

芪七连胶囊的质量标准研究[△]

罗远^{1*}, 叶云², 岳桂华³, 梁健钦^{3,4} (1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011; 2. 解放军第303医院, 南宁 530021; 3. 广西中医药大学科技处, 南宁 530001; 4. 广西中医药大学中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530001)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4706-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.34

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)法对制剂中黄芪、黄柏、黄连进行鉴定。采用高效液相色谱法测定制剂中人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}和三七皂苷R₁的含量。色谱柱为Shim-pack VP-ODS C₁₈, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为203 nm, 柱温为20 ℃。结果: 黄芪、黄柏、黄连TLC图斑点清晰, 分离度好。人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}和三七皂苷R₁检测进样量线性范围分别为0.9~9.0、0.94~9.4、0.3~3.0 μg ($r \geq 0.999 5$); 精密性、重复性、稳定性试验的RSD < 3.0%; 加样回收率分别为96.08%~99.75% (RSD=1.52)、97.03%~99.75% (RSD=1.10)、96.38%~98.55% (RSD=0.90), n 均为6。结论: 该方法操作简便、重复性好, 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; 高效液相色谱法; 人参皂苷; 三七皂苷

Study on the Quality Standard of Qiqilian Capsule

LUO Yuan¹, YE Yun², YUE Gui-hua³, LIANG Jian-qin^{3,4} (1. RuiKang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 2. 303 Hospital of People's Liberation Army, Nanning 530021, China; 3. Dept. of Science and Technology, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 4. Key Laboratory of Common Technology of Traditional Chinese Medicine Preparation, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standards for Qiqilian capsule. METHODS: TLC was used to identify the Astragali Radix, *Phellodendri chinensis*, *Coptidis rhizom*. HPLC was used to determine the contents of ginsenosides R_{g1}, ginsenosides R_{b1} and notoginsenosides R₁. The column was Shim-pack VP-ODS C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 203 nm, column temperature was 20 ℃. RESULTS: TLC of Astragali Radix, *P. chinensis*, *C. rhizom* showed clear spots and good separation. The linear range was 0.9-9.0 μg for ginsenosides R_{g1}, 0.94-9.4 μg for ginsenosides R_{b1} and 0.3-3.0 μg for notoginsenosides R₁ ($r \geq 0.999 5$); RSDs of precision, reproducibility and stability test were lower than 3.0%; recoveries were 96.08%-99.75% (RSD=1.52, $n=6$), 97.03%-99.75% (RSD=1.10, $n=6$) and 96.38%-98.55% (RSD=0.90, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, good reproducibility, and can be used for the quality control of Qiqilian capsule.

KEYWORDS Qiqilian capsule; Quality standard; TLC; HPLC; Ginsenosides; Notoginsenosides

芪七连胶囊是广西中医药大学附属瑞康医院开发的院内制剂(原临床方剂为益气活血方), 由黄芪、黄连、黄柏、三七等7味中药组成, 具有益气活血、清热解毒的功效^[1-2], 适用于由高血压引起的眩晕、头痛、胸闷、心悸、烦躁等症的治疗^[3-4]。其原质量标准仅有黄芪和三七的定性鉴别^[5]。为了对其进行深入的开发, 本研究参照《药品注册管理办法》六类新药的有关要求, 建立了芪七连胶囊中黄芪、黄柏、黄连的薄层色谱(TLC)鉴别方法和人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}和三七皂苷R₁的高效液相色谱(HPLC)含量测定方法, 为制定芪七连胶囊的质量标准

提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪, 包括二级管阵列检测器(美国Agilent公司); B3200S-T型超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司); AG285型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司); ZF-20C型自动紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂)。

1.2 药品与试剂

芪七连胶囊(广西中医药大学附属瑞康医院民族医药研发基地, 批号: 2013062101、2013062102、2013062103, 规格: 0.3 g/粒); 黄芪甲苷对照品(批号: 110781-201314, 纯度 > 98%); 盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-201212, 纯度 > 98%); 人参皂苷R_{g1}对照品(批号: 110703-201128, 纯度 > 98%); 人参皂苷R_{b1}对照品(批号: 110704-201223, 纯度 >

[△] 基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(No. 桂科攻1355004-2); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项项目(No. GZBZ14-05)

* 助理研究员, 硕士。研究方向: 中医药民族药研发。电话: 0771-2238816。E-mail: luoyuanr@126.com

98%)、三七皂苷R₁对照品(批号:110745-201318,纯度>98%)、黄芪对照药材(批号:120974-201311)、黄柏对照药材(批号:121510-201105)、黄连对照药材(批号:120913-201310)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,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 黄芪 取本品内容物2g,研细,加甲醇50ml,超声(功率:250W,频率:40kHz,下同)处理30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20ml使溶解,用水饱和的正丁醇提取2次(每次20ml);合并正丁醇液,用1%氢氧化钠溶液洗涤2次(每次20ml);再以正丁醇饱和的水洗至中性,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1ml溶解,即得供试品溶液。取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成每1ml含1mg的对照品溶液。另取黄芪对照药材2g按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按处方及制备工艺制备缺黄芪的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法(2010版《中国药典》(一部)附录VI B)试验,吸取上述溶液各10μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-丙酮-水(13:5:7:2:1, V/V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,详见图1A。

