

• 医院制剂 •

心灵丸质量控制方法研究

林晓辉, 张雪原, 陈洁莹, 朱吉士 (潮州市药品检验所, 广东 潮州 521000)

[摘要] 目的: 建立心灵丸的质量标准。方法: 采用薄层色谱(TLC)法鉴别处方中冰片、人参、三七、人工麝香、人工牛黄; 用高效液相色谱(HPLC)法测定心灵丸中蟾酥(华蟾酥毒基和脂蟾毒配基)的含量, 色谱柱为 Hypersil ODS2(5 μm, 4.6 mm × 200 mm), 流动相为乙腈-0.5% 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 3.2)(45:55), 检测波长为 296 nm, 柱温 30 °C。结果: 华蟾酥毒基在 0.9~22.5 mg·L⁻¹ 的范围内, 脂蟾毒配基在 0.9~22.2 mg·L⁻¹ 的范围内呈良好线性关系, 心灵丸中华蟾酥毒基平均回收率为 99.79% (RSD=1.6%, n=9), 脂蟾毒配基平均回收率为 100.32% (RSD=1.7%, n=9)。结论: 所建立的 TLC 和 HPLC 方法专属性强, 重复性好, 可用于心灵丸的质量控制。

[关键词] 心灵丸 华蟾酥毒基; 脂蟾毒配基; 高效液相色谱法; 薄层色谱法

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5213(2008)21-1874-03

心灵丸原标准收载于中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十八册(保护品种分册二), 标准编号: WS₅-B3378-98, 具有活血化瘀, 益气通脉, 宁心安神功效。用于胸痹心痛, 心悸气短, 头痛眩晕等症, 以及心绞痛、心律失常及伴有高血压病者。根据国家药典委员会下达的国家药品标准提高行动计划的任务, 修订了心灵丸的质量标准, 增订了冰片、人参、三七的薄层色谱鉴别和蟾酥的含量测定(高效液相色谱法), 并删去麝香的显微特征及蟾酥的薄层色谱鉴别。提高后的质量标准方法操作简便、结果准确, 适合作为法定质量标准。

1 材料

Waters 600E 液相色谱仪(包括 Waters 2996 二极管阵列检测器); Shimadzu LC-10AT 液相色谱仪; 色谱柱(Elite Hypersil ODS2, 5 μm, 4.6 mm × 200 mm; DIKMA Diamonsil C₁₈, 5 μm, 200 mm × 4.6 mm); 心灵丸(广东宏兴集团股份有限公司宏兴制药厂, 批号 051010, 051111, 051212); 心灵丸蟾酥阴性制剂(广东宏兴集团股份有限公司宏兴制药厂); 华蟾酥毒基对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110803-200504, 供含量测定用); 脂蟾毒配基对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0718-9306, 供含量测定用); 人工麝香对照药材(工作对照药材, 由广东宏兴集团股份有限公司宏兴制药厂提供; 北京联馨药业有限公司生产); 胆酸(中国药品生物制品检定所, 批号 078-9211); 猪去氧胆酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 087-9406); 熊去氧胆酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0755-9003); 冰片对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 743-8902); 人参对照药材(中国

药品生物制品检定所, 批号 120917-200507); 三七总皂苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 870-200001); 三七皂苷 R₁ 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110745-200312); 人参皂苷 Rb₁(中国药品生物制品检定所, 批号 110704-200217)、人参皂苷 Rg₁ 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0703-200221); 乙腈为色谱纯(Merck); 甲醇、磷酸、磷酸二氢钾为分析纯; 水为纯化水。

2 薄层鉴别

2.1 人工麝香 取本品 60 丸, 研细, 加乙醚 20 mL, 超声处理(功率 150 W, 频率 55 KHz) 10 min, 浸渍 30 min, 时时振摇, 倾取乙醚液, 挥干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺人工麝香的阴性样品 0.6 g, 同法制成阴性对照溶液。另取人工麝香对照药材 10 mg, 同法制成对照药材溶液。分别吸取供试品溶液、对照药材溶液和阴性对照溶液各 5 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-醋酸乙酯(7:3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 香草醛硫酸溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的主斑点, 阴性对照无相应的斑点, 见图 1。

