

中药研究

苦杏仁对照提取物替代苦杏仁对照药材的可行性研究

袁少雄 李向日

(北京中医药大学中药学院,北京,100102)

摘要 目的:以对照药材技术要求为基础,以等量同质为原则,利用现代的提取制备技术,制备成质量稳定、均匀性好的苦杏仁对照提取物。通过考察不同的薄层系统,建立薄层鉴别用对照提取物的质量标准,供中药标准中薄层鉴别使用。并对其主要药效成分进行方法学考察,确保今后制备的对照提取物的一致性。方法:采用不同薄层色谱系统对苦杏仁对照提取物可替代对照药材进行定性研究;并用高效液相色谱法测定苦杏仁对照提取物中苦杏仁苷的含量。结果:在苦杏仁对照提取物薄层色谱中,展开剂:为甲苯-甲酸乙酯-甲醇-甲酸-水(6:2:0.4:0.1:0.1),在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的斑点。HPLC 测定苦杏仁对照提取物中苦杏仁苷含量,苦杏仁苷线性范围 461.7~15.39 mg/L($r=0.9995$),平均回收率为 101.1% ($RSD=2.15\%$),该方法准确、可靠、专属性强,重复性好。结论:苦杏仁对照提取可替代对照药材进行定性鉴别。

关键词 对照提取物;等量同质;定性;定量

Feasibility Study on Replacement Drug of Semen Armeniacae Amarum Reference

Yuan Shaoxiong, Li Xiangri

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: On the basis of the control reference drug technical requirements and the principle of equivalent homogeneity, using modern extraction and preparation technology to prepare a stable quality and good uniformity of Semen Armeniacae Amarum reference substance. By investigating the thin layer of different system, to establish the quality standards of thin layer identification with reference extract, for the use of thin layer identification in traditional Chinese medicine (TCM) standard. To investigate methodology and its main efficacy components to ensure the consistency. **Methods:** Different thin layer chromatographic system for Semen Armeniacae Amarum reference substance qualitative alternative was used to the reference drug research. An HPLC method for content determination of amygdalin in Semen Armeniacae Amarum reference substance was established. **Results:** In Semen Armeniacae Amarum reference substance in thin layer chromatography, the mobile phase was consisted of toluene-ethyl formate-methanol-formic acid and water (6:2:0.4:0.1-0.1), and chromatographic corresponding to the position, the same color spots. To establish an HPLC method for content determination of amygdalin in Semen Armeniacae Amarum reference substance, the linear range of amygdalin was from 461.7 to 15.39 mg/L ($r=0.9995$), and the average recovery was 101.1% ($RSD=2.15\%$). The method was accurate, reliable, strong specialization and good repeatability. **Conclusion:** Semen Armeniacae Amarum reference substance can replace Semen Armeniacae Amarum reference drug for qualitative identification.

Key Words Reference substance; Equivalent homogenous; Qualitative; Quantitative

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.024

苦杏仁系杏或山杏等果实的种子,苦杏仁为多基源品种,本品为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim.、西伯利亚杏 *Prunus sibirica* L.、东北杏 *Prunus mandshurica* (Maxim.) Koehne 或杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子^[1-3]。主要有

古、河北、山东、陕西、山西、甘肃、新疆等地^[4]。苦杏仁不仅具有润肺、止咳、平喘等功效,用于咳嗽气喘,胸满痰多,血虚津枯,干燥便秘^[5],而且具有防癌、抗癌的作用^[6]。

2010 年版《中华人民共和国药典》收载了 16 种药材、挥发油或组分对照提取物。根据它们的实际

基金项目:保健食品中违禁物质检测技术研究(编号:2012BAK08B02)

作者简介:袁少雄(1986.12—),女,北京中医药大学在读硕士研究生,研究方向:中药质量控制及中药炮制研究,E-mail:18010107996@163.com,地址:北京朝阳区望京中环南路 6 号北京中医药大学

通信作者:李向日,女,北京中医药大学教授,博士生导师,研究方向:中药炮制与质量控制,E-mail:lixiangri@sina.com

应用情况,分为3类:1)药材或挥发油对照提取物;2)组分对照提取物;3)标示了多个待测成分含量的对照提取物^[7]。苦杏仁为种子类药材,含油脂类成分较多,其对照药材易酸败,不宜储存。本实验以等量同质为原则,研究制成苦杏仁对照提取物来代替苦杏仁对照药材作为苦杏仁标准中薄层鉴别用对照物质发放。

