

青连宁心胶囊的质量标准研究[△]

司席席^{1*}, 孙洪胜^{2#}, 曹广尚², 陈倩倩¹, 刘丹¹(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

中图分类号 R917; R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4707-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.33

摘要 目的: 建立青连宁心胶囊的质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对制剂中黄连、青蒿进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定制剂中青蒿素的含量; 色谱柱为Diamonsil C₁₈, 流动相为甲醇-磷酸盐缓冲液(45:55, V/V), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为260 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μl。结果: 黄连、青蒿的TLC斑点清晰, 分离度好, 阴性对照无干扰。青蒿素检测质量浓度线性范围为5.62~56.2 μg/ml($r=0.999\ 4$); 精密密度、稳定性、重复性的RSD<1.0%; 加样回收率为97.46%~99.72%(RSD=0.75%, $n=6$)。结论: 该研究所建标准可用于青连宁心胶囊的质量控制。

关键词 青连宁心胶囊; 青蒿素; 高效液相色谱法; 薄层色谱法; 质量标准

Study on the Quality Standard of Qinglian Ningxin Capsule

SI Xixi¹, SUN Hongsheng², CAO Guangshang², CHEN Qianqian¹, LIU Dan¹(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Qinglian ningxin capsule. METHODS: TLC was adopted for the qualitative identification of *Coptis chinensis* and *Artemisia carvifolia*. HPLC was used for the content determination of artemisinin: column was Diamonsil C₁₈ with mobile phase of methanol-phosphate buffer solution (45:55, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 260 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The TLC spots of *C. chinensis* and *A. carvifolia* were clear and well separated, negative control without interference. The linear range of artemisinin was 5.62-56.2 μg/ml ($r=0.999\ 4$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.0%; recovery was 97.46%-99.72% (RSD=0.75%, $n=6$). CONCLUSIONS: The standard can be used for the quality control of Qinglian ningxin capsule.

KEYWORDS Qinglian ningxin capsule; Artemisinin; HPLC; TLC; Quality standard

快速性心律失常是临床上常见的心血管系统疾病, 属于中医“心悸”范畴, 具有起病急、病情复杂、治疗效果不佳等特点。青连宁心胶囊由黄连和青蒿两味药材组合而成, 方中黄连味苦, 性寒, 有清热泻火、燥湿解毒之效; 青蒿味苦、辛, 性寒, 有清热除蒸、化湿消痰之功。二药合用共奏清热化痰、宁心安神之功效, 是治疗快速性心律失常的临床经验加减方。为有效控制该制剂的质量, 笔者对其质量标准进行了研究——采用薄层色谱法(TLC)鉴别制剂中黄连和青蒿, 高效液相色谱法(HPLC)测定其中青蒿素的含量。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪, 包括DAD二极管阵列检测器(美国Agilent公司); AV412型电子分析天平、CP2250型电子分析天平(奥豪斯国际贸易有限公司); LC-600B型数控超声波清洗机(山东济宁鲁超超声设备有限公司, 功率: 250 W, 频率: 40 kHz); 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

[△] 基金项目: 山东省重点研发计划项目(No.2014GGH219001)

* 硕士研究生。研究方向: 中药制剂新剂型新技术。E-mail: 810700090@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 中药制剂新剂型新技术。电话: 0531-82929059。E-mail: shs7777@163.com

1.2 药品与试剂

青连宁心胶囊(山东中医药大学附属医院药剂实验室自制, 批号: 20150518、20150524、20150530, 规格: 0.3 mg/粒); 青蒿素对照品(批号: 100202-201004, 纯度: 98.8%)、盐酸小檗碱对照品(批号: MUST-15010411)、黄连对照药材(批号: 120913-200407)均购于中国食品药品检定研究院; 硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂); 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 黄连 取本品内容物0.25 g, 研细, 加甲醇25 ml, 超声处理30 min, 滤过, 取滤液作为供试品溶液。另取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成盐酸小檗碱质量浓度为0.5 mg/ml的对照品溶液。再取黄连对照药材0.25 g, 同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按青连宁心胶囊处方和工艺制备缺黄连的阴性样品, 并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》(四部)]^[1]试验, 吸取上述4种溶液各1 μl, 分别点于同一硅胶G薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:0.5:1, V/V/V/V/V/V)为展开剂, 置于浓氨液预饱和20 min的展开缸内, 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