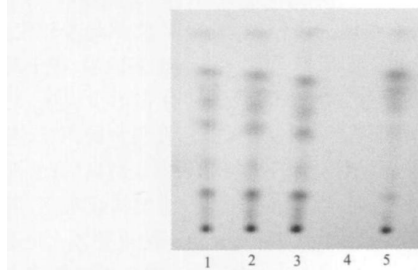


图 1 人工麝香薄层色谱鉴别

1-心灵丸(批号 051010); 2-心灵丸(批号 051111); 3-心灵丸(批号 051212); 4-人工麝香对照药材; 5-人工麝香阴性对照

Fig 1 TLC chromatogram of Moschus Artifacts

1-Xinling pills (051010); 2-Xinling pills (051111); 3-Xinling pills (051212); 4-Moschus Artifacts crude drug; 5-negative sample

2.2 人工牛黄 取本品 10 丸, 研细, 加甲醇 10 mL, 置水浴上回流 1 h, 滤过, 滤液挥去甲醇, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺人工牛黄和熊胆的阴性样品 0.2 g, 同法制成阴性对照溶液。另取胆酸、猪去氧胆酸对照品, 分别加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。分别吸取上述 4 种溶液各 5 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-醋酸乙酯-醋酸-甲醇(20:25:2:3) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 磷钼酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无相应的荧光斑点, 见图 2。

2.3 熊胆 取人工牛黄鉴别下的供试品溶液, 挥去甲醇, 加 20% 氢氧化钠溶液 5 mL, 置水浴中加热水解 8 h, 放冷, 加盐酸调节 pH 1~2, 加水 10 mL, 摇匀, 用乙醚提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 挥去乙醚, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺熊胆的阴性样品 0.2 g, 同法制成阴性对照溶液。另取熊去氧胆酸对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液各 5

1 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-醋酸乙酯-醋酸-甲醇(20:25:2:3)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 磷钼酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视, 见图 3。

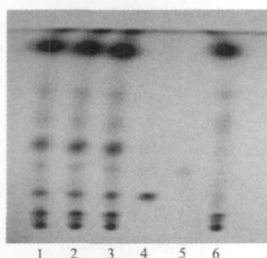


图 2 人工牛黄薄层色谱鉴别

1-心灵丸(批号 051010); 2-心灵丸(批号 051111); 3-心灵丸(批号 051212); 4-胆酸对照品; 5-猪去氧胆酸对照品; 6-人工牛黄和熊胆双阴性对照

Fig 2 TLC chromatogram of Calculus Bovis Artifacts

1-Xinling pills (051010); 2-Xinling pills (051111); 3-Xinling pills (051212); 4-cholic acid reference substance; 5-hyodeoxycholic acid reference substance; 6-negative sample

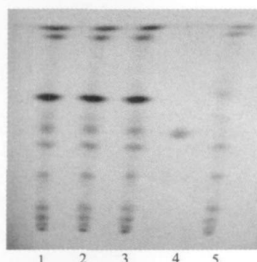


图 3 熊胆薄层色谱鉴别

1-心灵丸(批号 051010); 2-心灵丸(批号 051111); 3-心灵丸(批号 051212); 4-熊去氧胆酸对照品; 5-熊胆阴性对照

Fig 3 TLC chromatogram of bear gall

1-Xinling pills (051010); 2-Xinling pills (051111); 3-Xinling pills (051212); 4-ursodeoxycholic acid reference substance; 5-negative sample

2.4 冰片 取本品 20 丸, 研细, 加乙醚 10 mL, 超声 5 min, 滤过, 药渣备用, 滤液挥干, 残渣加醋酸乙酯 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取冰片的阴性样品 0.4 g, 同法制成阴性对照溶液。另取冰片对照品, 加醋酸乙酯制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液各 5 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-醋酸乙酯(6:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 香草醛硫酸溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 见图 4。

2.5 人参、三七 取冰片鉴别项下的药渣, 加甲醇 25 mL, 加热回流 15 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 25 mL, 微热使溶解, 加水饱和的正丁醇 25 mL, 振摇提取, 取正丁醇提取液, 用氨试液 25 mL 洗涤, 弃去氨溶液, 再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次, 每次 25 mL, 正丁醇液浓缩至干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺人参、三七的阴性样品 0.4 g, 同法制成阴性对照溶液。另取人参对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液; 取三七总皂苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 15 mg 的溶液, 作为对照品溶液(1)。再取三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 对照品, 加甲醇制成每 1 mL 各含 2 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液(2)。分别吸取上述 5 种溶