1 仪器和试剂

Waters 液相色谱仪(1525 泵,2489 检测器,Waters 公司);PL2002 电子天平(梅特勒-托科多仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SB 25-12 DTDN 型超声清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);SHB. 95 型循环水真空泵(郑州杜甫仪器厂);XMTD-6000 电热恒温水浴锅(长风);DHG-9070A 电热鼓风干燥箱(常州诺基仪器有限公司)。苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110820-201305)。苦杏仁对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 121554-201103)。所用药材购自同仁堂等药店,经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为蔷薇科植物东北杏(*Prunus Mandshurica* (Maxim.) Koehne)的干燥成熟种子。甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺的考察 不同的提取溶剂、料液比、提取时间对苦杏仁对照提取物薄层色谱有不同的影响^[8],本实验在单因素实验的基础上,把薄层色谱直观的清晰度和有效的信息量作为提取工艺的考察指标,同时,遵循对照提取物与对照药材等量原则,尽可能地与对照药材相应位置上斑点一致。通过对不同的因素比较,优选出苦杏仁对照提取物的最佳提取工艺。

2.1.1 提取溶剂的考察 因素水平:参考有关苦杏仁的提取工艺研究,选取 60% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇为单因素考察水平,进行实验,选择的提取溶剂要尽量能充分提取该药材的大部分化学成分。实验方法:取生苦杏仁合格药材,粉碎,称取粗粉 10 g。加入 10 倍量的溶剂加热回流 1 h,过滤,残渣再用 8 倍量的溶剂加热回流 1 h,过滤,合并两次滤液。

表 1 提取工艺实验设计表

乙醇浓度(%)	提取时间(h)	提取次数	溶媒倍数
60	1	2	10 和 8
80	1	2	10 和 8
95	1	2	10 和 8

结论:当乙醇浓度为 95% 时,苦杏仁对照提取物的薄层色谱分离度较好,斑点清晰可见,与对照药材相应位置上,显相同颜色的斑点,不同极性的成分大部分被提取出来。因此选择 95% 乙醇为提取溶剂(图 1)。

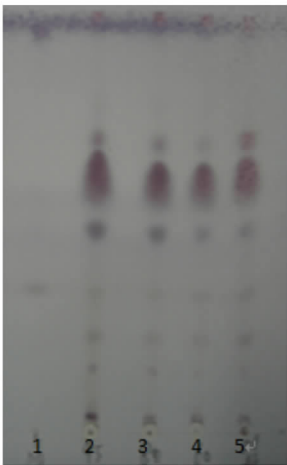


图 1 不同浓度溶剂苦杏仁对照提取物色谱图

1 苦杏仁苷对照品 2 95% 乙醇对照提取物 3 80% 乙醇对照提取物 4 60% 乙醇对照提取物 5 苦杏仁对照药材

表 2 提取工艺实验设计表

乙醇浓度(%)	提取时间(h)	提取次数	溶媒倍数
95	1	2	10 和 8
95	1	2	10 和 6
95	1	2	8 和 6



图 2 不同料液比苦杏仁对照提取物色谱图

1 苦杏仁苷对照品 2 8:6 对照提取物 3 10:8 对照提取物 4 10:6 对照提取物 5 苦杏仁对照药材

2.1.2 料液比的考察 因素水平:选取 95% 乙醇为提取溶剂,料液比分别为:1:10 和 1:8、1:10 和 1:6、1:8 和 1:6。选择的提取溶剂的比例要尽量能充分提取该药材的大部分化学成分,且与对照药材的相应位置上显相同颜色的斑点。实验方法:取生苦杏

仁合格药材,粉碎,称取粗粉 10 g。加入一定量的 95% 乙醇加热回流 1 h,过滤,残渣再用一定量的 95% 乙醇加热回流 1 h,过滤,合并两次滤液。

结论:当料液比为 1:10 和 1:8 时,苦杏仁对照提取的薄层色谱分离度较好,斑点清晰,苦杏仁对照提取物与其对照药材相应位置上的斑点数目未改变。故选取料液比为 1:10 和 1:8(图 2)。

2.1.3 提取时间的考察 选用 95% 的乙醇为提取溶剂,料液比为 1:10 和 1:8,提取时间分别为 0.5 h、1 h、1.5 h,其他操作同“2.1.1”和“2.1.2”项下提取法处理。在对照提取物与对照药材斑点一致的情况下,节省提取时间,缩短工时,提高生产效率。