药材和对照品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。

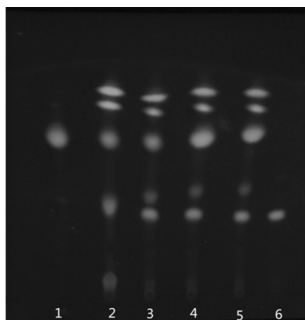


图1 黄连的薄层色谱图

1.对照品;2.对照药材;3~5.供试品;6.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Coptis chinensis*

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

2.1.2 青蒿 取本品内容物3 g,加石油醚(60~90℃)50 ml,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加正己烷30 ml使溶解,加20%乙腈溶液振摇提取3次,每次10 ml,合并乙腈溶液,蒸干,残渣加95%乙醇0.5 ml使溶解,作为供试品溶液。另取青蒿素对照品适量,加95%乙醇制成青蒿素质量浓度为1 mg/ml的对照品溶液。按青连宁心胶囊处方和工艺制备缺青蒿的阴性样品,并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》(四部)]^[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,以石油醚(60~90℃)-乙醚(4:5, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以含2%香草醛的10%硫酸乙醇溶液,于105℃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,阴性对照无干扰,详见图2。

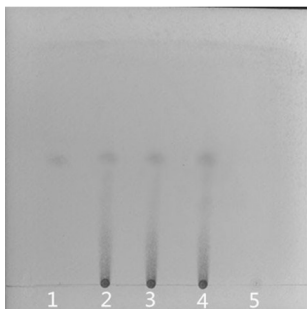


图2 青蒿的薄层色谱图

1.对照品;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Artemisia carvifolia*

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

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-磷酸盐缓冲液(45:55, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 260 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μl。

2.2.2 对照品溶液的制备^[2-3] 精密称取青蒿素对照品5.62 mg, 置于5 ml量瓶中, 加95%乙醇溶解并定容, 得青蒿素对照品贮备液; 精密量取上述对照品贮备液1 ml, 置于10 ml量瓶中, 加0.2%氢氧化钠溶液4 ml, 摇匀, 置于50℃恒温水浴中反应30 min, 取出, 冷却至室温, 加0.08 mol/L醋酸溶液定容, 用

0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物适量, 研细, 取约1.53 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加95%乙醇50 ml, 密塞, 称定质量, 超声处理30 min, 放冷, 再次称定质量, 加95%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 得供试品溶液贮备液; 精密量取上述供试品贮备液2 ml, 置于10 ml量瓶中, 加0.2%氢氧化钠溶液4 ml, 摇匀, 于50℃恒温水浴中反应30 min, 取出, 冷却至室温, 加0.08 mol/L醋酸溶液定容, 用0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按青连宁心胶囊处方和工艺制备缺青蒿的阴性样品, 并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性试验 分别取“2.2.2”“2.2.3”“2.2.4”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μl, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图3。在上述色谱条件下, 理论板数以青蒿素峰计≥3 000; 各成分基线分离良好, 分离度>1.5。

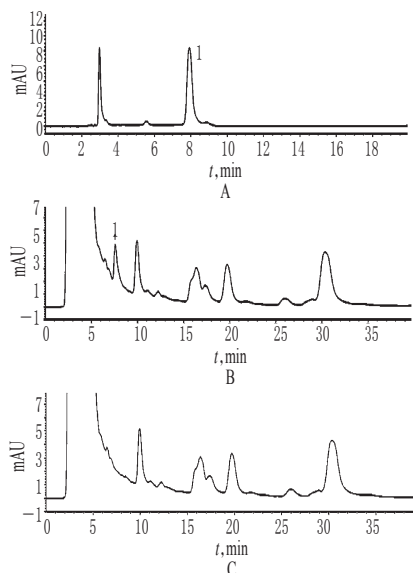


图3 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.青蒿素

Fig 3 HPLC chromatograms

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

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 分别置于10 ml量瓶中, 加95%乙醇定容, 制成质量浓度分别为5.62、11.24、22.48、33.72、56.2 μg/ml的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μl, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以青蒿素质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得青蒿素回归方程为 $y=10.167x-14.845$ ($r=0.9994$)。结果表明, 青蒿素检测质量浓度线性范围为5.62~56.2 μg/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, 青蒿素峰面积的RSD=0.59% ($n=6$), 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: 20150518)适量, 分别于室温下放置0、2、4、8、10、12 h时按

“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,青蒿素峰面积的RSD=0.44%(n=6),表明供试品溶液在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:20150518)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,青蒿素峰面积的RSD=0.61%(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:20150518)适量,共6份,分别加入一定质量的青蒿素对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,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,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,%
0.512	0.873 0	0.890 7	1.753 7	98.88	98.72	0.75
0.507	0.863 8	0.890 7	1.742 5	98.65		
0.503	0.857 5	0.890 7	1.745 7	99.72		
0.509	0.867 8	0.890 7	1.735 9	97.46		
0.513	0.874 0	0.890 7	1.756 3	99.06		
0.512	0.871 9	0.890 7	1.749 8	98.56		