液各 1 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10) 10 °C 以下放置分层的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 见图 5。

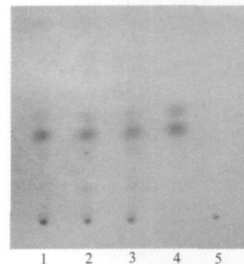


图 4 冰片薄层色谱鉴别

1-心灵丸(批号 051010); 2-心灵丸(批号 051111); 3-心灵丸(批号 051212); 4-冰片对照品; 5-冰片阴性对照

Fig 4 TLC chromatogram of (±) borneol

1-Xinling pills (051010); 2-Xinling pills (051111); 3-Xinling pills (051212); 4-(±) borneol reference substance; 5-negative sample

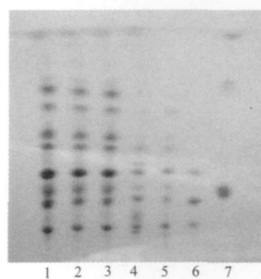


图 5 人参、三七薄层色谱鉴别

1-心灵丸(批号 051010); 2-心灵丸(批号 051111); 3-心灵丸(批号 051212); 4-人参对照药材; 5-三七总皂苷对照品; 6-三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 对照品; 7-人参和三七双阴性对照

Fig 5 TLC chromatogram of ginseng and pseudoginseng

1-Xinling pills (051010); 2-Xinling pills (051111); 3-Xinling pills (051212); 4-ginseng reference; 5-notoginsenoside reference; 6-notoginsenoside R₁ and ginsenoside Rb₁, Rg₁ reference substance; 7-negative sample

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: 依利特 Hypersil ODS2 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 3.2)(45:55); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 296 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL^[1]。在此色谱条件下, 华蟾酥毒基峰的保留时间为 10.331 min, 脂蟾毒配基峰的保留时间为 11.231 min。

3.2 线性范围 精密称取华蟾酥毒基对照品和脂蟾毒配基对照品, 加甲醇制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的对照品贮备液, 精密量取 1 mL, 分别置 100, 50, 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取对照品母液 2, 3, 4, 5, 6 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 均作为对照品溶液, 分别进样 20 μL。以峰面积(A)对浓度(C)进行回归, 求得华蟾酥毒基的回归方程为 A = 16.034C - 1027.7, r = 0.999 9, 线性范围 0.9~22.5 mg·L⁻¹; 脂蟾毒配基的回归方程为 A = 16.232C - 755.32, r = 0.999 9, 线性范围 0.9~22.2 mg·L⁻¹。

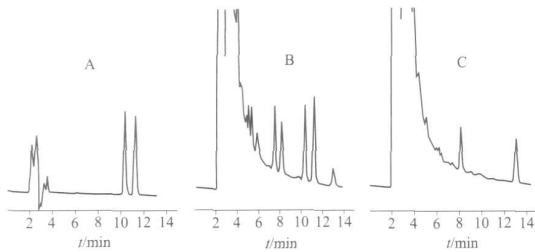


图 6 心灵丸高效液相色谱图
A. 华蟾酥毒基对照品和脂蟾毒配基对照品; B. 供试品; C. 蟾酥阴性对照

Fig 6 HPLC chromatogram of Xinling pills
A. cinobufagin and bufogenin reference substance; B. sample; C. negative sample

表 1 华蟾酥毒基回收率试验测定结果 (n=9)

Tab 1 Determination result of the recovery of cinobufagin (n=9)

名称	取样量 /g	供试品中华蟾酥毒基的量/mg	加入量 /mg	平均峰面积	测得量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
对照品	8.640 μg·mL ⁻¹			146.648					
供试品 1	0.0848	0.0496	0.0503	66.810	0.0984	0.0488	97.02		
供试品 2	0.0825	0.0482	0.0503	66.278	0.0976	0.0494	98.21		
供试品 3	0.0821	0.0480	0.0503	66.243	0.0976	0.0496	98.61		
供试品 4	0.1760	0.1029	0.1006	138.532	0.2040	0.1011	100.50		
供试品 5	0.1763	0.1031	0.1006	139.467	0.2054	0.1023	101.69	99.79	1.6
供试品 6	0.1715	0.1003	0.1006	136.486	0.2010	0.1007	100.10		
供试品 7	0.2306	0.1348	0.1509	193.608	0.2852	0.1504	99.67		
供试品 8	0.2324	0.1359	0.1509	196.224	0.2890	0.1531	101.46		
供试品 9	0.2345	0.1371	0.1509	196.443	0.2893	0.1522	100.86		

