

双参胶囊的质量标准提高研究

崔小敏*,李芳,李凡,王卫锋*(陕西省中医药研究院,西安 710003)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1677-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.31

摘要 目的:优化和提高双参胶囊的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的郁金、熟地黄进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定制剂中丹酚酸B的含量;色谱柱为Diamonsil C₁₈(2),流动相为乙腈-0.1%磷酸(22:78, V/V),流速为0.5 ml/min,检测波长为286 nm,柱温为30 ℃,进样量为2 μl。结果:郁金、熟地黄的TLC图斑点清晰,分离度好;丹酚酸B检测进样量线性范围为0.079 2~0.792 μg($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%;加样回收率为100.71%~101.82%(RSD=0.50%, $n=6$)。结论:经优化和提高的标准可用于双参胶囊的质量控制。

关键词 双参胶囊;丹酚酸B;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Improvement of Quality Standard of Shuangshen Capsule

CUI Xiaomin, LI Fang, LI Fan, WANG Weifeng (Shaanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard of Shuangshen capsule. METHODS: TLC was conducted for the qualitative identification of *Curcumnae radix* and *Rehmannia glutinosa* in the preparation. HPLC was used for the content determination of salvianolic acid B in the preparation: the column was Diamonsil C₁₈(2) with mobile phase of acetonitrile-0.1% H₃PO₄(22:78, V/V) at a flow rate of 0.5 ml/min, detection wavelength was 286 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 2 μl. RESULTS: The TLC spots of *C. radix* and *R. glutinosa* were clear and well separated; the linear range of salvianolic acid B was 0.079 2-0.792 μg($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recovery was 100.71%-101.82%(RSD=0.50%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Shuangshen capsule.

KEYWORDS Shuangshen capsule; Salvianolic acid B; TLC; HPLC

双参胶囊为陕西省中医医院制剂,具有活血化瘀、化痰开窍之功,用于各种脑卒中后遗症和心血管病的治疗。该制剂由丹参、人参、远志、郁金、熟地黄、川芎等药材组成,其原质量标准中仅有针对人参、丹参和川芎的薄层色谱(TLC)鉴别等检验项目,无含量测定项。为了更好地控制该制剂的质量,在原质量标准的基础上,参照有关文献^[1-3],本试验采用TLC法对其中的药材进行定性分析,增加了郁金和熟地黄的鉴别项,并采用高效液相色谱(HPLC)法^[4-11]对其中丹参的主要药效成分丹酚酸B进行了定量分析。

1 材料

1.1 仪器

H-CLASS型HPLC仪,包括紫外可见检测器、Empower化学工作站(美国Waters公司);UV-8型三用紫外仪(无锡科达仪器厂);KQ-100型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);BT125D型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

双参胶囊(陕西省中医医院自制,批号:140302、140305、140311,规格:0.4 g/粒);郁金对照药材(批号:120949-200504)、熟地黄对照药材(批号:121196-200803)、丹酚酸B对照品(批号:111562-201514,纯度:93.7%)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

综上所述,本方法简便、准确、专属性好、精密度高,可完善吗多明片的质量控制。

参考文献

- [1] 陈军熏,黄春辉,陈念,等.吗多明的药理和临床应用[J].福建医药杂志,1987,9(2):31.
- [2] Rudolph W,何梅先.吗多明在劳力型心绞痛和慢性充血性心力衰竭长期治疗中的作用[J].国外医学心血管疾病分册,1985(1):29.

- [3] 国家药典委员会.新药转正标准:38册[M].北京:化学工业出版社,2000:102.
- [4] 英国药品委员会.英国药典卷II[S].2009年版.伦敦: The Stationery Office出版社,2009:1 701.
- [5] 顾纪明,胡钧,林德昌,等.吗导敏片处方工艺改进[J].中国医药工业杂志,1982(1):38.
- [6] 祁祥法.吗导敏临床研究的进展[J].上海医药,2002,12(6):552.

* 研究实习员,硕士。研究方向:中药质量控制。电话:029-87289907。E-mail: 369803637@qq.com

通信作者:主任中药师,硕士。研究方向:中药新药研发。电话:029-87251832。E-mail: 1196821692@qq.com

(收稿日期:2015-05-16 修回日期:2016-03-16)
(编辑:周 箭)

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 郁金 取样品内容物 2 g, 研细, 加无水乙醇 30 ml, 超声 (功率: 250 W, 频率: 40 kHz, 下同) 处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取郁金对照药材 1 g, 按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按双参胶囊处方和制备工艺制备缺郁金的阴性样品, 再按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按 TLC 法[2015 年版《中国药典》(一部)]^[1] 试验, 吸取上述 3 种溶液各 10 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯 (17:3, V/V) 为展开剂, 置于氨蒸气饱和的展开缸内, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 于日光下检视。结果显示, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 详见图 1。

