

脉康合剂的质量标准研究

申琳^{1*}, 曲佳^{2#}, 孙永跃³ (1.天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; 2.天津市药品检验所, 天津 300070; 3.天津理工大学化学化工学院, 天津 300384)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)21-3000-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.21.40

摘要 目的:建立脉康合剂的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中白芍、当归、川芎、黄芪、五味子、麦冬进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定制剂中五味子醇甲的含量:色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为甲醇-水(60:40, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为40 ℃,进样量为20 μl。结果:白芍、当归、川芎、黄芪、五味子、麦冬TLC图斑点清晰,分离度好。五味子醇甲检测质量浓度线性范围为1~50 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为97.01%~98.58%(RSD=0.56%, $n=6$)。结论:该研究所建标准可用于脉康合剂的质量控制。

关键词 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 五味子醇甲; 质量控制

Study on the Quality Standard for Maikang Mixture

SHEN Lin¹, QU Jia², SUN Yongyue³ (1.The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China; 2.Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China; 3.College of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Maikang mixture. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of *Paeonia lactiflora*, *Angelica sinensis*, *Ligusticum chuanxiong*, *Astragalus membranaceus*, *Schisandra chinensis* and *Ophiopogon japonicus*. HPLC was used for the content determination of schisandrin: the column was Kromasil C₁₈ with mobile phase of methanol-water (60:40, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: *P. lactiflora*, *A. sinensis*, *L. chuanxiong*, *A. membranaceus*, *S. chinensis* and *O. japonicus* showed clear spots and well separated. The linear range of schisandrin was 1-50 μg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 97.01%-98.58% (RSD=0.56%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Maikang mixture.

KEYWORDS TLC; HPLC; Schisandrin; Quality control

中均能很好地溶解,且DMF不干扰4种待测溶剂成分的测定,故选用DMF作为溶剂。

采用HS-GS法测定样品中残留溶剂,可以消除基质的潜在干扰,且仪器污染少,可有效保护色谱柱。预试验曾考察了不同顶空平衡温度(60、65、70、75、80 ℃)、相同顶空平衡时间30 min下各待测溶剂成分的色谱峰面积。结果显示,随着顶空平衡温度升高,各待测溶剂成分色谱峰面积增大,但从70 ℃升到80 ℃时峰面积基本不变,故选择70 ℃为顶空平衡温度。顶空平衡时间取决于待测溶剂成分分子从样品基质到气相的扩散速度。预试验进一步考察了70 ℃顶空平衡温度、不同顶空平衡时间(10、20、30、40 min)下各待测溶剂成分的色谱峰面积。结果显示,顶空平衡时间超过30 min后有机溶剂峰面积基本不变,故选择30 min为顶空平衡时间。

检测样品中的残留溶剂时采用程序升温方法,可使各待测溶剂成分色谱峰的分度度更大,同时可消除基质效应^[3-7]。经预试验,最终确定升温程序为:40 ℃为初始温度,维持5 min,再以10 ℃/min的速率升温至180 ℃,维持2 min。在此条

件下,各待测成分理论板数高,分离效果好。

综上所述,本方法操作简单,结果准确、可靠,可用于消旋酮异亮氨酸钙原料药中的残留溶剂测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 通则 105-109.
- [2] ICH指导委员会. 周海钧主译. 药品注册的国际技术要求: 质量部分[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007: 134-136.
- [3] 郑金琪, 岑予欣, 付利娜, 等. 顶空毛细管气相色谱法测定本苄醇中多种残留溶剂[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(12): 1500.
- [4] 池舒耀, 伍迪科, 孙晋红, 等. 顶空气相色谱法同时测定人工牛黄中7种残留溶剂[J]. 色谱, 2014, 32(5): 553.
- [5] 张秉华, 马雯霞, 王发. 气相色谱法测定硝酸咪康唑原料的残留溶剂[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(4): 368.
- [6] 李颖颖, 李京, 王悦, 等. 低分子肝素残留溶剂检测方法建立[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(15): 1350.
- [7] 沈艳丽, 刘建平. 毛细管顶空GC法测定阿加曲班中的残留溶剂[J]. 食品与药品, 2014, 16(4): 282.

