

益气强心胶囊的质量标准研究

聂继红*, 王萍, 刘兆龙(新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

中图分类号 R283.65;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0644-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.23

摘要 目的:建立益气强心胶囊的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对益气强心胶囊中的黄芪、红景天、丹参、葶苈子进行定性鉴别;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VP-ODS柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-2%甲酸溶液(24:9:67, V/V/V),检测波长为286 nm,柱温为35 ℃,流速为1 ml/min。结果:黄芪、红景天、丹参、葶苈子的TLC斑点清晰、分离度好,且阴性对照无干扰。丹酚酸B的质量浓度在0.027 8~0.139 0 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为100.29%,RSD=1.91%($n=6$)。结论:所建标准可用于益气强心胶囊的质量控制。

关键词 益气强心胶囊;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;黄芪;红景天;丹参;葶苈子;丹酚酸B

Quality Standard of Yiqi Qiangxin Capsules

NIE Ji-hong, WANG Ping, LIU Zhao-long(The Affiliated Hospital of TCM, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Yiqi qiangxin capsule. METHODS: TLC was used to identify *Astragalus Radix*, *Rhodiola crenulata*, *Salvia miltiorrhiza* and *Lepidium apetalum* in Yiqi qiangxin capsule qualitatively; the content of salvianolic acid B was determined by HPLC. The separation was performed on VP-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm) column with methanol-acetonitrile-2% methanoic acid (24:9:67, V/V/V) as mobile phase at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 286 nm, and column temperature was 35 ℃. RESULTS: TLC spots of them were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of salvianolic acid B were 0.027 8-0.139 0 mg/ml ($r=0.999 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; average recovery was 100.29% (RSD=1.91%, $n=6$). CONCLUSIONS: The standard can be used for quality control of Yiqi qiangxin capsules.

KEYWORDS Yiqi qiangxin capsule; Quality standard; TLC; HPLC; *Astragalus Radix*; *Rhodiola crenulata*; *Salvia miltiorrhiza*; *Lepidium apetalum*; Salvianolic acid B

益气强心胶囊处方来源于新疆医科大学附属中医医院临床多年应用于治疗心衰的经验方,由黄芪、红景天、丹参、红花、葶苈子等多味药组成。该方主要功效是益气活血、温阳扶正,用于治疗心肺气虚、痰瘀痹阻证,心肾阳虚、痰饮上逆证,以及心肾阳虚、水饮泛滥证为主的心衰,临床疗效较好。为方便患者使用,笔者将其研究开发成胶囊剂。为有效控制制剂质量,保证其临床疗效,笔者对其进行了质量标准研究,建立了其中黄芪、红景天、丹参、葶苈子的薄层色谱(TLC)鉴别方法;并采用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中的主要有效成分—丹酚酸B的含量进行定量分析。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪(美国Waters公司);AG-135型电子天平、AL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Direct-QTM5型超纯水仪(美国Millipore公司);SK250LHC型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:35~53 kHz)。

1.2 药品与试剂

益气强心胶囊(新疆医科大学附属中医医院自制,批号:

* 主任药师,教授。研究方向:中药新药研发。电话:0991-5810646。E-mail:xjnjh411@163.com

20121220、20121227、20130105);丹酚酸B对照品(供含量测定用,批号:111562-200504)、红景天苷对照品(供含量测定用,批号:0818-200103)、黄芪对照药材(批号:120974-200609)、葶苈子对照药材(批号:121220-200101)、丹参酮Ⅱ_A对照品(供含量测定用,批号:110766-200619)均由中国食品药品检定研究院提供;薄层层析用硅胶G(青岛海洋化工有限公司);水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 黄芪的TLC鉴别^[1-5] 取本品内容物2 g,研细,加乙醇30 ml,加热回流20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加0.3%氢氧化钠溶液15 ml使溶解,滤过,滤液用稀盐酸调pH为5~6,用乙酸乙酯15 ml振荡提取,分取乙酸乙酯液,用铺有适量无水硫酸钠的滤纸滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取黄芪对照药材,同法制成对照药材溶液。按处方比例称取缺黄芪的其他药材,按制备工艺制备阴性样品,同法制成缺黄芪的阴性对照溶液。照TLC法^[1]试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液与阴性对照溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(10:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置氨蒸汽中熏后,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,