表 3 提取工艺实验设计表

乙醇浓度(%)	提取时间(h)	提取次数	溶媒倍数
95	0.5	2	10 和 8
95	1	2	10 和 8
95	1.5	2	10 和 8

结论:当提取时间为 1 h 时,苦杏仁对照提取的薄层色谱效果明显,随着时间增长,薄层效果没有明显变化,故最佳的提取是时间为 1 h(图 3)。

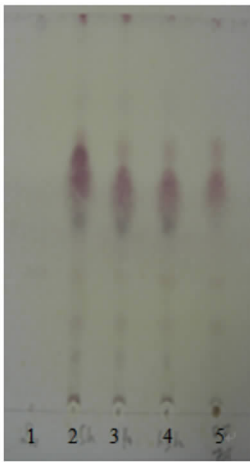


图 3 不同提取时间苦杏仁对照提取物色谱图

1 苦杏仁苷对照品 2 0.5 h 对照提取物 3 1 h 对照提取物 4 1.5 h 对照提取物 5 苦杏仁对照药材

综上,考察结果表明最佳的提取工艺条件为:乙醇浓度为 95%,提取时间为 1 h,提取 2 次,料液比分别为 1:10 和 1:8。通过此工艺条件提取出苦杏仁药材的大部分化学成分,对照提取物得到的薄层色谱分离度较好,斑点容量大且清晰度高,与等量的苦杏仁对照药材相应位置上,显相同颜色斑点。因此采用以上方法提取苦杏仁对照提取物。

2.2 对照提取物的制备 取生苦杏仁合格药材,粉碎,取粗粉 100 g。10 倍量的 95% 乙醇加热回流 1 h,过滤,残渣再用 8 倍量 95% 乙醇加热回流 1 h,过

滤,合并两次滤液。滤液于 50 ℃ 减压回收乙醇至适度的浓缩液,冷却至室温,得到 45.68 g 浸膏,加入 8 倍量糊精,制成软材,挤压制粒,湿颗粒于 60 ℃ 常压干燥 5 h。在干燥器中冷却 30 min 整粒。制成苦杏仁对照提取物颗粒。

2.3 对照提取物与对照药材薄层比较

2.3.1 对照提取物与对照药材薄层比较方法一

2.3.1.1 供试溶液的制备 取本品粉末 2 g,置索氏提取器中,加二氯甲烷适量,加热回流 2 h,弃去二氯甲烷液,药渣挥干,加甲醇 30 mL,加热回流 30 min,放冷,滤过,滤液作为供试品溶液。另取苦杏仁对照药材 0.1 g,同法制成苦杏仁对照药材溶液。另取苦杏仁苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.3.1.2 薄层色谱 取苦杏仁对照提取物、苦杏仁对照药材、苦杏仁苷对照品溶液各 7 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)5~10 ℃ 放置 12 h 的下层溶液为展开剂,展开,取出,立即用 0.8% 磷钼酸的 15% 硫酸乙醇溶液浸板,在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰(图 4)。

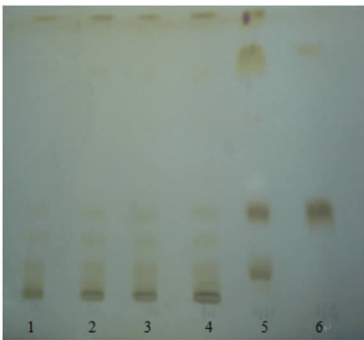


图 4 苦杏仁对照提取物的薄层色谱图

1 苦杏仁对照提取物 2 苦杏仁对照提取物 3 苦杏仁对照提取物 4 苦杏仁对照提取物 5 苦杏仁对照药材 6 苦杏仁苷对照品

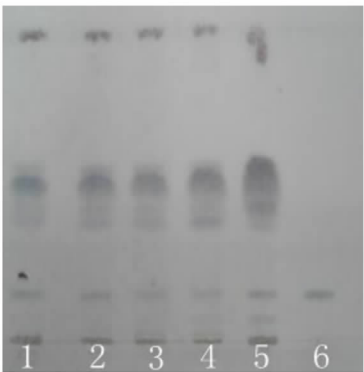


图 5 苦杏仁对照提取物的薄层色谱图

1 苦杏仁对照提取物 2 苦杏仁对照提取物 3 苦杏仁对照提取物 4 苦杏仁对照提取物 5 苦杏仁对照药材 6 苦杏仁苷对照品

2.3.2 对照提取物与对照药材薄层比较方法二

2.3.2.1 供试溶液的制备 取苦杏仁对照提取物0.3 g,加乙醇20 mL,加热回流提取2 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取苦杏仁对照药材0.1 g,同法制成苦杏仁对照药材溶液。精密称取苦杏仁苷对照品2 mg,加甲醇1 mL溶解,制成苦杏仁苷对照品溶液。

