

芪七连胶囊的质量标准研究^Δ

陈 壮^{1*}, 岳桂华^{2#}, 黄 敏¹, 黄小鸥¹(1.广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530011; 2.广西中医学院, 南宁 530001)

中图分类号 R283.65;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2551-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.20

摘要 目的:建立芪七连胶囊的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对芪七连胶囊中黄芪和三七进行定性鉴别;采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定制剂中黄芪甲苷的含量。结果:TLC定性鉴别方法专属性强,阴性对照无干扰。黄芪甲苷进样量在0.529 5~4.236 0 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999 7$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为99.34%,RSD=1.10%($n=6$)。结论:所建标准可用于芪七连胶囊的质量控制。

关键词 芪七连胶囊;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱-蒸发光散射检测器法;黄芪甲苷;黄芪;三七

Study on Quality Standard of Qiqilian Capsule

CHEN Zhuang¹, YUE Gui-hua², HUANG Min¹, HUANG Xiao-ou¹(1.The Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530011, China; 2.Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Qiqilian capsule. METHODS: TLC was used to identify Astragalus Radix and *Panax notoginseng*. A HPLC-ELSD was used to measure the content of astragaloside IV in Qiqilian capsule. RESULTS: The qualitative identifications with TLC were specific without interference from negative control. The linear range of astragaloside IV were 0.529 5-4.236 0 μg ($r=0.999 7$) with average recovery of 99.34% (RSD=1.10%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: Established standard can be adopted for the quality control of Qiqilian capsule.

KEY WORDS Qiqilian capsule; Quality standard; TLC; HPLC-ELSD; Astragaloside IV; Astragalus Radix; *Panax notoginseng*

表4 不同配伍比例的样品含量测定结果

Tab 4 Results of content determination of samples with different compatibility proportions

称样量, g		生物碱含量, mg	
黄柏	苍术	黄柏碱	小檗碱
5	0	0.116	0.418 0
5	1.66	0.108	0.373 8
5	2.5	0.105	0.344 8
5	5	0.085	0.245 7
5	10	0.092	0.233 0
5	15	0.091	0.223 2
0	5	0	0

优于苍术组,故选择以黄柏为主要参考对象(药对中黄柏均为5 g),考察黄柏-苍术药对中生物碱含量的变化规律。

黄柏碱为黄柏的特征成分,尚未发现易混淆药材也含有该成分,因此在检测小檗碱的同时增加黄柏碱的检测,更能有效、专属地评价黄柏及其复方制剂的质量^[4]。小檗碱在220、265、345 nm波长处均有较大吸收,但此波长下黄柏碱没有吸

Δ 基金项目:广西壮族自治区中医药管理局中医药科技专项资助课题(No.GZY1109);广西科学研究与技术开发计划项目(No.桂科攻0993003A-15)

* 副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:0771-2188262。E-mail:chzh511@163.com

通信作者:教授,主任医师,博士。研究方向:中医内科学。E-mail:sdygh1969@163.com

收,而在285 nm波长处两者均有较大吸收,故选取285 nm为最终检测波长。

有资料显示,黄柏、苍术的配伍比例多集中在1:1~1:3(m/m)之间^[5]。结合临床应用及文献资料,本课题组最终选择黄柏-苍术药对以下述比例:3:1、2:1、1:1、1:0、0:1、1:2、1:3(m/m)为研究对象。

本试验选择以黄柏的质量为固定值,考察不同质量的苍术对黄柏有效成分(黄柏碱和小檗碱)煎出量的影响,发现随着苍术质量的增加,黄柏中有效成分的煎出量逐渐减少。这可能与苍术中的有效成分影响了生物碱的溶出有关,具体机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:150-151,286-287.
- [2] 王绪前.二妙散使用沿革[J].湖北中医学院学报,1999,1(1):25.
- [3] 王鸣,肖超成,陈雨,等.不同产地茅苍术水溶性成分的HPLC指纹图谱研究[J].植物资源与环境学报,2009,18(1):12.
- [4] 祝晨,林朝展,莫建霞.HPLC法测定黄柏药材中小檗碱与黄柏碱的含量[J].中国新药与临床药理,2004,15(4):262.
- [5] 聂桂宁.二妙散加味临床治验举隅[J].广西中医学院学报,2007,10(2):14.

