

2.6 定量限

以 $S/N=10$ 测得各有机溶剂的定量限, 平行测定 3~5 次, 计算其 RSD, 结果如下: 乙醇: $9.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 9.1%; 异丙醇: $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 7.9%; 乙酸乙酯: $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 5.2%; 甲苯: $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 6.4%。

2.7 样品测定结果

准确称取样品约 0.4 g, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 作为样品溶液。准确量取 3 mL 样品溶液 3 份, 置顶空瓶中, 按“2.1 项下色谱条件进样。按照外标峰面积法计算样品中的有机溶剂残留量, 只检测到异丙醇, 其含量为 0.0873%, RSD 8.1%, 其余三种有机溶剂均未检测到。

3 讨论

四种有机溶剂中, 甲苯沸点较高, 其他三个较为接近, 为在短时间内达到有效的分离, 采用程序升温法。

国际人用药品注册技术协调大会 (ICH) 和药典都规定, 甲苯为第二类残留溶剂, 限度为 0.089%, 乙醇、乙酸乙酯和异丙醇属第三类残留溶剂, 限度均为 0.5%^[3-4]。本实验测得样品中残留有机溶剂的最低检出量分别为乙醇 0.0105%, 乙

酸乙酯 0.0021%, 甲苯 0.0011%, 异丙醇含量为 0.0873%, 均符合要求。因此, 本实验建立的方法可以用来控制拉米夫定中有机溶剂残留量。

REFERENCES

- [1] SHAO L H, MA L X, SUN S A, *et al* Determination of Lamivudine Concentration in Human Serum by HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2002, 22(1): 53-55.
- [2] ZHENG Q M, LIX M, *et al* Establishment of LC-MS/MS Method for Determination of Lamivudine[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2005, 25(1): 73-75.
- [3] Ch P(2005) Vol (中国药典 2005 年版, 二部) [S]. 2005: 附录 54-57.
- [4] KOJIMA S Impurities: Guideline for Residual Solvents (Q3C): proceedings of the 4th International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals, Brussels, Belgium, July 16-18, 1997 [C]. <http://www.ich.org/>.

收稿日期: 2007-07-02

心脑血管胶囊的定性定量分析

魏清¹, 龚道芬², 康红英² (1. 三峡大学第一临床医学院, 湖北省宜昌市中心医院, 湖北 宜昌 443003; 2. 湖北省宜昌市药品检验所, 湖北宜昌 4433003)

摘要: 目的 快速鉴别心脑血管胶囊中的丹参、赤芍、地龙、川芎、葛根五味药材和测定制剂中芍药苷含量。方法 采用薄层色谱法对方剂中的丹参、赤芍、地龙、川芎、葛根进行鉴别; 用 HPLC 测定制剂中芍药苷的含量。HPLC 采用 C_{18} 柱, 以乙腈-水 (17:83) 为流动相, 检测波长: 230 nm, 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果 薄层色谱法均鉴别出制剂和各自药材的特征斑点, 而空白对照液无此斑点。高效液相色谱方法的建立, 结果在 $115.5 \sim 577.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r=0.9999$, $n=5$), 平均回收率为 100.14%, RSD=0.1% ($n=4$)。结论 该方法简便、准确、重复性好、精密度高, 可用于心脑血管胶囊定性定量分析。

关键词: 心脑血管胶囊; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 鉴别; 含量测定

中图分类号: R286.24; R917.101 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)04-0327-04