2.3.2.2 薄层色谱 取苦杏仁对照提取物、苦杏仁对照药材药材、苦杏仁苷对照品溶液各6 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-甲酸乙酯-甲醇-甲酸-水(6:2:0.4:0.1:0.1)为展开剂,展开,取出晾干,喷以1%香草醛乙醇溶液-3%高氯酸水溶液(1:1)。在105℃下烘10 min。结果显示:供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点(图5)。

通过以上薄层图显示,方法二中对照提取物显示的成分信息容量大,斑点清晰,分离度较好,与对照药材相对应的位置上显示相同颜色的斑点。因此采取薄层方二作为苦杏仁对照提取物替代苦杏仁对照药材的薄层鉴别方法。

2.4 对照提取物中苦杏仁苷的含量测定 为了确保今后制备的对照提取物的一致性,应对对照提取物中的主要成分进行含量测定。按照含量测定的要求建立对照提取物含量测定方法,并进行相应的方法学考察。

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Waters C₁₈色谱柱(Extend 4.6 mm×250 mm,4.5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸(1:9);流速:1 mL/min;波长207 nm;柱温:40℃;进样量:15 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含40 μg的溶液,即得。

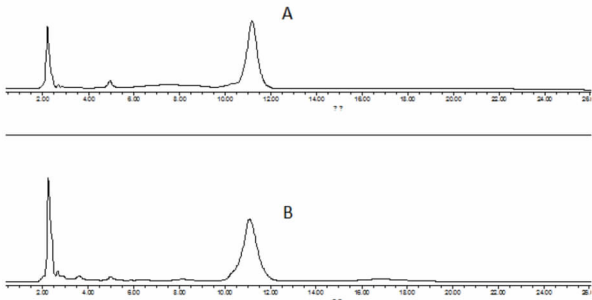


图6 苦杏仁对照提取物中苦杏仁苷的HPLC图谱

A 苦杏仁苷色谱峰;B 苦杏仁对照提取物色谱峰

2.4.3 供试品溶液的制备 取苦杏仁对照提取物约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率250 W,频率40

KHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,精密量取续滤液5 mL,置10 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液,既得供试品溶液。

2.4.4 线性关系考察 将上述苦杏仁苷对照品溶液稀释成不同系列浓度的对照溶液,在上述色谱条件下分别进样测定,以苦杏仁苷浓度(mg/L)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,回归方程为: $Y=0.0002X+6.6695$, $r=0.9995$ ($n=6$),表明苦杏仁苷461.7~15.39 mg/L范围内线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 精密称取苦杏仁苷对照品92.34 mg/L,连续进样6次。保留时间t的RSD=1.02<2,峰面积S的RSD=1.73<2。

2.4.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,依次在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h进样15 L,按上述色谱条件测定峰面积,得RSD为2.66%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.7 回收率试验 精密称取已知含量的苦杏仁对照提取物0.5 g 6份,精密加入苦杏仁苷对照液适量,按“2.4.3”项下制备供试液,依法测定,计算平均回收率为98.3%,RSD=3.2%。结果见表4。

表4 回收率的测定结果(n=6)

测定次数	苦杏仁苷含量/mg	苦杏仁苷加入量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	48.72	1.2	100.55	98.32	3.16
2	48.72	1.12	95.28		
3	48.72	1.06	103.44		
4	48.72	1.01	97.46		
5	48.72	1.05	97.26		
6	48.72	1.00	95.89		

2.4.8 重复性 按照“2.4.3”项下供试品制备方法,用同1批次药材制备6份供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进行分析,计算苦杏仁苷的峰面积的RSD=4.42%。

2.5 对照提取物稳定性考察 采用提取物作为标准参考物质,要求其具有满意的稳定性,能够在较长的时间内使用^[9]。采用薄层鉴定的方法考察其稳定性,每个月进行标定。

2.5.1 高温、高湿考察实验 将本实验制取的苦杏仁对照提取物进行高温、高湿实验,按照“2.3.1”项下制备苦杏仁对照提取物供试品溶液,进行薄层鉴别实验。结果苦杏仁对照提取物的薄层色谱斑点模糊,且分离度降低,故苦杏仁对照提取物适宜在低温或者室温下干燥密封保存。

2.5.2 加速稳定性实验 将苦杏仁对照提取物进行长期实验考察,长期实验已完成 6 个月的实验,将对照提取物按“2.3.1”项下制备苦杏仁对照提取物供试品溶液,进行薄层色谱实验。结果苦杏仁对照提取物薄层色谱基本无明显变化,斑点清晰可见,与对照药材相应位置上,显相同颜色斑点。