(收稿日期:2012-11-12 修回日期:2013-05-02)

芪七连胶囊是一个广西科技攻关项目的新产品,已获得广西科技厅和广西卫生厅的双重立项,也是广西中医学院附属瑞康医院一种新的医院制剂,由黄芪、三七、黄连等7味药材组成。经过广西中医学院附属瑞康医院多年来的临床验证和300多例临床观察结果表明,芪七连胶囊具有降低血压、保护血管内皮、降低内皮素(ET)、升高一氧化氮(NO)、减轻高血压患者的氧化应激、清除自由基等多重作用,主治高血压病引起的眩晕、烦躁、头痛如刺、胸闷心悸、手足麻木、乏力等症状。为了有效控制芪七连胶囊的质量,笔者采用薄层色谱(TLC)法对该制剂中的黄芪、三七进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)-蒸发光散射检测器(ELSD)法对君药黄芪中的黄芪甲苷进行了含量测定。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010AHT型HPLC仪(日本岛津公司);Model 400型ELSD(美国SofTA公司);SB3200T型超声仪[必能信超声(上海)有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz]。

1.2 药品与试剂

芪七连胶囊(广西中医学院附属瑞康医院自制中试产品,批号:20091021、20100106、20100112、20100118);黄芪甲苷(批号:110781-200613)、人参皂苷Rb₁(批号:110704-200217)、人参皂苷Rg₁(批号:110703-200424)、三七皂苷R₁(批号:110745-200312)对照品均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G(青岛海洋化工有限公司);乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 性状

本品为胶囊剂,内容物为棕褐色颗粒,气香,味微苦。

2.2 定性鉴别

2.2.1 黄芪的TLC鉴别^[1] 取本品内容物5 g,加甲醇30 ml,超声处理20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水10 ml使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取2次(20 ml、10 ml),合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次30 ml,氨试液弃去,正丁醇液用正丁醇饱和的水洗涤2次,每次30 ml,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液;按处方工艺制备缺黄芪的阴性样品,同法制备阴性对照溶液;取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照TLC法^[1]试验,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)10 ℃以下放置12 h的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105 ℃加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的棕褐色斑点;阴性对照无干扰。黄芪的TLC图见图1。

2.2.2 三七的TLC鉴别^[1] 取“2.2.1”项下供试品溶液作为本试验所用供试品溶液;按处方工艺制备缺三七的阴性样品,同法制备阴性对照溶液;取人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rg₁与三七皂苷R₁对照品,加甲醇制成每1 ml各含0.5 mg的溶液,作为3种对照品溶液。照TLC法^[1]试验,吸取上述5种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)10 ℃以下放置12 h的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105 ℃加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置

上,显相同的棕褐色斑点;阴性对照无干扰。三七的TLC图见图2。

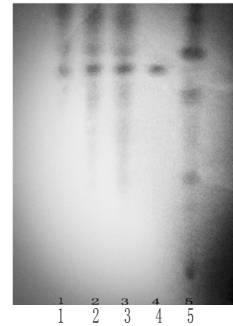


图1 黄芪的TLC图

1.样品(批号:20100106);2.样品(批号:20100112);3.样品(批号:20100118);4.黄芪甲苷对照品;5.缺黄芪的阴性对照

Fig 1 TLC of Astragalus Radix

1. sample (lot No. 20100106); 2. sample (lot No. 20100112); 3. sample (lot No. 20100118); 4. astragaloside IV control; 5. Astragalus Radix negative control

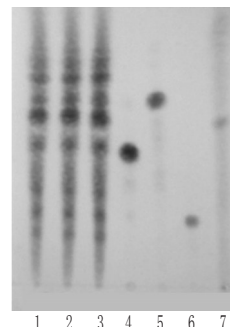


图2 三七的TLC图

1.样品(批号:20100106);2.样品(批号:20100112);3.样品(批号:20100118);4.人参皂苷Rb₁对照品;5.人参皂苷Rg₁对照品;6.三七皂苷R₁对照品;7.缺三七的阴性对照

Fig 2 TLC of Panax notoginseng

1. sample (lot No. 20100106); 2. sample (lot No. 20100112); 3. sample (lot No. 20100118); 4. ginsenoside Rb₁ control; 5. ginsenoside Rg₁ control; 6. notoginsenoside R₁ control; 7. *P. notoginseng* negative control

2.3 含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒质量的黄芪甲苷对照品13.24 mg,置25 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,从中取2 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.105 9 mg/ml的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取芪七连胶囊研细的内容物2 g,精密称定,加甲醇50 ml,超声处理3次,每次30 min,合并提取液,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml使溶解,用水饱和的正丁醇提取5次,每次20 ml,合并提取液,用氨试液洗涤2次,每次20 ml,氨试液弃去,再用正丁醇饱和的水25 ml洗涤,洗涤液弃去,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至50 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.3.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例及生产工艺制备缺黄芪的阴性样品,照“2.3.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3.4 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Agilent SB-C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(32:68, V/V);流

速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。ELSD的漂移管温度:40 ℃;雾化气:空气;雾化气压力:275 kPa(40 psi)。在上述色谱条件下,分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液各10 μl,注入液相色谱仪中测定。结果表明,供试品中黄芪甲苷峰与其他成分色谱峰有较好的分离度;阴性对照无干扰。理论板数按黄芪甲苷色谱峰计算应不低于4 000。色谱见图3。