Qualitative and Quantitative Analysis of Xinnaokang Capsule

WEI Qing¹, GONG Dao-feng², KANG Hong-ying² (1. Department of Pharmacy, the First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang Centre Peoples Hospital, Yichang 443003, China; 2. Laboratory for the Control of Drugs of Yichang, Yichang 443003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To quickly identify the salviae miltiorrhiae, paeoniae rubra, pheretima asiatica, rhizoma, puerariae of the Xinnaokang capsule and determine the content of the peoniflorin. **METHODS** The radix salviae miltiorrhiae, paeoniae rubra, pheretima asiatica, rhizoma, puerariae were identified with thin layer chromatography (TLC), the content of the peoniflorin was determined by HPLC. C_{18} column was used in HPLC, taking acetonitrile-Water (17:83) as the mobile phase; 230 nm was the detection wavelength and the flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. **RESULTS** The characteristic speck of preparation was identified with TLC and was not observed in the thin layer chromatogram of the blank control. HPLC method was established and the results showed there was a good linear relationship in range $115.5 \sim 577.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$, $n=5$). The average recovery rate was 100.14%, RSD was

作者简介: 魏清, 女, 主管药师 Tel: 13986766681 E-mail: zhouzhengtao@126.com

0.1% ($n=4$). **CONCLUSION** The method is simple and accurate with good reproducibility and high precision. It can be applied in the qualitative and quantitative analysis of Xinnaokang capsule.

KEY WORDS: Xinnaokang capsule; TLC; HPLC; identify; content determination

心脑血管胶囊由丹参、赤芍、地龙、川芎等 16 味中药组成, 具有活血化瘀, 通窍止痛, 扩张血管, 增加冠状动脉血流量的功效, 用于冠心病, 心绞痛及动脉硬化症的治疗, 有很好的疗效。是《卫生部药品标准·中药成方制剂》第十三册收载的品种^[1], 原标准仅有性状和显微特征, 有关心脑血管胶囊的质量控制及质量标准研究, 国内外文献少见报道。为有效控制药品质量, 确保该制剂的疗效, 笔者建立了丹参、赤芍、葛根、川芎、地龙的薄层色谱鉴别方法; 以方中主药赤芍的有效成分芍药苷为定量控制指标, 采用 HPLC 测定心脑血管胶囊中芍药苷的含量, 为更好地控制该制剂的质量提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪; METTLER AL 104 电子分析天平; SB3200 超声清洗器。

1.2 材料

硅胶 G 由青岛海洋化工厂生产。丹参酮_A 对照品 (批号: 110766-200417); 芍药苷对照品 (批号: 0736-200014); 葛根素对照品 (批号: 752-8901); 川芎对照药材 (批号: 918-9001); 地龙对照药材 (批号: 987-9401), 以上对照品及对照药材均由中国生物制品检定所提供。流动相所用的试剂为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。心脑血管胶囊 3 批 (通化正和药业有限公司, 批号: 060301; 长春海外制药集团有限公司, 批号: 060405; 长春银诺克药业有限公司, 批号: 060102) 为市售品, 规格为 0.25 g·粒⁻¹。阴性样品由本所中药室检定合格的药材按标准制成。

2 定性鉴别^[2]

2.1 丹参提取物 (丹参酮_A) 的薄层鉴别

取本品 4 粒的内容物, 加乙醚 15 mL, 超声处理 5 min, 滤过, 滤液挥干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使其溶解, 作为供试品溶液。另取丹参酮_A 对照品, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验, 吸取供试品溶液 10 μL, 对照品溶液 4 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-乙酸乙酯 (19:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干。供试品色谱中, 在与丹参酮_A 对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 而阴性对照品在此无干扰, 结果见图 1。

2.2 赤芍 (芍药苷) 的薄层鉴别

取本品 8 粒的内容物, 加乙醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使其溶解, 用乙醚 20 mL 提取, 弃乙醚液, 再用水饱和的正丁醇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加水 5 mL 溶解, 通过 D101 型大孔吸附树脂柱 (内径 1 cm, 柱高 15 cm), 以水 20 mL 洗脱, 弃去水液, 再用 40% 乙醇 20 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加丙酮 1 mL 使其溶解, 作为供试品溶液。另取芍药苷对照品, 加乙醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验, 吸取上述溶液各 5 μL 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯

甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (40:5:10:0.2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 105℃ 加热至斑点显色清晰。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, 空白样品无干扰, 结果见图 2。

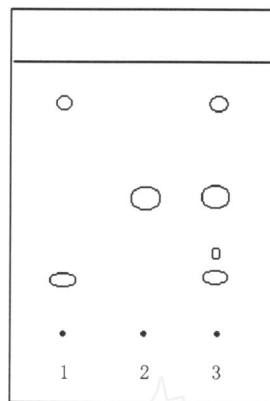


图 1 丹参薄层色谱图

1 - 丹参空白对照; 2 - 丹参酮_A 对照品; 3 - 样品

Fig 1 Thin layer chromatogram of salviae miltiorrhiae

1 - blank control; 2 - salviae miltiorrhiae control; 3 - sample

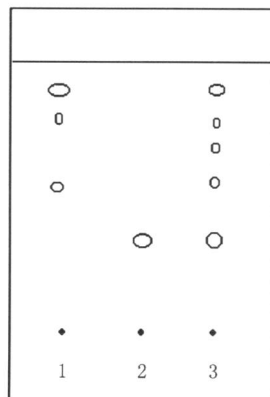


图 2 赤芍薄层色谱

1 - 芍药苷空白对照; 2 - 芍药苷对照品; 3 - 样品

Fig 2 Thin layer chromatogram of paeoniae rubra

1 - blank control; 2 - peoniflorin control; 3 - sample

2.3 葛根 (葛根素) 的薄层鉴别

取本品 2 粒的内容物, 加乙酸乙酯 30 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使其溶解, 作为供试品溶液。另取葛根素对照品, 加甲醇制成 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验, 吸取上述溶液各 5 μL 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水 (28:10:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 空白样品无干扰, 结果见图 3。

2.4 川芎的薄层鉴别

取本品 4 粒的内容物, 加乙醚 15 mL, 超声处理 15 min,

滤过,滤液作为供试品溶液。另取川芎对照药材 1 g,加乙醇 10 mL,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述溶液各 5 μ L 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的亮蓝色斑点,空白样品无干扰,结果见图 4。

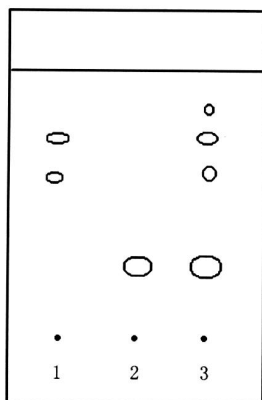


图 3 葛根薄层色谱

1 - 葛根空白对照;2 - 葛根素对照品;3 - 样品

Fig 3 Thin layer chromatogram of puerariae

1 - puerariae blank control;2 - puerarin control;3 - sample

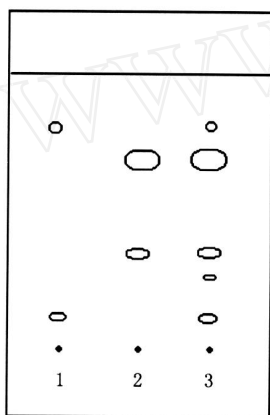


图 4 川芎薄层色谱

1 - 川芎空白对照;2 - 川芎对照药材;3 - 样品

Fig 4 Thin layer chromatogram of rhizoma

1 - rhizome blank control;2 - rhizome control substance;3 - sample

2.5 地龙的薄层鉴别

取本品 4 粒的内容物,加三氯甲烷 20 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液置水浴上蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 使其溶解,作为供试品溶液。另取地龙对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液,照薄层色谱法试验,吸取上述溶液各 5 μ L 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-丙酮(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。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,空白样品无干扰,结果见图 5。

