精密度为2.2%。表明点样与仪器误差符合要求。

表3 养正合剂中黄芪甲苷同板精密度测定结果(6μl)

编号	峰面积	平均值	RSD/ %
1	25751	25250 ±560	2.2
2	25530		
3	25920		
4	24989		
5	24566		
6	24746		

取同一样品6份,按供试品溶液制备项下操作,分别点于6块薄层板上,按拟定条件测定,结果精密度为4.8%。

表4 养正合剂中黄芪甲苷不同板精密度测定结果

薄板编号	峰面积	平均值	RSD/ %
1	25951	24550 ±1183	4.8
2	25230		
3	25520		
4	24089		
5	23066		
6	23446		

4.7 回收率试验 精密称取黄芪甲苷标准品1.00mg,置10ml量瓶中,用甲醇溶解、定容,作为对照品溶液。

精密吸取已知含量(0.0460mg/ml,931213)养正合剂样品20ml,置分液漏斗中,分别精密加入对照品溶液0.50ml,按拟定方法进行测定,其中点样量为10.0μl,随行的已知含量供试液按下式计算回收率,其测定结果见表5所示。

表5 养正合剂黄芪甲苷回收率试验结果

TLC 编号	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
1	2.25	2.12	94.2	95.8 ±2.5	2.5
2	2.25	2.12	99.1		
3	2.25	2.11	93.8		
4	2.25	2.11	93.8		
5	2.25	2.22	98.7		
6	2.25	2.15	95.6		

4.8 样品测定 精密吸取4.2项下供试品溶液4~10μl,对照品溶液4和8μl,间隔点于同一薄层板上,依前述试验条件进行测定,用外标两点法计算含量(每个批号测定2次,取平均值),结果见表6。

表6 养正合剂黄芪甲苷含量测定结果

批号	含量/ mg·ml ⁻¹	RSD/ %
931207	0.076	6.0
931208	0.031	5.9
931209	0.030	5.8
931210	0.050	4.0
931211	0.055	4.5
931213	0.046	4.2
931214	0.120	6.8
931215	0.042	5.0
931216	0.034	5.8
931217	0.035	5.6

表6数据表明,最低含量为0.030mg/ml,考虑大生产条件的影响,含量暂定不得低于0.028mg/ml。

4.9 空白试验 空白液的制备:按处方比例,扣除黄芪后,投料,同2制法项下。即得空白液。

空白供试液的制备:精密吸取本品20ml,按4.2项下供试品溶液的制备操作即得空白供试液。

空白供试液的测定:取空白供试液20.0μl,对照品溶液5.0μl,供试品溶液10.0μl,按4.3项下条件操作。结果表明空白供试液的TLC色谱与对照品溶液的TLC色谱在相应位置上没有吸收峰(图4)。

5 讨论

5.1 本品中的定性鉴别与含量测定均进行了阴性对照,结果表明各薄层斑点不受样品中其它各药味的干

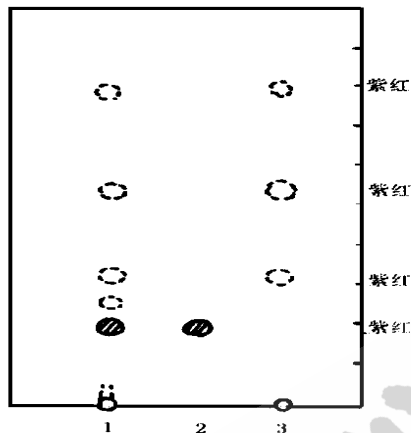


图4 TLC图

1 - 供试品 ;2 - 黄芪甲苷对照品 ;3 - 阴性对照

扰,专属性较强、简单易重复,可作为本品定性检测指标。

5.2 本品中人参皂苷 R_c 、 R_g 等特征性成分,用硅胶 G、氯仿-甲醇-水(65:35:10)下层进行 TLC 鉴别,斑点不明显,重现性差。根据人参中多种皂苷水解后主要变为三萜皂苷元,即齐墩果酸,人参二醇及人参三醇,且人参二醇与人参三醇为人参属的特征性成分,具鉴别意义。

5.3 处方中中药经过提取配成液后,药液的 pH 值一般偏低,约在 $pH=4.4$ 左右,这时药液中的许多成分在酸性条件析出易沉淀下来,药液不稳定,有效成分易于损失。所以,药液在配好后需用氢氧化钠溶液调节 pH 值至中性,增加有效成分的溶解度。实验表明,在 $pH>5.0$ 时,中药成分的溶解度趋向合理,但随着 pH 值的增

高,药液的味道变得不十分理想,特别是 $pH>8$ 以后,药液变得不稳定,味感极差,所以,药液配好后, pH 一般控制在 6.0 左右为佳。

5.4 相对密度 在 60℃ 条件下,检测数据表明,相对密度通常在 1.02~1.06 之间,相对密度定为不低于 1.02 为好。

5.5 黄芪中黄芪甲苷 TLC-S 测定方法易学难精,为了提高测定方法的准确性,克服重现性差的缺点,在方法上做了如下改进:①操作条件尽量保持平行。如每份样品间加入正丁醇体积,萃取振摇频率、强度、时间保持一致。②消除树脂中残留物的影响。树脂按常规方法用稀酸稀碱漂洗,装柱后分别用 95%乙醇、40%乙醇冲洗树脂残留有机物,洗脱液在 254nm 处,以 95%乙醇为空白,无吸收即可),用水平衡后上样。③定量转移,流速要控制。减压回收正丁醇后,先用水 3~5ml 溶解,分别中入水 20、15 和 15ml;40%乙醇 15 和 15ml 依次洗涤容器,依次定量转移到树脂柱中,洗脱,流速控制在 1.5~2ml/min。④减少柱壁效应的影响。因为树脂对水、95%乙醇、40%乙醇的膨胀系数不同,更换流动相时,柱床体积发生变化,致使一些样品与柱床交换或吸附不充分,沿柱壁流出。克服的办法是:在每次更换流动相时,最初洗脱液,约 2~3 个柱体积,应返回柱上。⑤70%乙醇洗脱液回收乙醇至干后,分次加入乙醇,超声溶解,定量转移到 2ml 量瓶中,摇匀,冰箱内放置是澄清。⑥供试品显色后,盖上玻板密封,30min 后测定,因显色后呈鲜紫红色,放置 2~15min 斑点颜色即发生变化,0.5~2.5h 趋于稳定。