

梔芩合剂质量控制方法的研究

陈晓亮¹,汪旭²

(1. 海口市人民医院,海南 海口 570208;2. 长春八一医院,吉林 长春 130024)

摘要:目的 提高并完善非标准制剂梔芩合剂质量标准。**方法** 采用薄层色谱法(TLC)对梔芩合剂中梔子、黄柏、黄芩的定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定梔芩合剂中黄芩苷的含量。色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),以甲醇-0.1%磷酸溶液(45:55)为流动相,流速为1.0 mL·min⁻¹,检测波长为280 nm。**结果** 在TLC定性鉴别中,供试品在与对照药材(或对照品)相应位置上出现相对应的特征斑点,阴性对照在相对应位置无干扰,专属性强;HPLC法可以测定黄芩苷的含量,黄芩苷的线性范围为0.096 4~0.867 6 μg($r=1$),平均加样回收率为99.08%($n=9$,RSD=1.17%)。**结论** 该质量标准确保梔芩合剂快速定性、定量分析,实验方法简单、重复性良好,结果稳定、可靠,能够用于梔芩合剂的质量控制。

关键词:梔芩合剂;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;黄芩苷

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.01.010

Quality control method of zhiqin mixture

CHEN Xiaoliang¹,WANG Xu²

(1. Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China;

2. Department of Pharmacy, Bayi Hospital of Changchun, Changchun, Jilin 130024, China)

Abstract: Objective To improve and complete the quality standards of the off-standard preparation of zhiqin mixture. **Methods** TLC was used to make qualitative identification of gardenia, golden cypress and Scutellaria baicalensis in zhiqin mixture; HPLC was used to determine the content of the baicalin in zhiqin mixture. Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, with the mixture of methanol-0.1% phosphoric acid (45:55) as the mobile phase. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹, and the wavelength for detection was 280 nm. **Results** In the qualitative identification of TLC, the test samples had correspondent characteristic spots in the locations in accordant with that in contrasted medicines (or contrasted articles), while the negative control was not disturbed in the correspondent locations, which manifested strong specificity. The content of baicalin was determined by HPLC, the linearity range was good within 0.096 4~0.867 6 μg ($r=1$), and the average recovery was 99.08% ($n=9$, RSD=1.17%). **Conclusions** The method to guarantee the quick qualitative analysis and quantitative analysis of Zhiqin mixture by establishing the quality standard is simple, repeatable, stable and reliable, which can be used for the quality control of zhiqin mixture.

Key words: Zhiqin mixture; Quality standard; TLC; HPLC; Baicalin

梔芩合剂为医院院内制剂,处方由梔子、黄芩、黄柏、大黄、天花粉、知母六味中药组成,诸药组合,清热解毒,消痈散结,临床用于治疗中、重度寻常痤疮。本实验对梔芩合剂进行了规范化研究,采用薄层色谱法(TLC)对梔子、黄柏、黄芩进行定性鉴别,黄芩为方中君药,黄芩苷为黄芩主要有效成分之

一,具有广泛的药理活性,有文献报道其具有抗心律失常、降压、缺血性在灌注损伤保护、镇静、护肝利胆、抗肺炎衣原体、抗寄生虫等多种药理活性^[1-3],本实验查阅相关文献及先前试验研究结果^[4-7],采用高效液相色谱法(HPLC)对梔芩合剂中主要成分黄芩苷进行定量测定,通过对黄芩苷的含

[3] 温放,王越. 凤仙花记趣[J]. 中国花卉盆景,2007(11):6-7.
[4] 刘向阳,高黎黎,黄艳梅,等. 在校女大学生指甲油使用状况及其与指(趾)甲损伤的关联性[J]. 河南预防医学杂志,2010,21(6):407-409.
[5] 张建新. 指甲油涂料的制造[J]. 广州化工,1995,23(1):22-23.
[6] 佟丽丽. 指甲油中有害物质的分析研究[D]. 天津:天津大学,2013.
[7] 陈琨,姚媛艳. 气相色谱法同时测定指甲油中的苯系物和邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 中国环境监测,2011,27(2):59-