(收稿日期:2015-07-31 修回日期:2016-06-08)

(编辑:周 箐)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 临床药学、中药学。电话: 022-23513806。E-mail: 59368539@qq.com

通信作者: 主管药师, 硕士。研究方向: 中药和中成药质量分析。电话: 022-23513806。E-mail: qj4599@sina.com

脉康合剂由五味子、当归、白芍、黄芪、川芎、党参、枸杞、麦冬、菟丝子9味中药经水煎、浓缩等步骤精制而成,功效为益气生津、滋补心阳,常用于防治高血压、高血脂等症,还可用于扩张冠状动脉。方中主要药味五味子在益气复脉、生津养血等方面疗效显著^[1]。为提高和完善脉康合剂的质量标准,笔者采用高效液相色谱法(HPLC),以五味子醇甲为定量指标,对方中五味子进行了含量测定,并采用薄层色谱法(TLC),对方中白芍、当归、川芎、黄芪、五味子、麦冬进行了定性鉴别。

1 材料

1.1 仪器

LC-16型HPLC仪,包括LC-6A泵、SPD-6AV紫外检测器、7725i进样阀、Anastar色谱工作站(日本Shimadzu公司);D-37520型高速离心机(德国Thermo Fisher公司);YKH-1型液体快速混合器(江西医疗器械厂);C9860A型超声波清洗器(天津市科贝尔光电技术有限责任公司,功率:250 W,频率:50 kHz);PB153-S型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);HGC-12A型氮吹仪(广东海利集团有限公司);GM-50型隔膜真空泵(天津市腾达过滤器厂);硅胶GF₂₅₄薄层板(烟台市化学工业研究所);硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 药品与试剂

脉康合剂(天津中医药大学第二附属医院自制,批号:20130321、20131121、20140219,规格:150 ml/瓶);芍药苷对照品(批号:110736-201236,纯度:96.0%)、五味子甲素对照品(批号:110764-201312,纯度:99.6%)、黄芪甲苷对照品(批号:110781-200613,纯度:95.0%)、五味子醇甲对照品(批号:110857-201211,纯度:99.9%)、川芎对照药材(批号:120918-201110)、当归对照药材(批号:120927-201010)、五味子对照药材(批号:120922-200606)、麦冬对照药材(批号:121013-200908)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,三氯甲烷、乙醇、乙醚、甲酸乙酯、乙酸乙酯、甲酸、正己烷、丙酮、正丁醇、石油醚(30~60℃)均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 白芍 取样品10 ml,加乙醇10 ml,混匀,以半径为10 cm、12 000 r/min离心5 min,取上清液蒸至无醇味,加乙醇1 ml使溶解,得供试品溶液。另取芍药苷对照品适量,加适量乙醇制成质量浓度为1 mg/ml的芍药苷对照品溶液。按脉康合剂处方和制备工艺制备缺白芍的阴性样品,并按上述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》(四部)]试验^[2],吸取上述3种溶液各12 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-甲酸(40:10:5:0.2, V/V/V/V)为展开剂,置于展开缸内,展开,取出,晾干,以5%香草醛硫酸溶液为显色剂,于105℃下加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰^[3-5],详见图1。

2.1.2 当归、川芎 取样品10 ml,分别用乙醚振摇提取3次,每次10 ml,将乙醚液合并后挥干,所剩残渣加乙醇1 ml使溶解,得供试品溶液。另取当归、川芎对照药材各1 g,分别加入乙醚10 ml,超声处理30 min,同供试品溶液制备方法制成单一对照药材溶液^[2]。按脉康合剂处方和制备工艺制备缺当归、川芎的阴性样品,并按上述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》(四部)]试验^[2],吸取上述4种溶液各12 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷-

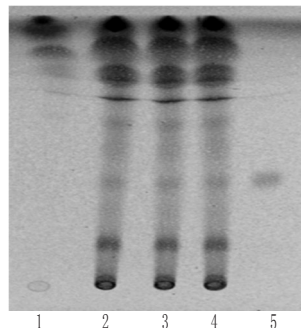


图1 白芍的薄层色谱图

1.阴性对照;2~4.供试品;5.对照品

Fig 1 TLC chromatograms of *P. lactiflora*

1. negative control; 2-4. test samples; 5. reference substance

乙酸乙酯(8:2, V/V)为展开剂,置于展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,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,且阴性对照无干扰^[6],详见图2。