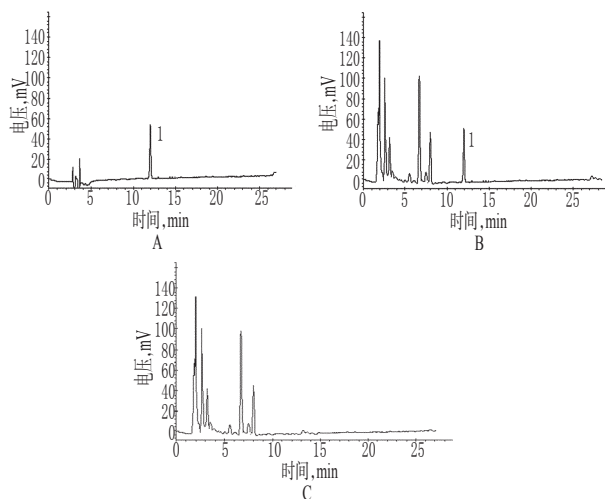


图3 高效液相色谱图

A.黄芪甲苷对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.黄芪甲苷

Fig 3 HPLC chromatograms

A. astragaloside IV control; B. test sample; C. negative control; 1. astragaloside IV

2.3.5 标准曲线的制备 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液5、10、20、30、40 μl,注入液相色谱仪中,按上述色谱条件记录色谱图,测定峰面积。以峰面积的自然对数值(y)为纵坐标,进样量的自然对数值(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=1.4113x+10.1674(r=0.9997, n=5)$ 。结果表明,黄芪甲苷的进样量在0.529 5~4.236 0 μg 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.3.6 精密度的试验 取同一对照品溶液适量,连续进样6次,按上述色谱条件记录色谱图,测定峰面积。结果, RSD=1.44% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.3.7 重复性试验 取同一批(批号:20091021)样品内容物适量,共6份,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件记录色谱图,测定峰面积,计算黄芪甲苷的含量。结果,样品中黄芪甲苷的平均含量为1.105 8 mg/g, RSD=1.73% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.8 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:20091021)适量,按上述色谱条件分别于制备后0、2、4、8、12、24 h依次进样,记录色谱图,测定峰面积。结果, RSD=1.58% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3.9 加样回收率试验 取已知含量的同一批(批号:20091021)样品内容物1.00 g,精密称定,平行6份,分别精密加入黄芪甲苷对照品溶液(0.529 6 mg/ml)2 ml,按“2.3.2”项下方

法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	1.125 6	1.059 2	2.187 0	100.21		
2	1.084 5	1.059 2	2.135 6	99.23		
3	1.020 3	1.059 2	2.067 8	98.89	99.34	1.10
4	1.134 9	1.059 2	2.184 9	99.13		
5	1.116 6	1.059 2	2.185 2	100.88		
6	1.003 5	1.059 2	2.038 6	97.72		

2.3.10 样品含量测定 取3批样品内容物各适量,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件分别进样10 μl,测定黄芪甲苷峰面积,计算样品中黄芪甲苷的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

样品批号	黄芪甲苷含量,mg/g	RSD,%
20100106	1.066 2	1.24
20100112	1.041 1	1.37
20100118	1.055 6	1.19

3 讨论

在黄芪甲苷的含量测定试验中,采用乙腈-水(32:68, V/V)系统为流动相,可使被测定成分与干扰物质较好地分离开来。因为黄芪是以提取物的形式存在于样品制剂中,黄芪甲苷又溶于甲醇,所以采用甲醇为溶剂超声提取样品;由于提取后直接测定时干扰物质多,故以氨试液溶解甲醇提取浓缩的残渣后,再采用正丁醇萃取黄芪,从而除去干扰杂质^[2]。

若用紫外检测器测定黄芪甲苷的含量,吸收较差,受溶剂干扰大,不易进行分析,故改用ELSD测定^[3-4]。近年来,ELSD在色谱方面的应用已越来越多,特别是对无紫外吸收或无紫外末端吸收的物质具有较高的检测灵敏度。鉴于《中国药典》已对黄芪中黄芪甲苷进行了质量分数规定,不得少于0.040%^[1],考虑到处方组成及干膏率等因素,拟定本品中黄芪甲苷的质量分数不得少于0.050%,与《中国药典》保持一致。

综上,所建标准可用于芪七连胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:283、11、附录34.
- [2] 陈祖云,石凌云,黄勇,等. HPLC-ELSD法测定脑通颗粒中黄芪甲苷和人参皂苷 Rb₁的含量及稳定性[J]. 中国药房, 2011, 22(23):2 164.
- [3] 童欢,金德珍,张隔芝,等. 圣达欣胶囊质量标准的考察[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(9):1 254.
- [4] 姚风云,王炳志,杨伟鹏,等. HPLC-ELSD法测定降脂减肥胶囊中黄芪甲苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(9):11.

(收稿日期:2012-08-27 修回日期:2012-12-24)