

无蔗糖型双参活血通络颗粒的质量标准研究

刘筱琴^{1*}, 杨宪², 张雪³, 唐倩^{4#}, 刘碧林¹, 杨沛¹, 薛莉君¹(1.重庆化工职业学院应用化学系, 重庆 400020; 2.重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331; 3.重庆市中药研究院, 重庆 400065; 4.重庆医药高等专科学校药学院, 重庆 401331)

中图分类号 R283.627;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2559-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.21

摘要 目的:建立无蔗糖型双参活血通络颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对无蔗糖型双参活血通络颗粒中的三七、丹参、五味子进行定性鉴别;采用反相高效液相色谱法测定制剂中丹参酮Ⅱ_A的含量;色谱柱为SHIMADZU C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(75:25, V/V),检测波长为270 nm。结果:TLC图中能清晰检出三七皂苷R₁、丹参酮Ⅱ_A和五味子甲素,鉴别专属性强,阴性对照无干扰。丹参酮Ⅱ_A进样量在0.016 896~0.337 920 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性和重复性试验的RSD<1%;平均加样回收率为99.55%,RSD=0.41%($n=6$)。结论:所建标准可用于无蔗糖型双参活血通络颗粒的质量控制。

关键词 无蔗糖型双参活血通络颗粒;质量标准;丹参酮Ⅱ_A;薄层色谱法;反相高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Sugar-free Shuangshen Huoxue Tongluo Granules

LIU Xiao-qin¹, YANG Xian², ZHANG Xue³, TANG Qian⁴, LIU Bi-lin¹, YANG Pei¹, XUE Li-jun¹(1.Dept. of Applied Chemistry, Chongqing Chemical Industry Vocational College, Chongqing 400020, China; 2.College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 3.Chongqing Academy of TCM, Chongqing 400065, China; 4.College of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish quality standard for Sugar-free shuangshen huoxue tongluo granules. METHODS: TLC was adopted to identify *Panax notoginseng*, *Salvia miltiorrhiza* and *Schisandra chinensis*. The content of tanshinone II_A was determined by RP-HPLC. The determination was performed on SHIMADZU C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)column with mobile phase consisted of methanol-water(75:25, V/V). The detection wave length was set at 270 nm. RESULTS: Notoginsenoside R₁, tanshinone II_A and deoxyschizandrin could be identified clearly. TLC spots were specific without interference from negative control. The linear range of tanshinone II_A was 0.016 896-0.337 920 μg($r=0.999\ 9$) with average recovery of 99.55% (RSD=0.41%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%. CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Sugar-free shuangshen huoxue tongluo granules.

KEYWORDS Sugar-free shuangshen huoxue tongluo granules; Quality standard; Tanshinone II_A; TLC; RP-HPLC

无蔗糖型双参活血通络颗粒由丹参、三七、川芎、刺五加、酸枣仁、降香、党参、地黄、五味子、磁石和牡蛎等11味药组成,适用于气虚血瘀型高脂血症,亦可用于缺血性脑中风恢复期气虚血瘀证的辅助治疗。由于传统的双参活血通络颗粒(注:含蔗糖型由重庆赛诺生物药业股份有限公司生产上市,批文号:国家药品监督管理局批件2002B0727)是以蔗糖、糊精为辅料制得,对老年心血管疾病患者或伴有糖尿病患者有一定的局限性。为了使忌蔗糖患者安全用药,笔者对原处方和工艺进行改进,选用无糖型辅料制成无蔗糖型制剂。为有效控制其质量,本研究采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的三七、丹参、五味子进行定性鉴别,并采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定了制剂中有效成分丹参酮Ⅱ_A的含量。

* 讲师,硕士。研究方向:药品质量检测及新药研发。电话:023-67870625。E-mail: xiaozhin-liu123@hotmail.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:中药制剂分析及新药研发。电话:023-68828999。E-mail: qiantang60460@163.com

1 材料

1.1 仪器

2010A型HPLC仪,包括SPD-10Avp紫外检测器(日本岛津公司);KH-3000型TLC扫描成像系统(上海科哲生化科技有限公司);939型薄层制板器(重庆南岸贝尔德仪器技术厂);ZFQ-85A型旋转蒸发器(上海医械专机厂);水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂);KQ-1000型超声波处理器(昆山市超声仪器有限公司);202-0型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