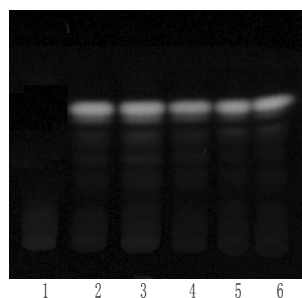


图2 当归、川芎的薄层色谱图

1.阴性对照;2.当归对照药材;3.川芎对照药材;4~6.供试品

Fig 2 TLC chromatograms of *A. sinensis* and *L. chuanxiong*

1. negative control; 2. *A. sinensis* reference substance; 3. *L. chuanxiong* reference substance; 4-6. test samples

2.1.3 黄芪 取样品10 ml,以半径为10 cm、12 000 r/min离心5 min,取上清液蒸干,将残渣加水10 ml使溶解,用20 ml水饱和正丁醇振摇提取(重复1次),将正丁醇提取液合并,以20 ml氨试液洗涤(重复1次),弃去氨试液,以10 ml水洗涤后除去水液,蒸干正丁醇,将残渣加甲醇1 ml使溶解,得供试品溶液。取黄芪甲苷对照品适量,加适量甲醇制成质量浓度为1 mg/ml的黄芪甲苷对照品溶液。按脉康合剂处方和制备工艺制备缺黄芪的阴性样品,并按上述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》(四部)]试验^[2],吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-水(15:22:40:10, V/V/V/V)下层溶液(10℃下放置)为展开剂,置于展开缸内,展开,取出,晾干,以10%硫酸乙醇溶液为显色剂,于105℃下加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰^[7],详见图3。

2.1.4 五味子 取样品10 ml,分别用三氯甲烷振摇提取3次,每次10 ml,将三氯甲烷蒸干,残渣加三氯甲烷1 ml使溶解,得供试品溶液。另取五味子甲素对照品适量,加适量三氯甲烷制成质量浓度为1 mg/ml的五味子甲素对照品溶液^[2]。再取五味子对照药材1 g,加入三氯甲烷10 ml,超声处理30 min,同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按脉康合剂处方和制备工艺制备缺五味子的阴性样品,并按上述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》(四

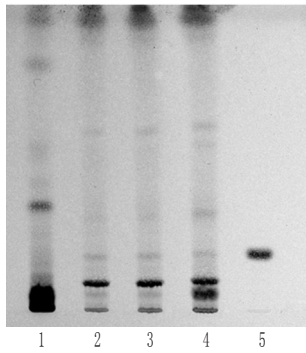


图3 黄芪的薄层色谱图

1.阴性对照;2~4.供试品;5.对照品

Fig 3 TLC chromatograms of *A. membranaceus*

1.negative control; 2-4. test samples; 5. reference substance

部)]试验^[2],吸取上述4种溶液5~10 μl,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)上层溶液为展开剂,置于展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰^[8],详见图4。

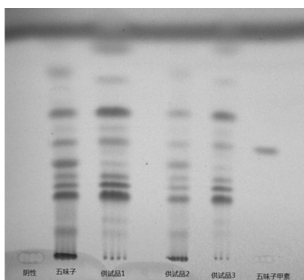


图4 五味子的薄层色谱图

1.阴性对照;2.对照药材;3~5.供试品;6.对照品

Fig 4 TLC chromatograms of *S. chinensis*

1.negative control; 2.reference substance; 3-5. test samples; 6. reference substance

2.1.5 麦冬 取样品30 ml,加30%盐酸2 ml,60℃水浴加热1 h,放冷,用三氯甲烷振荡提取2次,每次30 ml,合并三氯甲烷提取液,浓缩至1 ml,得供试品溶液。另取麦冬对照药材1 g,加水50 ml,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按脉康合剂处方和制备工艺制备缺麦冬的阴性样品,并按上述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》(四部)]试验^[2],吸取上述3种溶液各2 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-丙酮(4:1, V/V)为展开剂,置于展开缸内,展开,取出,晾干,以10%硫酸乙醇溶液为显色剂,于105℃下加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,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,且阴性对照无干扰^[9],详见图5。

2.2 五味子醇甲含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(60:40, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:40℃;进样量:20 μl。