62.
[8] 夏俊鹏,吴飞,邵爱梅,等. 气相色谱-质谱法测定指甲油中17种挥发性有机溶剂[J]. 理化检验(化学分册),2013,49(11):1297-1300.
[9] 许海燕,孙伟,张兴元,等. 基于水性聚氨酯分散体的环保无毒型水性指甲油的研制及应用[J]. 涂料技术与文摘,2016,37(5):34-37.
[10] 杨明明,于胜祥. 采裸凤仙染指甲[J]. 科学世界,2009(7):48-52.

(收稿日期:2016-08-05,修回日期:2016-09-04)

量控制考察制剂的质量,为其建立该制剂质量控制标准提供了相关依据。

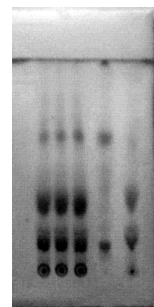
1 仪器与试药

岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪(UV-VIS 检测器,自动进样器,岛津 LCsolution 工作站);赛多利斯 PB-10 型电子天平($d = 0.01 \text{ mg}/100 \text{ g}$);KQ-3200E 数控超声波处理器(超声频率 40 Hz,超声功率 150 W,昆山市超声仪器公司)。梔子(批号:ZD1227BA13,中国食品药品检定研究院);黄柏(批号:121510-201105,中国食品药品检定研究院);黄芩(批号:120955-201007,中国食品药品检定研究院);盐酸小檗碱(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,含量以 86.7% 计,批号:110713-201212)黄芩苷(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,含量以 95.2% 计,批号:110715-201112),甲醇为色谱纯(Grace 公司);其它所用试剂均为分析纯;梔子合剂(规格:240 毫升/袋,批号:20150325、20150408、20150418)。

2 方法与结果

2.1 梔子合剂中梔子、黄柏、黄芩的定性鉴别

2.1.1 梔子薄层色谱鉴别 量取梔子合剂 20 mL,加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 20 mL,震荡摇匀,加热至约 80°C ,放冷,滤过,滤液用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH 值至中性,放入水浴锅上蒸干,残渣加入 2 mL 乙醇溶液搅拌使之溶解,滤掉残渣,滤液即为供试品溶液。取梔子的对照药材称取 0.5 g,加入乙醇溶液 10 mL,经过 10 min 超声处理,滤过后所得滤液作为对照药材溶液。参照梔子合剂制备工艺,取缺梔子药材的阴性对照制剂按上述方法制备阴性样品溶液。参照 2015 版《中国药典》第四部通则 0502 项下 TLC 法进行试验^[8],取对照药材溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 5 μL ,在同一块硅胶 G 薄层层析预制板上分别点样,展开剂为环己烷-甲酸-水(5:2:1),放入用展开剂饱和后的展开缸中展开,取出,风干后在通风厨中喷以硫酸乙醇(1:10)溶液,将薄层板放入已预热的 105°C 烤箱中加热,使薄层板上斑点清晰显色,在此薄层色谱中,对照药材溶液经显色出现系列斑点,供试品溶液在相对应的位置上同时出现相同色泽的斑点,缺梔子药材的阴性样品溶液在该薄层板上未出现相同色泽斑点干扰,结果见图 1。

