

· 药物分析 ·

化瘀散结灌肠液的定性、定量分析方法研究

青海省大通县人民医院(810100) 张中秋

摘要 目的:建立化瘀散结灌肠液的定性、定量分析方法。方法:采用薄层色谱法鉴别原儿茶醛;采用高效液相色谱法测定化瘀散结灌肠液中芍药苷的含量。结果:高效液相色谱法测得芍药苷在(0.507 2~2.536 0) μg 范围内呈良好的线形关系,平均回收率为99.63%,RSD=2.65%。结论:本研究方法简便、稳定、专属性强,能有效控制化瘀散结灌肠液的质量。

关键词 化瘀散结灌肠液 薄层色谱 高效液相色谱 芍药苷 原儿茶醛

中图分类号 R285.1

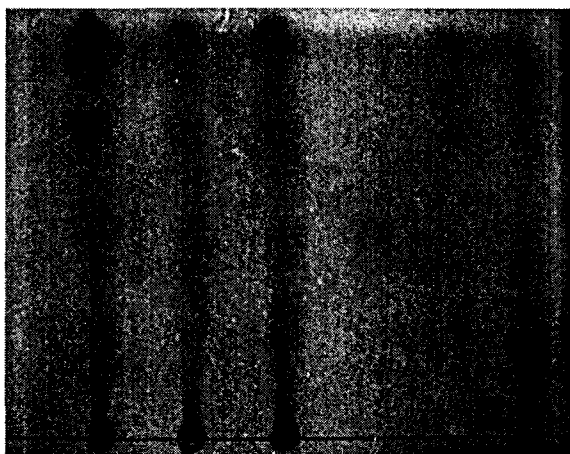
化瘀散结灌肠液是由当归、赤芍、丹参、川芎、地黄等十五味药材制成的一种复方制剂,具有活血化瘀、软坚散结、清热解毒的功效,医院常用于治疗慢性盆腔炎。化瘀散结灌肠液质量标准收载于《大通县医院制剂标准》中,原标准只有常规检验,不能很好地控制该制剂的质量。因丹参为水提,本文采用薄层色谱法对化瘀散结灌肠液中丹参的水溶性成分原儿茶醛进行了薄层鉴别,用高效液相色谱法测定了该制剂中赤芍的有效成分芍药苷的含量,以此作为该制剂的质量控制指标。

仪器与试药

AgiLent1100型高效液相色谱仪(低压四元泵,自动进样器,柱温箱,二级管阵列检测器,ChemStations色谱工作站);WFH-203B三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);SB2200型超声波清洗机(上海必胜信仪器厂)。原儿茶醛对照品(批号:773-200201,纯度99%以上),芍药苷对照品(批号:110736-200424)均购自中国药品生物制品检定所。化瘀散结灌肠液由青海省大通县人民医院提供(批号:20080215,20080301,20080405);硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司)。试剂均为分析纯,甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水。

方法与结果

1 原儿茶醛的薄层鉴别^[1] 取本品20mL,加盐酸调pH值至2~3,再用乙醚振摇提取2次,每次20mL,合并乙醚液,挥干,残渣加乙醇1mL溶解,作为供试品溶液。另取原儿茶醛对照品,加乙醇制成每1mL含1mg的溶液,作为对照品溶液。再取按模拟处方除去赤芍的其他药味,按供试品溶液方法制成阴性溶液。照薄层色谱法《中国药典》2005年版一部(附录VIB)^[2]试验,吸取对照品溶液5 μL 、供试品溶液10 μL 、阴性溶液10 μL ,分别点于同一硅胶GF254薄层板上,以三氯甲烷-丙酮-甲酸(12:1:0.4)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254nm)下检视。供试品色谱中,在与原儿茶醛对照品色谱相应的位置上显相同的暗色斑点,再置碘蒸气中显色,显相同的黄棕色斑点,阴性无干扰。见图1。



1、供试品(20080215);2、供试品(20080301);
3、供试品(20080405);4、原儿茶醛;5、阴性。

图1 化瘀散结灌肠液中原儿茶醛的TLC图谱

2 化瘀散结灌肠液中赤芍的有效成分芍药苷的含量测定^[3]。

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Phenomenex Luna(250mm \times 4.6mm,5 μm)C₁₈柱;流动相:甲醇-0.05mol/L磷酸二氢钾溶液(24:76);检

测波长:230nm;柱温:25℃;流速:1mL/min;理论板数按芍药苷峰计算为不低于5 000。

2.2 分析溶液的制备 对照品溶液的制备,精密称取芍药苷对照品0.006 34g,加入50%甲醇溶解,并定容至50 mL容量瓶中,摇匀,作为对照品溶液(每1mL含芍药苷0.126 8mg)。