2.2.2 对照品溶液的制备 取五味子醇甲对照品适量,精密称定,加75%甲醇制成质量浓度为25 μg/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品适量,以半径为10 cm、12 000 r/min离心5 min,精密量取上清液10 ml,用三氯甲烷振荡提取3次,每次15 ml,合并三氯甲烷提取液,使用氮吹仪吹至无氯

仿味,残渣加75%甲醇使溶解,置于2 ml量瓶中,加75%甲醇定容,摇匀,即得。

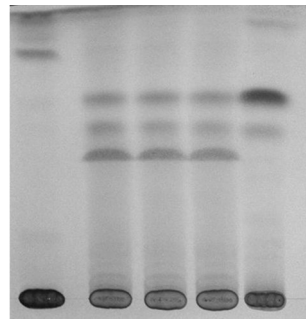


图5 麦冬的薄层色谱图

1.阴性对照;2~4.供试品;5.对照药材

Fig 5 TLC chromatograms of *O. japonicus*

1. negative control; 2-4. test samples; 5. reference substance

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按脉康合剂处方和制备工艺制备缺五味子的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 系统适应性试验 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6。结果,理论板数以五味子醇甲峰计>3 000,各成分基线分离良好,分离度>1.5,且阴性对照无干扰。

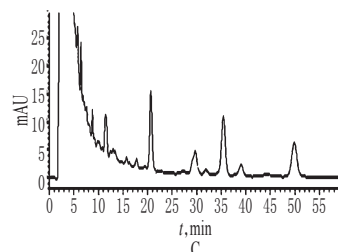
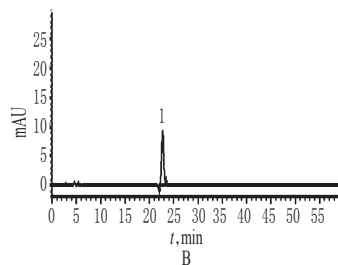
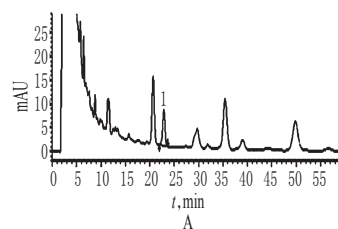


图6 高效液相色谱图

A.供试品;B.对照品;C.阴性对照;1.五味子醇甲

Fig 6 HPLC chromatograms

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

2.2.6 线性关系考察 取五味子醇甲对照品适量,精密称定,加入75%甲醇制成质量浓度分别为1、5、10、25、50 μg/ml的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各20 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以五味子醇甲

质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=20\ 285x-4\ 531.8$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,五味子醇甲检测质量浓度线性范围为 $1\sim 50\ \mu\text{g/ml}$ 。

2.2.7 精密度试验 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,五味子醇甲峰面积的RSD=0.67%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:20140219)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、12 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,五味子醇甲峰面积的RSD=1.62%($n=5$),表明供试品溶液在室温放置12 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:20140219)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,记录峰面积并计算含量。结果,五味子醇甲平均含量为 $3.686\ 3\ \mu\text{g/ml}$,RSD=1.45%($n=6$),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:20140219)适量,共6份,分别加入一定质量的五味子醇甲对照品,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 test($n=6$)

取样量, ml	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
5	18.431 7	18.490 5	36.369 2	97.01	97.80	0.56
5	18.431 7	18.490 5	36.567 9	98.08		
5	18.431 7	18.490 5	36.435 9	97.37		
5	18.431 7	18.490 5	36.517 3	97.81		
5	18.431 7	18.490 5	36.659 8	98.58		
5	18.431 7	18.490 5	36.541 4	97.94		

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($n=2$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=2$)

样品批号	五味子醇甲, $\mu\text{g/ml}$		平均值, $\mu\text{g/ml}$	RSD, %
	1	2		
20130321	3.427 0	3.496 0	3.461 5	1.00
20131121	3.456 0	3.563 0	3.509 5	1.52
20140219	3.700 0	3.757 0	3.728 5	0.76

3 讨论

3.1 检测波长的确定

笔者在 $200\sim 400\ \text{nm}$ 波长范围进行紫外光谱扫描,发现五味子醇甲对照品溶液在 $254\ \text{nm}$ 波长处有最大吸收,与所查阅的文献采用的波长基本相同^[10]。