3 定量分析

3.1 色谱条件

中国现代应用药学杂志 2008 年 8 月第 25 卷第 4 期

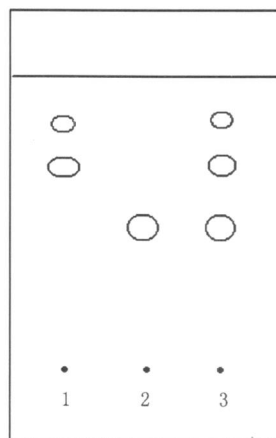


图 5 地龙薄层色谱

1 - 地龙空白对照;2 - 地龙对照药材;3 - 样品

Fig 5 Thin layer chromatogram of pheretima asiatica

1 - pheretima asiatica blank control;2 - pheretima asiatica control substance;3 - sample

色谱柱:NUCLEOSL C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 10 μ m);流动相:乙腈-水(17:83);检测波长:230 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL \cdot min $^{-1}$;进样量:10 μ L。

3.2 溶液的制备与测定^[3-5]

3.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,加稀乙醇制成每 1 mL 含 40 μ g 的溶液,作为对照品溶液。

3.2.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的内容物约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 30 kHz) 30 min,放冷,再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,摇匀,过滤,再精密量取续滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用稀乙醇稀释至刻度,摇匀,即的。

3.2.3 空白对照溶液的制备 以相同的处方比例制得不含赤芍的空白样品。按供试品溶液的制备项下的方法制成空白对照溶液。

3.2.4 测定 分别精密吸取上述三种溶液各 10 μ L,按上述色谱条件分别测定,见图 6。结果表明供试品色谱图中呈现与芍药苷对照品保留时间相应的色谱峰,而空白对照无干扰。

3.3 线性关系考察

精密称取芍药苷对照品 23.1 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备溶液 2.5 mL,置 10 mL 量瓶中,加稀乙醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液 5, 10, 15, 20, 25 μ L 进样测定,记录峰面积。以浓度(C)对峰面积(A)进行线性回归,回归方程为 $A = 310.18C - 48.5$, $r = 0.9999$ ($n = 5$),结果表明芍药苷在 115.5 ~ 577.5 μ g \cdot mL $^{-1}$ 内线性关系良好。

3.4 重复进样精密度试验

精密吸取对照品溶液各 10 μ L,连续进样 5 次,所得峰面积值分别为 642, 641, 638, 646, 641, 结果峰面积平均值为 642, RSD = 0.5% ($n = 5$)。

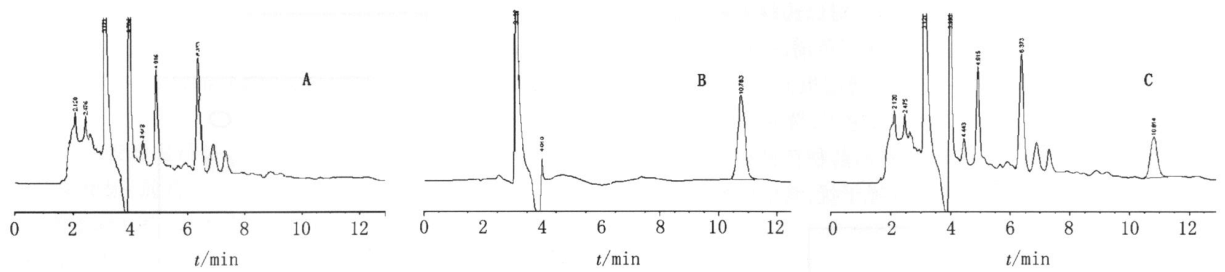


图 6 HPLC 色谱图

A - 空白对照; B - 对照品; C - 供试品

Fig 6 HPLC chromatograms

A - blank control; B - control; C - sample

3.5 稳定性试验

精密量取上述供试品溶液 10 μL , 于 8 h 后测定峰面积, 结果峰面积几乎不变, 表明供试品溶液至少在 8 h 内稳定。

3.6 重复性试验

分别精密量取同一样品 (通化某药业有限公司, 批号: 060301) 5 份, 按供试品制备项下进行提取、制备、测定, 测得含量平均值为 0.75 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$, $\text{RSD} = 1.9\%$ ($n = 5$); 同法测得长春海外制药集团有限公 (批号: 060405) 5 份, 测得含量平均值为 0.67 $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$, $\text{RSD} = 1.5\%$ ($n = 5$)。