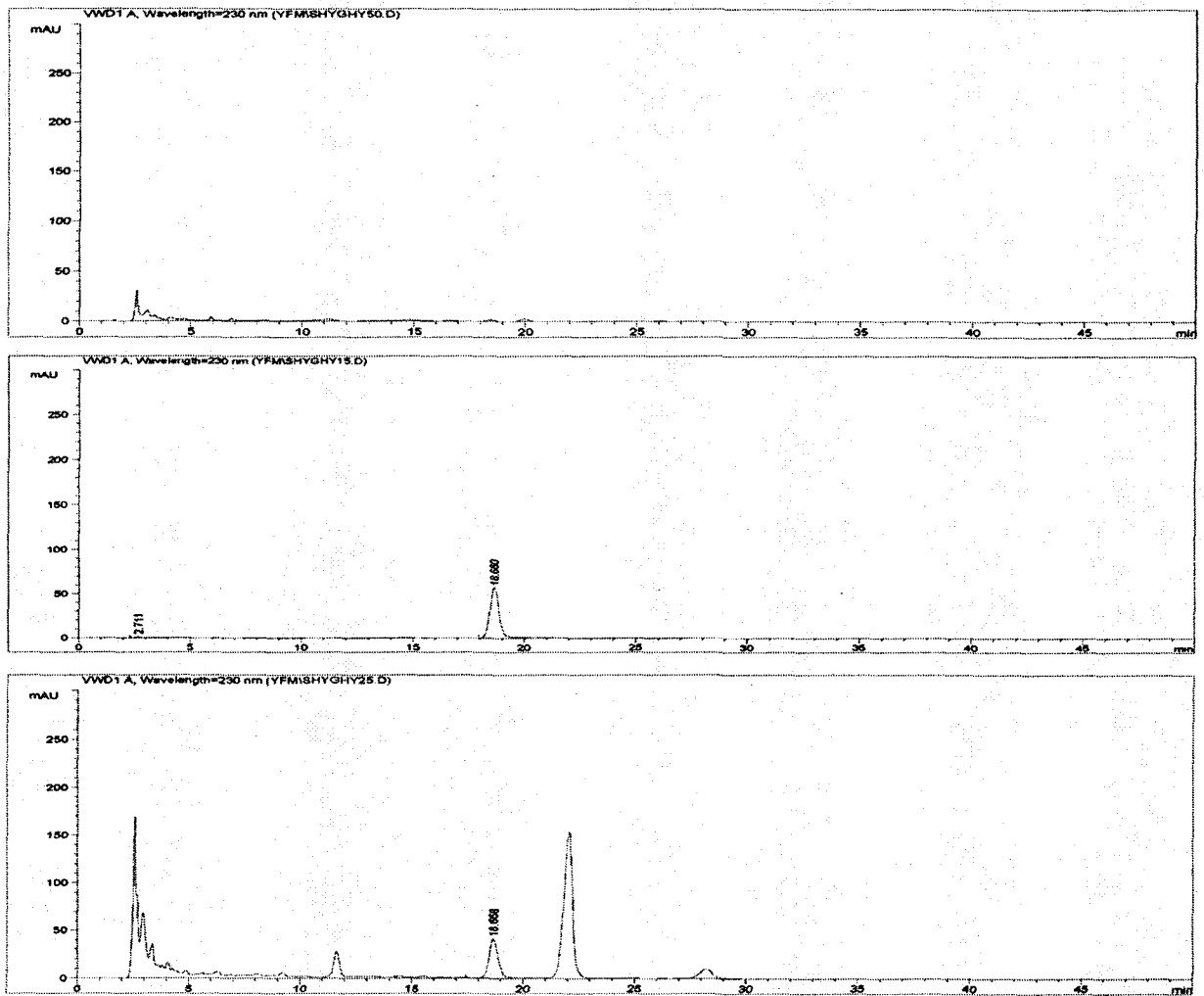
供试品溶液制备,精密量取本品3mL,通过中性氧化铝柱(100目~200目,5g,内径1cm,用50%甲醇10mL预洗)用50%甲醇洗脱,收集洗脱液,转移至50mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,

0.45μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照溶液的制备,按处方比例称取除去赤芍的其他药材适量,依照化痔散结灌肠液的制备工艺和供试品溶液的制备方法,制成阴性对照溶液。

2.3 分析方法学验证

2.3.1 色谱图分析 在上述色谱条件下,精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各10μL,分别注入色谱仪。供试品色谱图中,在与对照品色谱图相应保留时间上,有一相同的色谱峰,而阴性对照在此无干扰。见图2。



1、阴性对照供试品;2、芍药苷对照品;3、供试品。

图2 化痔散结灌肠液 HPLC 图谱

2.3.2 线性关系考察

分别精密吸取芍药苷对照品溶液(0.126 8mg/mL),4μL、8μL、12μL、16μL、20μL注入液相色谱

仪,在上述色谱条件下,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线。见表1。

表1 线性关系考察结果

进样量(μg)	0.507 2	1.014 4	1.521 6	2.028 8	2.536 0
峰面积	618.420 84	1 242.045 17	1 918.681 76	2 582.946 53	3 245.446 53