3.2 流动相的确定

中药制剂方中所含药味较多,而每种药味又含有多种成分,因此需确定良好的流动相以备分析。笔者在查阅相关文献的基础上,对流动相进行了适当的改进,分别采用了甲醇-水(58:42, V/V)、(59.5:40.5, V/V)、(61:39, V/V)和(60:40, V/V)等不同配比进行试验^[11]。结果发现,流动相配比为甲醇-水(58:42, V/V)时,主成分峰与杂质峰重叠;改变流动相极性,配比为甲醇-水(59.5:40.5, V/V)时,主成分峰的峰形较好,峰面积合适,但其峰与杂质峰仍未完全分开;改变流动相配比为甲醇-水(61:39, V/V)后,发现主成分峰与杂质峰亦有重叠;而当调

整为甲醇-水(60:40, V/V)时,主成分峰与杂质峰分离效果最佳,理论板数及分离度较好,均达到相关要求。

3.3 提取方法的确定

取样品适量,分别考察了 $4\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$ 、 $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $2\ \text{min}$ 和 $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$ 的提取效果,结果发现不同离心转速与时间对样品中五味子醇甲峰形及其与杂质峰分离度均有较大影响,当离心转速越高、时间越长时杂质峰干扰最小,且五味子醇甲峰形较好,误差较小,重复性最佳。故最终选用以 $10\ \text{cm}$ 为半径、 $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$ 。

3.4 萃取溶剂的选择

笔者分别采用三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯作为萃取溶剂对供试品进行振摇提取^[12],结果显示三氯甲烷提取的五味子醇甲含量最高。笔者对萃取次数也进行了考察,结果发现,当萃取至第4次时进样测定色谱图中几乎没有五味子醇甲峰,故将萃取次数定为3次。

3.5 供试品溶剂的选择

分别采用水、50%甲醇、75%甲醇和甲醇作为溶解处理后的供试品残渣的溶剂,按“2.2.1”项下色谱条件进样。结果发现,以水为溶剂时色谱图中无明显的五味子醇甲色谱峰;以50%甲醇为溶剂时,五味子醇甲色谱峰与其他杂质峰有重叠,分离度较差;以甲醇为溶剂溶解时发现少量难溶物附着在容器上难以全部溶解。因采用75%甲醇可较好溶解残渣,且五味子醇甲峰形、峰面积及分离度均较好,故选用75%甲醇作为溶解供试品的溶剂。

综上所述,本研究所建标准可用于脉康合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 王佳丽,杨洪涛.五味子主要化学成分的药理研究[J].河南中医,2014,34(2):357.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57.
- [3] 李清娟,容彦华,陈素锐,等.养阴清肺颗粒中芍药苷与玄参的同板薄层色谱鉴别[J].中国药师,2014,17(2):335.
- [4] 李默影,乐心逸,梁伟,等.清胃颗粒的质量标准[J].中国医药工业杂志,2014,45(11):1 057.
- [5] 赵颖,张丽娟,赵晶晶,等.加味左金丸质量标准研究[J].现代中药研究与实践,2012,26(6):60.
- [6] 刘征辉,叶挺祥,赵琳琳.血府逐瘀颗粒薄层色谱鉴别方法的研究[J].天津中医药,2012,29(3):292.
- [7] 宋晓琳,陈坚,周文涛.益气逐瘀丸质量标准研究[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(1):59.
- [8] 李莉,苏华,张玉红.灯盏生脉软胶囊质量标准研究[J].中国新药与临床杂志,2010,29(3):213.
- [9] 朱璐璐,宋英,袁强华,等.咽灵合剂的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(19):1 787.
- [10] 曲佳,郭秀霞,周军.HPLC法测定参芪消渴胶囊中五味子醇甲的含量[J].天津药学,2009,21(6):13.
- [11] 曹阳,杨眉,刘燕,等.HPLC法测定生脉颗粒(党参方)中五味子醇甲的含量[J].川北医学院学报,2013,28(3):240.
- [12] 龙海燕,李文莉.HPLC法测定复方益肝灵胶囊中五味子醇甲含量[J].药物分析杂志,2010,30(2):282.

(收稿日期:2016-01-04 修回日期:2016-03-08)

(编辑:张 静)