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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3,mg/g)

样品批号	青蒿素	平均含量
20150518	1.704 2	1.697 0
20150524	1.689 4	
20150530	1.697 3	

3 讨论

青蒿素是一种新型倍半萜内酯类化合物,20世纪70年代发现青蒿中含有抗疟成分青蒿素,目前青蒿素的测定方法尚未收录至《中国药典》,由于青蒿素没有共轭结构,化学性质不稳定,所以给测定带来了困难。已有文献报道了采用多种方法测定青蒿素含量,如薛洪宝等^[4]用紫外和蒸发光散射检测器同时测定青蒿中6种成分,结果除了青蒿素外,其他5种成分紫外检测比蒸发光散射检测灵敏度高;周翱翔等^[5]用HPLC-蒸发光散射检测法测定青蒿中青蒿素的含量;张东等^[6]用HPLC-紫外吸收光谱(UV)-蒸发光散射检测法同时测定青蒿中的青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸的含量;黄宇等^[7]用碘量法测定黄花蒿中青蒿素的含量;周浓等^[8]用紫外分光光度法测定重庆酉阳县7份不同产地黄花蒿;丁小莉等^[9]通过比较UV和HPLC法测定青蒿中青蒿素的含量,结果发现HPLC法测定青蒿素较为准确,UV法不宜单独用于青蒿素的含量分析。

HPLC法能有效地将青蒿素和青蒿素类似物分离,排除干扰,精密度、稳定性均较好。青蒿素只有在205 nm波长处有末

端吸收。本试验先用未衍生化的方法测定青蒿素,结果发现甲醇、乙醇等溶剂对青蒿素吸收峰有较大影响。文献研究发现,青蒿素检测方法还有柱前衍生和柱后衍生^[10],通过试验笔者最后确定采用柱前衍生化法测定青蒿素含量。查阅文献^[11-13]发现,青蒿素能与碱发生反应,生成Q292,在292 nm波长处有最大吸收,但是Q292不稳定,且反应后生成的无机碱会对色谱柱造成损害,而Q292在pH5~6条件下易转化为化学性质相对稳定的Q260。故确定以衍生化HPLC法(检测波长:260 nm)测定青蒿素的含量。

综上所述,本研究所建标准可用于青连宁心胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57.
- [2] 李春红,王琳,何兵,等.青蒿不同生长采收期青蒿素含量测定[J].时珍国医国药,2007,18(4):888.
- [3] 张琳.HPLC法测定心速宁胶囊中青蒿素的含量[J].中国当代医药,2011,18(21):65.
- [4] 薛洪宝,焦艳娜,庞国伟,等.青蒿中6种成分同时定量的高效液相色谱法研究[J].四川大学学报,2009,41(4):119.
- [5] 周翱翔,郑文欣,葛发欢.HPLC-ELSD法测定青蒿中青蒿素的含量[J].中药材,2006,29(3):242.
- [6] 张东,杨岚,杨立新,等.HPLC-UV-ELSD法同时测定青蒿中的青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸的含量[J].药学学报,2007,42(9):978.
- [7] 黄宇,冯军,攀艳茹,等.碘量法测定黄花蒿中青蒿素的含量[J].广州化工,2014,42(18):135.
- [8] 周浓,段意梅,陈强.青蒿素含量测定方法改进及黄花蒿植物质量评价[J].时珍国医国药,2008,19(4):911.
- [9] 丁小莉,吴强,陈小波,等.UV法与HPLC法测定青蒿中青蒿素含量的比较[J].中国药房,2011,22(3):246.
- [10] 刘丽芳,王茜,李海燕,等.柱前衍生-RP-HPLC法测定青蒿中青蒿素的含量[J].中国野生植物资源,2004,23(6):60.
- [11] 张馨莹.黄花蒿中青蒿素的提取工艺及测定方法研究[D].重庆:西南大学,2013.
- [12] 王玉春,吴江,闭静秀,等.青蒿素提取条件研究[J].中草药,2000,31(6):421.
- [13] 张海容,张娜.超声萃取-紫外分光光度法测定不同产地青蒿中青蒿素的含量[J].药物分析杂志,2007,27(3):414.

(收稿日期:2015-12-01 修回日期:2016-03-07)

(编辑:张 静)