求得回归方程: $Y = 1\ 300.266\ 7X - 56.977\ 7$, $r = 0.999\ 9$ 。

结果表明:芍药苷在(0.507 2 ~ 2.536 0) μg 范围内有良好的线性关系。

2.3.3 精密度实验 精密吸取芍药苷对照品溶液(0.126 8mg/mL) 10 μL, 连续进样 5 次, 测得芍药苷峰面积, 见表 2。结果表明:芍药苷的精密度良好。

表2 精密度试验结果

进样次数	1	2	3	4	5
峰面积	1 595.930 66	1 591.422 73	1 590.933 59	1 599.338 01	1 592.871 58
平均峰面积	1 594.099 31		RSD%		0.22

2.3.4 重现性实验 取同一批号(20080215)的样品 6 份, 按 2.2 项下的方法制成供试品溶液, 在上述色谱条件下, 测定芍药苷的含量。见表 3。结果表明:样品的重现性比较好, 方法比较稳定。

表3 重现性试验结果

样品称样量(mL)	3	3	3	3	3	3
含量(mg/mL)	1.46	1.45	1.49	1.50	1.50	1.50
平均含量(mg/mL)		1.48		RSD%		1.64

2.3.5 稳定性实验 精密吸取芍药苷对照品溶液(0.126 8mg/mL) 10 μL, 每隔 2h 进样一次, 测得芍药苷峰面积。见表 4。结果表明:芍药苷在 8 小时内基本稳定。

表4 稳定性试验结果

时间(h)	0	2	4	6	8
峰面积	1 595.157 71	1 593.051 27	1 592.009 03	1 592.385 99	1 593.385 62
RSD%			0.08		

2.4 加样回收率实验 精密称取已知芍药苷含量的样品 6 份(批号 20080215, 含量为 1.48mg/mL) 约 1.5mL, 分别加入三种不同量的芍药苷对照品溶液(0.501 2mg/mL), 按 2.2 项下的方法制成供试品溶液, 并按上述色谱条件测定芍药苷的含量, 计算回收率。见表 5。结果表明:平均回收率为 99.63%, RSD 为 2.65%, 回收率比较好, 方法可行。

2.5 样品测定 取三个批号的样品, 按 2.2 项下的方法制成供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 计算芍药苷

的含量。测定结果见表 6。

表5 回收率实验结果

样品取样量(mL)	样品含量(mg)	标准品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD%(n=6)
1.5	2.22	1.002 4	3.237 4	101.50		
1.5	2.22	1.002 4	3.246 4	102.39		
1.5	2.22	2.004 8	4.166 4	97.09	99.63	2.65
1.5	2.22	2.004 8	4.138 2	95.68		
1.5	2.22	3.007 2	5.238 3	100.37		
1.5	2.22	3.007 2	5.249 8	100.75		

表6 样品测定结果

批号	样品含量(mg/mL)	相对平均偏差(n=2)
20080215	1.51	0.30
20080301	1.46	0.27
20080405	1.48	0.30

讨 论

1) 由于方中有十五味药材, 曾采用乙醚脱脂、乙酸乙酯萃取, 虽杂质峰较少, 但转移率过低, 后采用过中性氧化铝柱, 用 50% 甲醇洗脱, 并将流动相进行了优化, 取得了比较好的分离效果。

2) 测定波长的选择: 将对照品溶液和供试品溶液进行紫外吸收光谱扫描。结果显示, 芍药苷在 230nm 波长处有最大吸收, 对照品和供试品在此波长处的光谱图基本重合, 故选择 230nm 为测定波长, 并且采用二极管阵列检测器对峰进行了确认。

3) 用 50% 甲醇溶解供试品进样检测时, 流动相的浓度对芍药苷的分离及峰形有一定的影响。曾用甲醇-水系统进行分离, 芍药苷峰易出现脱尾、前沿等现象, 加入磷酸调 pH 值至 3 后, 分离效果比较好。后改为甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相, 不需用磷酸调 pH 值就可得到比较好的峰形和分离度, 确定比例为(24:76)时峰形及出峰时间适宜。

参 考 文 献

- 刘训红, 王玉玺, 房克慧, 等. 中药材薄层色谱鉴别. 天津: 天津科学技术出版社, 1990, 173.
- 国家药典委员会, 编. 中国药典. (一)部. 北京: 化学工业出版社, 2005 附录 VIB, 31.
- 王宝琴. 中成药质量标准与标准物质研究. 北京: 中国医药科技出版社, 1994, 221 ~ 223.