显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。黄芪的TLC图见图1。
 2.1.2 红景天的TLC鉴别^[1,6-7] 取本品内容物2 g,研细,加甲醇15 ml,加热回流30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 ml使溶解,作为供试品溶液。另取红景天苷对照品,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方比例称取缺红景天的其他药材,按制备工艺制备阴性样品,同法制成缺红景天的阴性对照溶液。照TLC法^[1]试验,吸取供试品溶液、对照品溶液与阴性对照溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-丙酮-水(6:3:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置碘蒸汽中熏,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。红景天的TLC图见图2。

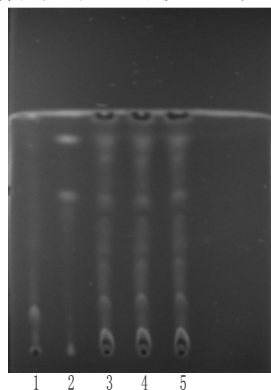


图1 黄芪的TLC图

1.阴性对照;2.黄芪对照药材;3~5.供试品

Fig 1 TLC of Astragali Radix reference substance; 3-5. test samples

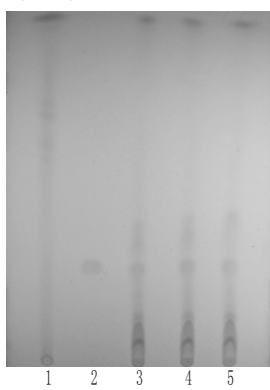


图2 红景天的TLC图

1.阴性对照;2.红景天苷对照品;3~5.供试品

Fig 2 TLC of Rhodiola crenulata 1. negative control; 2. salidroside control; 3-5. test samples

2.1.3 丹参的TLC鉴别^[1,2,8-12] 取本品内容物1 g,研细,加乙醚5 ml,密塞,振摇,40 ℃水浴中热浸30 min,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯0.5 ml使溶解,作为供试品溶液。另取丹参酮II_A对照品,加乙酸乙酯制成每1 ml含2 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方比例称取缺丹参的其他药材,按制备工艺制备阴性样品,同法制成缺丹参的阴性对照溶液。照TLC法^[1]试验,吸取供试品溶液、对照品溶液与阴性对照溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯(19:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。丹参的TLC图见图3。

2.1.4 葶苈子的TLC鉴别^[1,13] 取本品内容物1 g,研细,加甲醇5 ml,振摇,浸渍30 min,取上清液,作为供试品溶液。另取葶苈子对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。按处方比例称取缺葶苈子的其他药材,按制备工艺制备阴性样品,同法制成缺葶苈子的阴性对照溶液。照TLC法^[1]试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液与阴性对照溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-甲醇-甲酸(30:5:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。葶苈子的TLC图见图4。

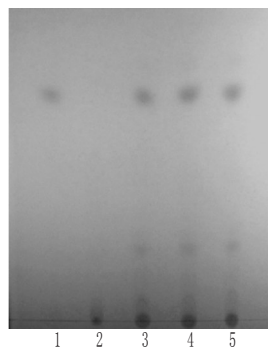


图3 丹参的TLC图

1.丹参酮II_A对照品;2.阴性对照;3~5.供试品

Fig 3 TLC of Salvia miltiorrhizae

1.tanshinone II_A control; 2.negative control; 3-5. test samples

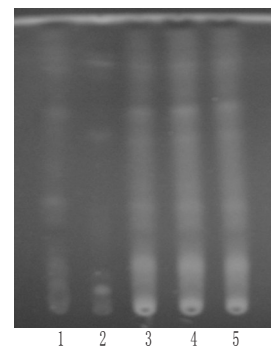


图4 葶苈子的TLC图

1.阴性对照;2.葶苈子对照药材;3~5.供试品

Fig 4 TLC of Lepidium Se-mell

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

2.2 丹酚酸B含量测定^[1,11,14-17]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:VP-ODS(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-乙腈-2%甲酸溶液(24:9:67, V/V/V); 检测波长:286 nm; 柱温:35 ℃; 流速:1 ml/min。