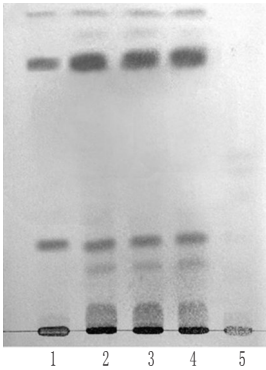


图 1 郁金的薄层色谱图

1. 对照药材; 2~4. 供试品; 5. 阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Curcumnae radix*

1. control medicinal; 2-4. test samples; 5. negative control

2.1.2 熟地黄 取样品内容物 4 g, 研细, 加 80% 甲醇 30 ml, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 80% 甲醇 8 ml 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 10 ml, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加 80% 甲醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取熟地黄对照药材 1 g, 按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按双参胶囊处方和制备工艺制备缺熟地黄的阴性样品, 再按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按 TLC 法[2015 年版《中国药典》(一部)]^[1] 试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯 (2:3, V/V) 为展开剂, 置于氨蒸气饱和的展开缸内, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2,4-二硝基苯肼试液, 于日光下检视。结果显示, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 详见图 2。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈(2) (250 mm \times 3.0 mm, 3 μ m); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸 (22:78, V/V); 流速: 0.5 ml/min; 检测波长: 286 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 2 μ l。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸 B 对照品适量, 置于 50 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并制成丹酚酸 B 质量浓度为 0.198 0 mg/ml 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取 10 粒样品内容物, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置于 25 ml 量瓶中, 加入甲醇约 20 ml, 超声处理 30 min, 放冷, 用甲醇定容, 摇匀, 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按双参胶囊处方和制备工艺制

备缺丹参的阴性样品, 并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

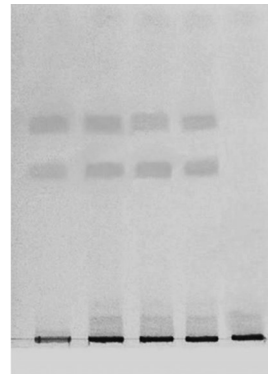


图 2 熟地黄的薄层色谱图

1. 对照药材; 2~4. 供试品; 5. 阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Rehmannia glutinosa*

1. control medicinal; 2-4. test samples; 5. negative control

2.2.5 系统适用性试验 取“2.2.2”“2.2.3”“2.2.4”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 3。结果, 理论板数以丹酚酸 B 峰计不低于 5 000, 分离度 > 1.5, 阴性对照对测定结果无干扰。

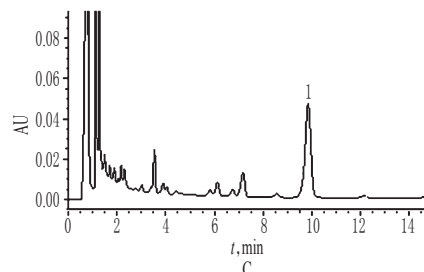
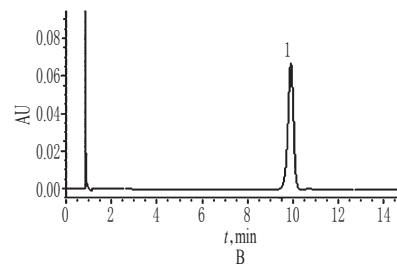
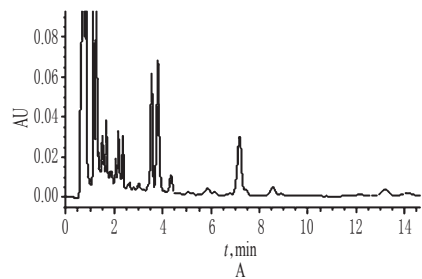


图 3 丹酚酸 B 对照品及样品色谱图

A. 阴性对照; B. 对照品; C. 供试品; 1. 丹酚酸 B

Fig 3 HPLC chromatograms of salvianolic acid B reference substance and sample

A. negative control; B. reference substance; C. test sample; 1. salvianolic acid B

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液 0.4、0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 μ l, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,

记录峰面积。以丹酚酸B进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=29\ 137\ 926x-1\ 567$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,丹酚酸B检测进样量线性范围为 $0.079\ 2\sim 0.792\ \mu\text{g}$ 。