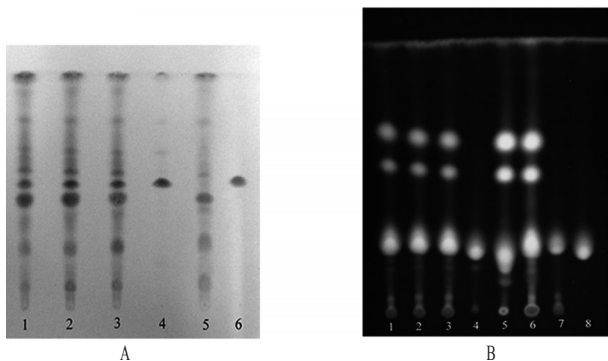


图1 薄层色谱图

A.黄芪[1~3.供试品(批号:2013062101、2013062102、2013062103);4.对照药材;5.阴性对照;6.对照品];B.黄柏、黄连[1~3.供试品(批号:2013062101、2013062102、2013062103);4.黄柏对照药材;5.黄连对照药材;6.缺黄柏的阴性对照;7.缺黄连的阴性对照;8.对照品]

Fig 1 TLC chromatograms

A.Astragali Radix[1-3.test samples (batch number: 2013062101, 2013062102, 2013062103); 4.reference crud herb; 5.negative control; 6.reference substance]; B.Phellodendri chinensis and Coptidis rhizoma [1-3.test samples (batch number: 2013062101, 2013062102, 2013062103); 4.reference crude herb of Phellodendri Chinensis Cortex; 5.reference crude herb of Coptidis Rhizoma; 6.negative control without *P. chinensis*; 7.negative control without *C. rhizoma*; 8. reference substance]

2.1.2 黄柏、黄连 取本品内容物1g,研细,加甲醇50ml,超声处理30min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1ml使溶解,即得供试品溶液。取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每1ml含0.5mg的对照品溶液。另分别取黄柏、黄连对照药材各0.5

g,按供试品溶液制备方法分别制成对照药材溶液。再分别制备缺黄柏、黄连的阴性样品,按供试品溶液制备方法分别制成阴性对照溶液。按TLC法(2010版《中国药典》(一部)附录VI B)试验,吸取上述溶液各10μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-氨水(10:4.5:1.5:0.5, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰,详见图1B。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Shim-pack VP-ODS C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~30min,20%→42%A;30~36min,20%A);流速:1.0ml/min;检测波长:203nm;柱温:20℃。在上述色谱条件下,理论板数均大于6000,分离度均大于1.7,各成分基线分离良好,详见图2。

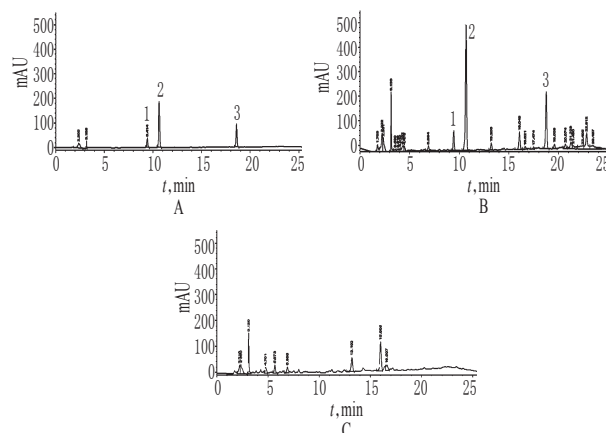


图2 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.人参皂苷R_g₁;2.人参皂苷R_b₁;3.三七皂苷R₁

Fig 2 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.ginsenosides R_g₁; 2.ginsenosides R_b₁; 3.notoginsenosides R₁

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别取人参皂苷R_g₁、人参皂苷R_b₁、三七皂苷R₁对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每1ml含人参皂苷R_g₁、人参皂苷R_b₁、三七皂苷R₁分别为0.45、0.45、0.15mg的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物约1g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入水饱和的正丁醇50ml,密塞,称定质量,超声处理30min,放冷,再称定质量,用水饱和的正丁醇补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液25ml,置于分液漏斗中,加氨试液洗涤2次(15、10ml),取正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至5ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方及制备工艺制备缺三七的阴性样品,按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液2、5、10、15、20μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面