表 2 脂蟾毒配基回收率试验测定结果 (n=9)

Tab 2 Determination result of the recovery of recibufogenin (n=9)

名称	供试品取样量/g	供试品中脂蟾毒配基的量/mg	加入量 /mg	平均峰面积	测得量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
对照品	6.704 μg·mL ⁻¹			140.797					
供试品 1	0.0848	0.0614	0.0623	103.531	0.1232	0.0618	99.20		
供试品 2	0.0825	0.0597	0.0623	103.949	0.1237	0.0640	102.73		
供试品 3	0.0821	0.0594	0.0623	103.620	0.1233	0.0639	102.57		
供试品 4	0.1760	0.1274	0.1246	210.704	0.2508	0.1234	99.04		
供试品 5	0.1763	0.1276	0.1246	209.312	0.2492	0.1216	97.59	100.32	1.7
供试品 6	0.1715	0.1241	0.1246	208.707	0.2484	0.1243	99.76		
供试品 7	0.2306	0.1669	0.1869	297.768	0.3545	0.1876	100.37		
供试品 8	0.2324	0.1682	0.1869	300.533	0.3577	0.1895	101.39		
供试品 9	0.2345	0.1697	0.1869	299.870	0.3570	0.1873	100.21		

3.6 样品测定 取本品 60 丸,精密称定,研细,取约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定,密塞,超声处理(功率 150 W,频率 55 KHz) 60 min,放冷,再称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,计算含量。结果 3 批样品的含量按华蟾酥毒基(C₂₆H₃₄O₆)和脂蟾毒配基(C₂₄H₃₂O₄)总量计分别为 29.91, 27.16, 28.9 μg/丸。

4 讨论

由于中检所没有人工麝香对照品,故人工麝香的薄层鉴别采用工作对照品,此工作对照品已经检验。

薄层色谱展开前预饱和 15 min 以及控制相对湿度(65%以下)能获得更好的结果。

冰片 TLC 鉴别曾参考文献[1]的色谱条件进行试验,因苯的毒性大,故用环己烷替代,效果理想;三七 TLC 鉴别曾参考文献[1-2]进行试验,经比较,使用本文的色谱条件分离效果最好。

3.3 精密度与重复性试验 取一对照品溶液,重复进样 6 次,华蟾酥毒基峰面积的 RSD 为 0.59%;脂蟾毒配基对照品峰面积的 RSD 为 0.62%。

3.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液,室温放置,于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 分别进样 20 μL,按上述色谱条件分析,华蟾酥毒基峰面积的 RSD 为 0.63%,脂蟾毒配基峰面积的 RSD 为 0.72%,表明华蟾酥毒基和脂蟾毒配基溶液在 24 h 内稳定。

3.5 回收率试验 精密称取已知含量的样品,精密加入对照品贮备液,按“样品测定”项下操作测得回收率,见表 1 和 2。

华蟾酥毒基与脂蟾毒配基的甲醇溶液在常温下及光照下不甚稳定,采用棕色瓶并置冰箱里冷藏能明显延长稳定期,减少降解杂峰的产生。

实验时对提取溶剂、提取时间及提取方式均进行了优化试验,结果显示,用甲醇提取效果优于 50% 甲醇和乙醇,加热回流提取(60 min)效果与超声提取(60 min)比较差异无显著性,故选择甲醇超声提取 60 min 作为本实验的提取条件。

在研究蟾酥 HPLC 含量测定时曾参考文献[1, 3]的色谱条件进行试验,但分离效果均不理想,经反复试验采用本文的方法。

参考文献:

[1] 中国药典,一部[S]. 2005: 265-266, 527-528, 664-665.
[2] 陆国红,沈金芳,李肖玲,等. 利心舒胶囊质量标准的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(1): 90-91.
[3] 李淑盈,董海林,梁晓,等. HPLC 测定心可宁胶囊中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量[J]. 中成药, 2006, 28(6): 812-815.

[收稿日期] 2008-01-12