2.2.7 精密性试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,丹酚酸B峰面积的RSD=0.14% ($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:140302)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、10 h时进样测定,记录峰面积。结果,丹酚酸B峰面积的RSD=0.23% ($n=5$),表明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.2.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:140302)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,丹酚酸B峰面积的RSD=0.18% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:140302)适量,共6份,分别加入一定质量的丹酚酸B对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)
Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.261 5	1.752 0	1.584 0	3.364 1	101.77		
0.259 2	1.736 6	1.584 0	3.340 6	101.26		
0.264 6	1.772 7	1.584 0	3.368 7	100.76	101.19	0.50
0.261 3	1.750 6	1.584 0	3.345 8	100.71		
0.262 2	1.756 7	1.584 0	3.369 5	101.82		
0.246 5	1.651 5	1.584 0	3.248 8	100.84		

2.2.11 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,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	丹酚酸B, mg/g	平均值, mg/g
140302	6.70	
140305	6.55	6.59
140311	6.51	

3 讨论

双参胶囊原标准中只收录了人参、丹参、川芎的TLC鉴别项,本试验在此基础上新增了郁金、熟地黄的TLC鉴别,方法操作简单、专属性强,为更好地控制制剂质量提供了依据。

丹参是本制剂中的主要药材之一,丹酚酸B是丹参的主要活性成分,具有抗氧化、抗自由基,改善缺血区血流量,改善脑组织能量代谢、减轻脑水肿等作用^[12-15]。故本试验采用HPLC法测定丹酚酸B的含量,以控制制剂的质量,保证临床疗效。

笔者曾对提取溶剂进行了考察,比较了甲醇与乙醇,结果表明甲醇的提取效率高于乙醇。为保证提取完全,本试验选择甲醇作为提取溶剂。另外,对提取时间进行了考察,结果表明提取时间延长至1和1.5 h并不能相应增加丹酚酸B的含量测定结果。因此,最终选择超声0.5 h作为丹酚酸B的提取时间。

2015年版《中国药典》(一部)丹参中丹酚酸B的含量测定所用流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59, V/V/V/V),笔者分别考察了药典使用的流动相和甲醇-磷酸、乙腈-磷酸流动相系统对分离结果的影响。结果发现,乙腈-0.1%磷酸(22:78, V/V)流动相条件下分离效果最好,且该流动组成简单,分离速度快,丹酚酸B在10 min内即可得到有效分离;且本方法需用样品量少,进样量仅为2 μl 。故最终选择了该流动相。

综上所述,本试验对双参胶囊的质量标准进行了提高,其中,TLC法鉴别郁金、熟地黄操作方便、专属性强,HPLC法测定丹酚酸B的含量结果准确、稳定性好,可以用于双参胶囊的质量控制。可将郁金、熟地黄的TLC鉴别以及丹酚酸B的含量测定列入修订后的双参胶囊的质量标准中。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:125, 208.
- [2] 解树彬, 姜婧, 郭洪丽. 杞菊地黄丸质量标准研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(13):110.
- [3] 陈阿丽, 杨永霞, 关琴笑, 等. 妇康乐胶囊的质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(6):1363.
- [4] 曲佳. HPLC法测定脉络通中丹酚酸B的含量[J]. 天津药学, 2014, 26(2):29.
- [5] 张昀, 刘路, 李钦. 明丹颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房, 2013, 24(27):2556.
- [6] 姚慧娟, 胡道德, 金剑, 等. 高效液相梯度洗脱法测定灵杞黄斑颗粒中毛蕊花糖苷和丹酚酸B含量[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(2):123.
- [7] 尉广飞, 李翠, 刘谦, 等. 干燥前水洗对丹参活性成分的影响[J]. 中草药, 2015, 46(16):2467.
- [8] 鲁亮, 吴赛伟, 丹华. 冠心宁注射液中酚酸类成分的质量分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9):1744.
- [9] 许红玮, 刘轲, 张怀亮. HPLC同时测定清热定眩合剂中3种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7):72.
- [10] 蒲志强, 鞠楷, 陈华, 等. 糖脂消胶囊质量标准的建立[J]. 中国药师, 2014, 23(12):2136.
- [11] 刘弘, 张玲昂, 王俊杰, 等. 心得宁口服液质量标准研究[J]. 中国药业, 2014, 23(21):37.
- [12] 柳艳, 李磊, 赵鸿雁. 丹酚酸B清除DPPH有机自由基活性及影响因素研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12):2406.
- [13] 柳艳, 李磊, 刘王莹, 等. 丹酚酸抗氧化活性及其对DNA损伤保护作用[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(4):448.
- [14] 蒋玉凤, 王秋华, 刘智勤, 等. 丹酚酸B对脑缺血小鼠脑能荷和三磷酸腺苷酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18):1903.
- [15] 张颖, 蒋玉凤, 刘智勤, 等. 丹酚酸B对小鼠脑缺血不同时间脑能量代谢及脑水肿的作用[J]. 药理学学报, 2007, 42(12):1250.

(收稿日期:2015-10-28 修回日期:2016-01-13)

(编辑:张静)