2.2.2 对照品贮备液的制备 精密称取丹酚酸B对照品6.950 0 mg,置50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得丹酚酸B对照品贮备液(质量浓度为0.139 0 mg/ml)。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品细粉约0.5 g,精密称定,置25 ml量瓶中,加甲醇15 ml,振摇使溶解后超声提取30 min,再以甲醇定容,摇匀,0.45 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 按处方比例,精密称取除丹参以外的其余药材,按制备工艺制成阴性样品,再按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 取对照品贮备液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μl,分别注入液相色谱仪,按上述色谱条件依法测定。结果表明,阴性对照对样品中丹酚酸B的检测无干扰。色谱见图5。

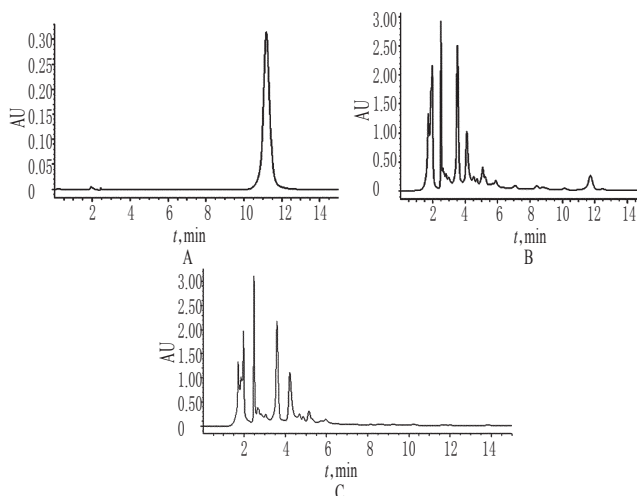


图5 高效液相色谱图

A.丹酚酸B对照品;B.供试品;C.阴性对照

Fig 5 HPLC chromatograms

A.salvianolic acid B control; B. test samples; C. negative control

2.2.6 线性关系考察 精密吸取对照品贮备液1、2、3、4 ml,分别置于5 ml量瓶中,加色谱纯甲醇至刻度,摇匀,即得到质量浓度分别为0.027 8、0.055 6、0.083 4、0.111 2 mg/ml的对照品溶液。用上述4个对照品溶液及对对照品贮备液分别进样分析,进样量为10 μl。以峰面积积分值(y)对对照品质量浓度(x)进行线性回归,得丹酚酸B的回归方程为 $y=12\ 035\ 181x-44\ 053$ ($r=0.999\ 9, n=5$)。结果表明,丹酚酸B的质量浓度在0.027 8~0.139 0 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.7 精密度试验 取对照品溶液10 μl,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,RSD=0.49% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批样品适量,共6份,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,每次进样量为10 μl,记录峰面积。结果显示,RSD=1.61% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液10 μl,于0、6、12、24、48 h分别按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,RSD=1.78% ($n=5$),表明供试品溶液在48 h内较稳定。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取同一批已知含量的样品适量,共6份,分别精密加入丹酚酸B对照品贮备液适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样10 μl,记录峰面积,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 ($n=6$)

样品号	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	0.002 0	0.052 2	0.052 0	0.103 2	98.12		
2	0.001 9	0.049 6	0.052 0	0.103 0	102.75		
3	0.002 0	0.052 2	0.052 0	0.104 9	101.38	100.29	1.91
4	0.002 0	0.052 2	0.052 0	0.103 5	98.69		
5	0.002 0	0.052 2	0.052 0	0.105 1	101.77		
6	0.002 1	0.054 8	0.052 0	0.106 3	99.06		

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,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品含量。结果显示,3批样品(批号分别为20121220、20121227、20130105)中丹酚酸B的含量分别为26.01、26.09、26.93 mg/g,平均含量为26.34 mg/g。