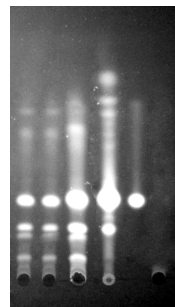


1 2 3 4 5

注:1、2、3. 供试品;4. 梔子对照药材;5. 阴性样品(不含梔子)。

图 1 梔子 TLC 图谱

2.1.2 黄柏薄层色谱鉴别 量取本品 10 mL,放置于水浴锅上蒸至近干,加入甲醇 20 mL 于蒸发皿中,经超声处理 10 min,过滤残渣,滤液水浴锅上浓缩至 2 mL,浓缩液即为供试品溶液。取黄柏的对照药材称取 0.5 g,加入甲醇溶液 20 mL,经 10 min 超声处理,滤过残渣,将滤液置于水浴锅上浓缩至 2 mL 即为对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品适量,加入甲醇溶液制成浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。参照梔子合剂制备工艺,取缺黄柏药材的阴性对照制剂按上述方法制备阴性样品溶液。参照 2015 版《中国药典》第四部通则 0502 项下 TLC 法试验^[8],分别取对照药材溶液、小檗碱对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 5 μL ,于同一块硅胶 G 薄层层析预制板上分别点样,展开剂为环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:1:1),置氨蒸气预饱和后的展开缸内展开,取出,风干后放置于 365 nm 的紫外光灯下检视。在硅胶 G 薄层层析预制板中,对照药材溶液、对照品溶液在紫外灯下显示出亮黄色荧光斑点,供试品溶液在相对应的位置上同时也显示出相同色泽的荧光斑点,缺黄柏药材的阴性样品溶液在该薄层板上未见相同色泽斑点干扰,结果见图 2。

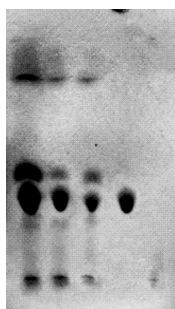


1 2 3 4 5 6

注:1、2、3. 供试品;4. 黄柏对照药材;5. 盐酸小檗碱;6. 阴性样品(不含黄柏)。

图 2 黄柏 TLC 图谱

2.1.3 黄芩薄层色谱鉴别 量取本品 50 mL, 放置于水浴锅上蒸至近干, 加入甲醇 20 mL, 转移至具塞锥形瓶中, 放入超声槽中 10 min 超声处理, 残渣过滤, 滤液置于水浴锅上浓缩至 5 mL, 作为供试品溶液。称取黄芩苷对照品适量, 加入甲醇溶液制成浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。参照梔芩合剂制备工艺, 取缺黄芩药材的阴性对照制剂按上述溶液制备方法制备阴性样品溶液。参照 2015 版《中国药典》第四部通则 0502 项下 TLC 法试验^[8], 分别取对照品溶液 5 μL 、供试品溶液 10 μL 及阴性样品溶液 10 μL , 同一含 4% 醋酸钠的 CMC-NA 溶液为黏合剂的硅胶 G 薄层板上分别点样, 展开剂为乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水(5:2:1:1), 置于展开缸中预饱和 30 min, 将薄层板放入展开剂中展开, 取出, 风干后在通风橱中喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液显色。在此硅胶 G 薄层板上, 对照品溶液显色出浅墨绿色斑点, 供试品溶液在相对应的位置上同时出现相同色泽的斑点, 缺黄芩阴性样品溶液薄层板上未见相似色泽斑点干扰, 结果见图 3。



1 2 3 4 5

注: 1、2、3. 供试品; 4. 黄芩对照药材; 5. 阴性样品(不含黄芩)。

图3 黄芩 TLC 图谱

2.2 黄芩苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 以 WondaSil C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 柱为色谱柱; 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(45:55); 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; UV 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μL 。理论板数按黄芩苷($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$)峰计算应不低于 2 500。