无蔗糖型双参活血通络颗粒(批号:070201、070202、070203)及缺三七、丹参、五味子的阴性样品均由笔者自制;甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;丹参酮Ⅱ_A(批号:110706-200518)、三七皂苷R₁(批号:0745-200006)、五味子甲素(批号:110764-200107)对照品均由中国食品药品检定研究院提供;硅胶G、硅胶GF₂₅₄(青岛海洋化工厂)。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 三七的TLC鉴别^[1-2] 取本品4 g,加甲醇100 ml,置水浴上回流1 h,放冷,收集上清液;药渣再加甲醇100 ml,回流1 h,收集上清液。合并两次甲醇提取液,水浴蒸干,残渣加水50 ml使溶解,加于预处理好的D101型大孔树脂柱(5 g,1 cm×10 cm)上,先用水洗脱至无色,继以甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,浓缩至约5 ml,作为供试品溶液。取三七皂苷R₁对照品适量,加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。另取缺三七阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照TLC法^[3]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,以氯仿-正丁醇-甲醇-水(20:40:10:20, V/V/V/V)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇液,100℃烘约5 min,日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同的紫红色斑点;阴性对照无干扰。三七的TLC图见图1。

2.1.2 丹参的TLC鉴别^[4-5] 以“2.1.1”项下供试品溶液作为本试验供试品溶液。取丹参酮II_A对照品适量,加三氯甲烷制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。另取缺丹参阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照TLC法^[3]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,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同的红色斑点;阴性对照无干扰。丹参的TLC图见图2。

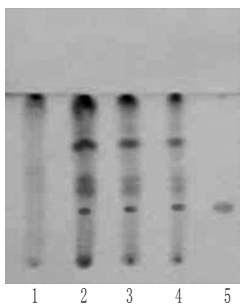


图1 三七的TLC图

1.阴性对照(缺三七);2~4.供试品;5.三七皂苷R₁对照品

Fig 1 TLC of *Panax notoginseng*

1.negative control (without *P. notoginseng*); 2-4.test samples; 5. notoginsenoside R₁ control

2.1.3 五味子的TLC鉴别^[6-8] 取本品4 g,加氯仿30 ml,置水浴上加热回流2 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣以氯仿1 ml溶解,作为供试品溶液。取五味子甲素对照品适量,加氯仿制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。另取缺五味子的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照TLC法^[3]试验,吸取上述3种溶液各5 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)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。五味子的TLC图见图3。

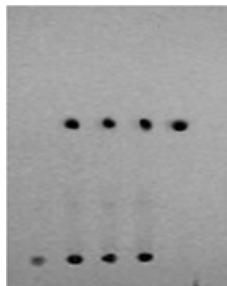


图2 丹参的TLC图

1.阴性对照(缺丹参);2~4.供试品;5.丹参酮II_A对照品

Fig 2 TLC of *Salvia miltiorrhiza*

1.negative control (without *S. miltiorrhiza*); 2-4.test samples; 5.tanshinone II_A control

的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。五味子的TLC图见图3。

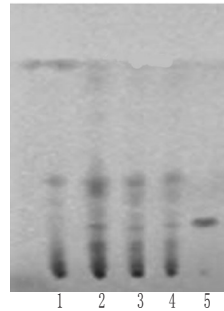


图3 五味子的TLC图

1.阴性对照(缺五味子);2~4.供试品;5.五味子甲素对照品

Fig 3 TLC of *Schisandra chinensis*

1.negative control (without *S. chinensis*); 2-4.test samples; 5.deoxyschizandrin control

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: SHIMADZU C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(75:25, V/V); 检测波长: 270 nm; 流速: 1 ml/min; 进样量: 10 μl。理论板数按丹参酮II_A色谱峰计算应不低于2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮II_A对照品10.56 mg,置50 ml棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品贮备液。精密量取该溶液2 ml,置25 ml棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液(每1 ml含丹参酮II_A16.896 μg)。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品约2 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:50 kHz)20 min,放冷,密塞,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取缺丹参阴性样品适量,按“2.2.3”项下方法制备,即得。

2.2.5 专属性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液适量,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,供试品色谱图中在丹参酮II_A对照品相应保留时间处有相同色谱峰出现;阴性对照图谱无相应色谱峰出现,表明阴性对照无干扰。色谱见图4。

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取对照品贮备液0.2、1.0、2.0、3.0、4.0 ml,各置25 ml棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品进样量(*c*)为横坐标,峰面积积分值(*A*)为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程为 $A = 5.79799 \times 10^{-7}c - 2134$ ($r = 0.9999, n = 5$)。结果表明,丹参酮II_A进样量在0.016 896~0.337 920 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液10 μl,按上述色谱条件重复进样5次,记录丹参酮II_A峰面积。结果, RSD =