3 讨论

在参考2010年版《中国药典》(一部)及大量文献的基础上,本试验对益气强心胶囊全方药味均进行了TLC法定性鉴别研究,分别采用多种不同的供试品处理方法及展开剂进行试验。结果表明,方中主要成分黄芪、红景天、丹参、葶苈子的色谱斑点清晰、分离效果较好,具有重现性好、专属性强、简便、快速等特点,可作为该制剂的定性鉴别依据。而方中其余药材如红花等,因未能得到理想的TLC图谱,因此未能列入质量标准。

本研究对方中葶苈子进行TLC定性鉴别时,曾分别采用水蒸气蒸馏提取、乙醚萃取、甲醇提取等方法。结果发现,用甲醇浸渍提取法对应的色谱斑点清晰、分离效果较好、灵敏度较高,故选择该方法。

丹酚酸B含量测定项下供试品溶液的制备过程中,为了保证样品中丹酚酸B被充分提取,笔者分别对不同体积分数的提

取溶剂、溶剂加入量、提取方法(不同超声处理时间、不同回流时间)进行比较试验。结果表明,本品用30倍量甲醇超声提取30 min,然后定容至50倍量甲醇时,提取效果较好。

在采用HPLC法测定样品中丹酚酸B含量时,笔者曾分别采用乙腈-甲醇-1.7%甲酸溶液(10:30:60, V/V/V)^[1]、甲醇-1.6%甲酸溶液(36:64, V/V)^[11]、乙腈-1.9%甲酸溶液(22:78, V/V)^[14]、甲醇-0.1%甲酸溶液(25:75, V/V)^[15]、甲醇-乙腈-75%甲酸溶液(27:10:63, V/V/V)^[16]、甲醇-乙腈-1.6%甲酸溶液(25:11:64, V/V/V)^[17]等作为流动相,结果杂质峰干扰较大、峰形较差、拖尾严重。后经试验筛选,将流动相比比例更改为甲醇-乙腈-2%甲酸溶液(24:9:67, V/V/V),丹酚酸B与杂质峰的分离效果较理想,且方法简单、易操作,可以有效地用于该制剂中丹酚酸B的含量测定。

综上,所建标准可用于益气强心胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:283、144、70、313、附录34.
- [2] 徐丽婷,谢华,贾正平,等.天奇胶囊质量标准的研究[J].中成药,2003,25(10):807.
- [3] 祁俊,朱和平,刘承军.复方黄芪风湿止痛胶囊质量标准研究[J].现代中药研究与实践,2010,24(5):64.
- [4] 金凤环.瘀血痹胶囊质量标准研究[J].中国医药导报,2008,5(18):13.
- [5] 雷宁,王玲,孙健姿,等.六味参苓颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2012,23(35):3328.
- [6] 王毓杰,索朗其美,顿珠,等.藏药缺氧康胶囊质量标准研究[J].中成药,2007,29(4):607.
- [7] 曹清远,张世波,王鸿度,等.红景天酊质量标准研究[J].中医药学刊,2004,22(1):192.
- [8] 李虹.肾石通颗粒质量标准的研究[J].中国药品标准,2010,11(3):176.
- [9] 王芎,裴香萍,尉亚辉.甘露胶囊的质量标准研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2010,31(6):101.
- [10] 孔燕.暖宫逐瘀丸质量标准研究[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(6):211.
- [11] 刘芳,辛晓晶,柴士伟.化瘀通脉汤剂质量标准的研究[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(6):228.
- [12] 赵新杰,王苏静,夏华玲.滑膜炎片的质量标准研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(4):366.
- [13] 邱晓静,王晓宇.车前子与葶苈子的鉴别[J].海峡药学,2004,16(1):70.
- [14] 李敏,雷庆忠,李桂生,等.香丹滴丸的质量标准研究[J].中国现代中药,2010,12(6):25.
- [15] 林德平,曲永梅.枣仁安神液的质量标准研究[J].吉林医药学院学报,2008,29(5):263.
- [16] 金凤环.瘀血痹胶囊质量标准研究[J].中国医药导报,2008,5(18):13.
- [17] 倪琳,杨锡,郭朝晖,等.妇女养血丸质量标准研究[J].中成药,2008,30(6):872.

(收稿日期:2013-04-26 修回日期:2013-12-09)