3 讨论

中药具有成分多样性、复杂性等特点,所以需要建立多成分及多指标的质控评价标准。对于提高临床疗效近 30 年来随着对照药材品种不断扩大及用量日益增多,目前对照药材在研制和标准使用中存在以下问题如:1)中药材所含的化学成分多样,导致一些对照药材制备困难,批次间一致性难以保证;2)部分药材的稳定性差;3)一些含糖较多的果实类、根茎类药材黏度大,难以粉碎;4)一些种子类药材,含油脂类成分较多,易酸败等问题。根据上述问题,有针对性地选择代表性的品种,以对照药材研制技术要求为基础,以等量同质为原则,利用现代的提取制备技术,制备质量稳定性好、均匀性好,且易于生产、流通、贮存和使用的对照药材提取物,作为中药标准中薄层鉴别用对照物质发放,不仅有利于对照药材的质量保证和提高,同时也必将大大方便其在标准中的使用,确保药品标准的有效执行。同时,针对化学对照品制备、分离难度大,单体不稳定,随之带来生产成本、技术要求的提高等问题。对照提取物与对照品相比,对照提取物稳定性好,而且能保证良好的均匀度,同时制备分离简单,节约了经济成本,降低了生产难度^[7]。因此,对照提取物在中药产业市场中,有良好的发展前景,应大力推广对照提取物的市场地位。本实验以苦杏仁对照提取物为例,从提取工艺、制备工艺、薄层鉴定和含量分析等方面探讨了苦杏仁对照提取物的研制。为苦杏仁药材的质量控制提供了新形式的对照物质,充分弥补了苦杏仁对照药材不易保存、稳定性和均匀性差的问题,同时,也为其他中药材对照提取物替代对照药材提供了可借鉴的思路和方法^[9]。对药品实施科学、合理、先进、实用的质量监控^[10],降低对照品制备成本和检验成本,又可以体现多指标质量控制的目的^[11]。

在以多成分质量控制为趋势的大环境下,对照提取物测定法有更大的发展空间^[12]。然而,对照提取物也存在其自身的缺点与不足,希望在以后中医药事业发展的道路上,不断完善对照提取物质量控制的标准^[13-15]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京:化学工业出版社,2010:187.
- [2] 赵文彬,刘金荣,但建明,等. 谢建新用均匀设计法优选苦杏仁油的超声提取工艺[J]. 中国中药杂志,2002,27(4):303-04.
- [3] 张守平,刘瑛丽,曹洪锦. 苦杏仁 3 种提取工艺中苦杏仁苷提取率的比较[J]. 齐鲁药事,2010,29(11):656-657.
- [4] 李科友,使清华,朱海兰,等. 苦杏仁化学成分研究[J]. 西北林学院学报,2004,19(2):124-126.
- [5] 黄兆胜,李祖伦,常章富,等. 中药学[M]. 人民卫生出版社,2003:355.
- [6] 丁东宁,谭延华,刘俊儒,等. 镇原苦杏仁化学成分的研究[J]. 西北药学杂志,1990,5(3):21-23.
- [7] 袁贤达,高慧敏,王智民,等. 基于木通皂苷探讨中药质量评价用对照提取物研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(16):2413-2416.
- [8] 杨宏静. 黄芩乙醇回流提取工艺研究[J]. 实用中医药杂志,2013,29(6):492-493.
- [9] 刘绍勇,张文明,潘建超,等. 对照提取物用于金银花药材的质量控制方法研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(13):2147-2150.
- [10] 鲁静,付凌燕,戴忠,等. 定量用三七总皂苷对照提取物的协作定值[J]. 中国药品标准,2012,13(3):199-202.
- [11] 周超,何轶,鲁静,等. 黄芪异黄酮对照提取物的制备及其在黄芪药材含量测定中的应用[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):523-527.
- [12] 薛翠娟,章军,荆文光,等. 对照提取物法测定葛根饮片中 5 种成分含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(16):2388-2391.
- [13] 谢元超,张启明,金少鸿. 替代对照品法用于石杉碱甲片含量测定的研究[J]. 中国药学杂志,2008,43(3):217.
- [14] 陈勇,陆静娴,周建良,等. 薏苡仁对照药材和薏苡仁油对照提取物稳定性考察[J]. 中国药品标准,2012,13(1):39-40.
- [15] 陆兔林,翟为民,蔡宝昌,等. 对照提取物在中药质量控制中的应用[J]. 中国中药杂志,2013,38(3):462-465.

(2014-05-25 收稿 责任编辑:徐颖)