3.7 加样回收率试验

精密量取同一已知含量样品 (长春某药业有限公司, 批号: 060102) 约 0.5, 0.8, 1.0, 1.2 g, 共 4 份, 分别精密加入上述对照品贮备液 ($0.924 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 照供试品制备项下进行提取、制备, 并按上述色谱条件测定, 结果见表 1, 平均回收率为 100.2%, $\text{RSD} = 0.1\%$ ($n = 4$)。

表 1 心脑血管胶囊加样回收率试验结果 ($n = 4$)

Tab 1 Test results of recovery of Xinnaokang Capsule ($n = 4$)

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.563	1.848	2.415	100.2		
2	0.899	2.772	3.680	100.3	100.2	0.1
3	1.135	3.696	4.835	100.1		
4	1.349	4.620	5.972	100.1		

3.8 样品测定

按上述测定方法对 3 个厂家样品中芍药苷含量进行测定, 结果见表 2。

表 2 心脑血管胶囊中芍药苷含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of peoniflorin in Xinnaokang Capsule

批号	含量 / $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$	RSD /%
060301	0.75	1.9
060405	0.67	1.5
060102	0.28	1.4

4 讨论

4.1 本实验中均采用了对照品、对照药材及阴性对照试验, 结果表明, 各检出成分不受处方中其他群药的干扰, 方法简

便、快速、专属性强、重复性好。

4.2 为保证药品的内在质量, 心脑血管胶囊的质量标准应增加中药材成分的鉴别, 以确保临床疗效。

4.3 取芍药苷对照品进行紫外扫描 (200 ~ 400 nm), 结果在 230.0 nm 有最大吸收, 试验选择 230 nm 作为检测波长。

4.4 本实验参照相关中药成方制剂中芍药苷的含量测定方法, 赤芍是心脑血管胶囊的主药之一, 芍药苷是赤芍中的主要成分, 具有多种药理作用, 建立测定芍药苷的高效液相色谱法, 有利于控制该产品的内在质量。

4.5 样品色谱的分离效果好, 笔者对提取的时间 (10, 30, 60 min) 进行了考察, 结果表明: 超声处理 30 min 即可提取完全。

4.6 由表 2 可见不同厂家的样品中芍药苷的含量差异大, 而且目前没有一个统一的限度标准, 笔者建议今后在修改标准时考虑增加心脑血管胶囊的含量测定项, 以确保药品质量, 保证人民用药安全有效。

4.7 方法学研究表明, 本实验报道的测定方法操作简单, 结果准确, 重复性好, 空白无干扰, 可作为心脑血管胶囊质量标准含量测定方法。

REFERENCES

- [1] The traditional chinese medicine criterion of Ministry of Health volumn XIII(卫生部药品标准中药成方制剂第十三册) [S]. 1997: 47.
- [2] Ch P(2005) Vol (中国药典 2005 年版, 一部) [S]. 2005: appendix 33.
- [3] WANG X J. Application of HPLC in the Chinese medicine study (高效液相色谱在中药研究中的应用) [M]. haerbin: Heilongjiang science and technology press, 1994: 71-74.
- [4] XU D H, ZHU Y H, GUO H Q. Content determination of paneoniflorin in the fukang capsule [J]. Shanxi J Tradit Chin Med (陕西中医), 2003, 24 (10): 937-939.
- [5] FENG Y M, YE L M, YANG J H. Content determination of paneoniflorin in the Handanle capsule [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2000, 31 (5): 345-346.

收稿日期: 2007-04-03