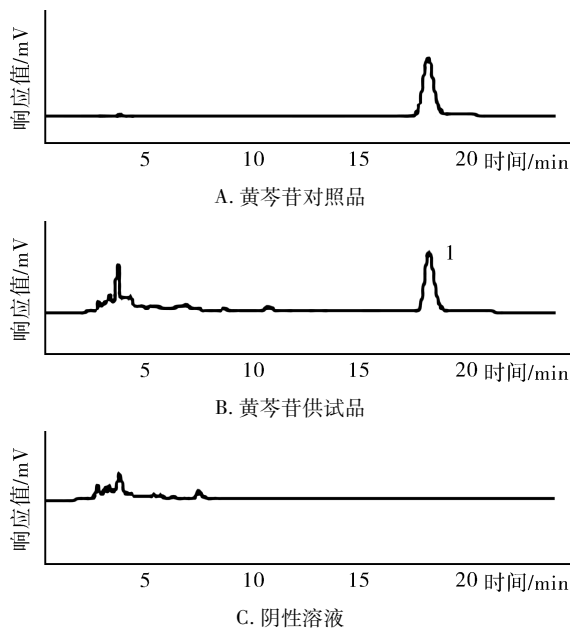
2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的黄芩苷对照品适量, 置于 25 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 从中取 2 mL 加入 10 mL 容量瓶中, 70% 乙醇溶液制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液, 即为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 1 mL, 置于 50 mL 的容量瓶中, 加 70% 乙醇溶液定容至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜滤过, 即为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液制备 参照处方成分配比及

制备工艺, 制备不含黄芩药材的阴性对照制剂, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 专属性实验 采用“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 分别抽取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL 进样, 记录 HPLC 色谱图。结果表明: 黄芩苷色谱峰分离度较好, 黄芩苷对照品色谱峰相应的位置上(约 18.5 min), 阴性样品无干扰峰出现, 由此说明处方中其它成分在此实验条件下对目标含量测定成分黄芩苷的测定结果没有造成干扰, 此方法专属性良好。以上三种溶液的色谱图见图 4。



注: 1. 黄芩苷。

图4 黄芩苷 HPLC 色谱图

2.2.6 线性关系的考察 精密称取黄芩苷对照品适量, 加 70% 乙醇溶液制成每 1 mL 含 0.024 1 mg 的溶液, 分别精密吸取该对照品溶液 4、12、20、28、36 μL , 按“2.2.1”项下色谱条件分别注入高效液相色谱仪, 测定黄芩苷峰面积, 以进样量为横坐标, 纵坐标为黄芩苷峰面积积分值, 对其进行线性回归, 其回归方程为 $Y = 4 \times 10^6 X + 3354.3$, $r = 1$, 结果表明: 黄芩苷进样量与峰面积积分值在 0.096 4 ~ 0.867 6 μg 之间呈线性关系。

2.2.7 精密度考察 抽取黄芩苷同一对照品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 连续重复注入 6 次, 按“2.2.1”项下色谱条件测定黄芩苷峰面积, 结果黄芩苷峰面积 RSD 为 0.13% ($n = 6$), 表明此方法下本测量设备精密度考察符合要求。

2.2.8 稳定性实验 取供试品溶液(批号: 20150325), 室温放置, 分别取放置 0、4、8、12、16、24 h 的供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定黄芩苷

表1 黄芩苷回收率实验结果

编号	取样量/mL	样品量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.40	0.863 0	0.889 1	1.227 7	98.90	99.08	1.17
2	0.40	0.863 0	0.889 1	1.235 9	100.06		
3	0.40	0.863 0	0.889 1	1.241 1	100.81		
4	0.50	1.078 7	1.098 2	2.152 3	97.76		
5	0.50	1.078 7	1.098 2	2.169 8	99.35		
6	0.50	1.078 7	1.098 2	2.156 9	98.18		
7	0.60	1.294 4	1.312 5	2.589 8	98.69		
8	0.60	1.294 4	1.312 5	2.612 5	100.42		
9	0.60	1.294 4	1.342 5	2.604 5	97.58		

的含量,以考察测定环境下供试品溶液放置后稳定性。RSD为0.19% ($n=6$),表明供试品溶液在室温条件下24 h内稳定性符合测定要求。

2.2.9 重复性实验 取批号为20150325的梔芩合剂6份,按“2.2.3”项下制备供试品溶液方法进行制备样品,参照“2.2.1”项下色谱条件对黄芩苷进行含量测定,计算黄芩苷的平均含量为 $2.1574\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,RSD为1.29%,结果表明此种方法测量结果偏差较小,重复性符合测定要求。