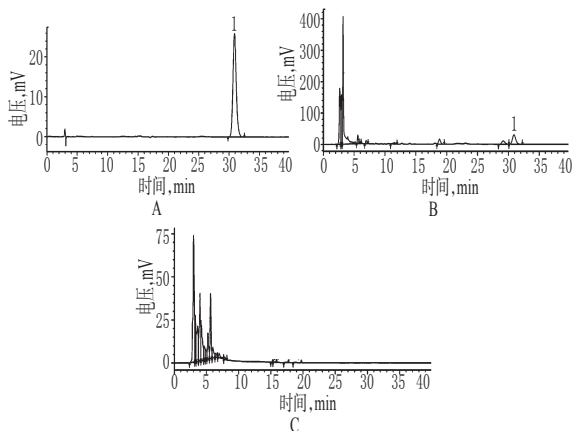


图4 高效液相色谱图

A.丹参酮Ⅱ_A对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.丹参酮Ⅱ_A

Fig 4 HPLC chromatograms

A.tanshinone II_A control; B.test sample; C. negative control; 1.tanshinone II_A

0.11% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:070201)适量,分别于0、1、2、4、6、8 h进样测定,记录丹参酮Ⅱ_A峰面积。结果,RSD=0.36% ($n=6$),表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批样品(批号:070201)适量,共6份,分别按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录丹参酮Ⅱ_A峰面积。结果,样品中丹参酮Ⅱ_A的平均质量分数为0.044 45%,RSD=0.07% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取同一批样品(批号:070201,丹参酮Ⅱ_A质量分数:0.044 45%)适量,研细,精密称定约1 g,共6份,分别置100 ml具塞锥形瓶中,精密加入丹参酮Ⅱ_A对照品贮备液2 ml,再精密加入甲醇48 ml,密塞,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:50 kHz)20 min,放冷,密塞,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,按上述色谱条件进样测定,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($n=6$)

| 编号 | 样品含量, μg | 加入量, μg | 测得量, μg | 回收率, % | \bar{x} , % | RSD, % |
|----|---------------------|--------------------|--------------------|--------|---------------|--------|
| 1 | 483.5 | 422.4 | 903.4 | 99.41 | 99.55 | 0.41 |
| 2 | 483.2 | 422.4 | 902.2 | 99.20 | | |
| 3 | 484.1 | 422.4 | 904.8 | 99.60 | | |
| 4 | 554.7 | 422.4 | 977.9 | 100.19 | | |
| 5 | 488.7 | 422.4 | 907.3 | 99.10 | | |
| 6 | 482.2 | 422.4 | 903.8 | 99.81 | | |

2.2.11 样品含量测定 取3批无蔗糖型双参活血通络颗粒各

适量,分别按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录丹参酮Ⅱ_A峰面积,以峰面积计算样品中丹参酮Ⅱ_A的含量。结果,3批样品(批号:070201、070202、070203)中丹参酮Ⅱ_A的质量分数分别为0.044 45%、0.046 37%、0.046 05%。

3 讨论

本研究仅对处方中的三七、丹参、五味子3味药材进行了TLC鉴别,实际上在预试验中还对方中其他6味药材,即川芎、刺五加、降香、地黄、党参、酸枣仁也进行过TLC鉴别,但由于阴性对照均有干扰,故在本文中省略不提。

笔者根据相关文献^[5,9-10],对无蔗糖型双参活血通络颗粒中的有效成分丹参酮Ⅱ_A的含量测定色谱条件进行了优化,得出文中色谱条件。根据3批产品的含量测定结果,同时考虑到生产工艺及药材质量波动的影响,建议暂定每袋无蔗糖型双参活血通络颗粒中丹参酮Ⅱ_A(C₁₉H₁₈O₃)含量不得少于0.03%。

综上所述,所建标准可用于无蔗糖型双参活血通络颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 张丽增,毕全喜,代云桃,等.二次展开薄层层析法鉴别黄芪与三七的指标成分[J].山西大学学报:自然科学版,2007,30(1):71.
- [2] 罗珍妹,陈惠玲,黄惠琼,等.通脉降脂片质量标准分析[J].海峡药学,2013,25(7):100.
- [3] 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:附录34.
- [4] 杨林伟,张丽娟,宋新波,等.健脑丸质量控制研究[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(5):52.
- [5] 张淑瑜.复方汉防己颗粒中丹参酮Ⅱ_A的成分鉴别和含量测定[J].药学实践杂志,2013,31(3):228.
- [6] 汪芸,严家浪,陶移文.五味子药材薄层色谱鉴别方法的改进[J].北方药学,2013(4):4.
- [7] 陈哲妮,徐振球.五味子配方颗粒的质量控制研究[J].现代中药研究与实践,2013,27(3):58.
- [8] 王慧竹,杨英杰,关铭,等.五味子果实、藤茎及藤皮的木质素成分分析[J].吉林化工学院学报,2011,28(9):32.
- [9] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定丹膝颗粒中丹参酮Ⅱ_A的含量[J].实用药物与临床,2013,16(4):314.
- [10] 严锦贤,陈燕,陈美华,等.HPLC法测定健心颗粒中丹参酮Ⅱ_A的含量[J].海峡药学,2012,24(12):45.

(收稿日期:2014-04-11 修回日期:2014-06-04)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