积。以进样量($x, \mu\text{l}$)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 回归方程分别为 $y=308.915\ 885x+4.461\ 478\ 6$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=152.225\ 275x+38.671\ 429$ ($r=0.999\ 6$)、 $y=211.146\ 52x+7.014\ 285\ 7$ ($r=0.999\ 5, n=6$)。结果表明,人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 检测进样量线性范围分别为 $0.9\sim 9.0$ 、 $0.94\sim 9.4$ 、 $0.3\sim 3.0\ \mu\text{g}$ 。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,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,人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 峰面积的RSD分别为2.83%、1.20%、0.89% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:2013062101)适量,分别于放置0、1、2、3、5、12、24、48 h时进样测定,记录峰面积。结果,人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 峰面积的RSD分别为1.78%、0.70%、1.46% ($n=8$),表明供试品溶液在48 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:2013062101)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,人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 峰面积的RSD分别为1.12%、0.60%、1.15% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取样品(批号:2013062101)适量,共6份,分别加一定质量的人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 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,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

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

待测成分	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, %
人参皂苷 R_{g_1}	1.000	0.812	0.408	1.204	96.08	98.24	1.52
	1.000	0.837	0.408	1.242	99.26		
	1.000	0.820	0.408	1.215	96.81		
	1.000	0.792	0.408	1.193	98.28		
	1.000	0.832	0.408	1.237	99.26		
	1.000	0.819	0.408	1.226	99.75		
人参皂苷 R_{b_1}	1.000	0.698	0.404	1.101	99.75	97.94	1.10
	1.000	0.719	0.404	1.112	97.28		
	1.000	0.705	0.404	1.097	97.03		
	1.000	0.681	0.404	1.075	97.52		
	1.000	0.715	0.404	1.114	98.76		
	1.000	0.704	0.404	1.097	97.28		
三七皂苷 R_1	1.000	0.277	0.138	0.412	97.83	97.34	0.90
	1.000	0.285	0.138	0.421	98.55		
	1.000	0.280	0.138	0.414	97.10		
	1.000	0.270	0.138	0.403	96.38		
	1.000	0.284	0.138	0.417	96.38		
	1.000	0.279	0.138	0.414	97.83		

2.2.10 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,计算样品含量,结果见表2。

3 讨论

表2 样品含量测定结果($n=6, \text{mg/粒}$)

Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=6, \text{mg/granule}$)

批号	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_{b_1}	三七皂苷 R_1
2013062101	0.553	0.472	0.182
2013062102	0.555	0.476	0.185
2013062103	0.546	0.465	0.180

芪七连胶囊中的黄连、黄柏共同含有小檗碱、药根碱等成分^[6-7],以常用的TLC法鉴别可见,阴性对照品在紫外光灯(365 nm)下有相同的斑点,且两味药相互干扰。笔者参照2010版《中国药典》(一部)收录的青娥丸项下黄连和黄柏的TLC法^[8],同时使用黄柏、黄连对照药材以及盐酸小檗碱作对照,可以进行有效鉴别。

芪七连胶囊中三七作为臣药,具有活血止血、祛瘀生新、消肿定痛之功效,在本方剂中是益气活血的主要成分^[9-10]。因此,笔者采用HPLC测定制剂中人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、三七皂苷 R_1 作为质量控制指标。在供试品的制备中,笔者曾比较了以甲醇和水饱和的正丁醇作为提取液制备供试品。结果,以甲醇作提取液时干扰较大,而以水饱和的正丁醇超声提取,最后以氨试液洗涤,能有效地去除干扰。

综上所述,该方法操作简便、重复性好,可用于芪七连胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 岳桂华,卓少元.益气活血解毒方对幼龄自发性高血压大鼠内皮功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):154.
- [2] 张志伟,岳桂华.益气活血解毒方对自发性高血压大鼠血管内皮功能保护作用的研究[J].中国药房,2012,23(3):200.
- [3] 覃裕旺,朱志华,张爱珍,等.芪七连胶囊对高血压病及相关危险因素的影响[J].河南中医,2013,33(9):1463.
- [4] 覃裕旺,朱志华,张爱珍,等.芪七连胶囊对高血压病患者生存质量的影响[J].江苏中医药,2013,45(4):25.
- [5] 陈壮,岳桂华,黄敏,等.芪七连胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(27):2551.
- [6] 况晓,冯年平,张永太,等.大孔吸附树脂分离纯化黄连黄柏总生物碱的工艺研究[J].中成药,2010,32(3):396.
- [7] 刘冬敏,刘树民,祖金祥,等.黄连解毒汤及其不同配伍组方成分溶出变化研究[J].中成药,2012,34(1):74.
- [8] 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,2010:798.
- [9] 岳桂华,莫兰,罗远.益气活血解毒方对自发性高血压大鼠炎性因子、血管性假血友病因子水平的影响[J].中国中医急症,2010,19(8):1365.
- [10] 岳桂华,秦小慧.高血压病“毒”的物质基础[J].中国基础医学杂志,2009,15(2):133.

(收稿日期:2015-03-17 修回日期:2015-08-18)

(编辑:张静)