2.2.10 加样回收率实验 精密量取梔芩合剂(批号:20150325,黄芩苷含量为 $2.1574\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;详见重复性实验)0.40、0.50、0.60 mL三个梯度测试品各3份,分别放至于50 mL容量瓶中,再分别取适量黄芩苷对照品放入各容量瓶中,加入70%乙醇溶液混合稀释至刻度,振荡摇匀作为供试品溶液,参照“2.2.1”项下色谱条件进样,测定样品中黄芩苷的含量,通过公式计算加样回收率,实验数据及测定结果见表1。最终结果表明,本实验中的样品处理方法准确可行。

2.2.11 样品含量测定 参照“2.2.3”项下方法取三个批次的梔芩合剂制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,分别测定三个批次梔芩合剂中黄芩苷的含量,测定结果见表2。

表2 梔芩合剂中黄芩苷的含量测定结果

批号	黄芩苷的含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
20150325	2.1570
20150408	2.1047
20150418	2.0894

3 讨论

本制剂是以梔子、黄芩、黄柏、大黄、天花粉、知母六味中药组成复方制剂,采用TLC法对梔芩合剂中梔子、黄柏、黄芩进行了定性鉴别,结果显示三种薄层鉴别斑点清楚,专属性强。在对黄柏进行薄层鉴别时,考虑到《中国药典》2015版一部黄柏项下展

开剂含毒性试剂苯,本试验用环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:0.5:1)为展开剂,避免了试剂苯的高毒性。

本试验含量测定的流动相选择上,曾考察以甲醇-水(1:1)、乙腈-0.5%磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH值为3.2)(32:68)为流动相,结果显示黄芩苷色谱峰峰型不符合测定要求,色谱峰重叠,与样品中其它药味的色谱峰的分离度小于1.5,2015年版《中国药典》采用甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)与甲醇-水-磷酸(45:55:0.1),均能达到使制剂中各成分与黄芩苷分离,考虑0.2%磷酸溶液酸性较强对色谱柱使用寿命考虑,故选甲醇-0.1%磷酸溶液(45:55)作为含量测定的流动相。

含量测定项下供试品溶液制备曾考察用70%乙醇、95%乙醇、70%甲醇及甲醇溶解,考虑到甲醇毒性较大,本文选用70%乙醇作为提取溶剂。

黄芩为梔芩合剂的君药,有大量文献阐述黄芩中黄芩苷为主要药效成分,且被证实存在广泛的药理活性,以黄芩苷为考察指标进行含量测定是合理的。

参考文献

- [1] 文敏,李雪,付守廷.黄芩苷药理作用研究新进展[J].沈阳药科大学学报,2008,25(2):158-161.
- [2] 孟妹,杨友田,林玉莲.利胆片中黄芩苷的含量测定及其质量评价[J].中国药房,2013,24(3):736-738.
- [3] 李文霞,宋平顺.HPLC法同时测定三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J].药学进展,2011,35(4):178-181.
- [4] 闫春风,刘井利,朱磊,等.柴芩软胶囊质量标准研究[J].中国医药导报,2013,10(27):100-103.
- [5] 汪旭,金向群,岳峻威,等.芩芩慢咽滴丸中黄芩苷的含量测定[J].时珍国医国药,2009,20(6):1447-1448.
- [6] 姜清华,刘莉,孙箫,等.浓百精简合剂质量控制方法的研究[J].实用药物与临床,2016,19(3):347-350.
- [7] 汪旭,黄翠,严铁,等.HPLC法测定皮康净乳膏中醋酸氟轻松和丹皮酚的含量[J].解放军药学报,2015,31(5):396-398.
- [8] 国家药典委员会.中国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015.

(收稿日期:2016-08-18,修回日期:2016-09-12)