

胶囊为丹参脂溶性提取物投料,无法用丹参中丹参酮Ⅱ_A的含量折算,故参照中国药典中药质量标准制定技术要求中中药材含测限度制定原则,采用平均值下浮20%,暂定限度分别为:隐丹参酮1.85 mg/g(0.56 mg/粒)、丹参酮Ⅱ_A2.67 mg/g(0.80 mg/粒)、丹参酮Ⅰ2.07 mg/g(0.62 mg/粒)。根据暂定的限度,隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A和丹参酮Ⅰ均达标的样品共20批,占总抽检批次的16%。

4.3 不同企业产品中丹参脂溶性成分测定结果及分析

测定结果显示同一企业的不同批号产品测定结果差异较小,但不同企业产品的差异极大,丹参酮Ⅱ_A最低含量为0.02 mg/g,最高达13.96 mg/g,近700倍;隐丹参酮最低含量为0.005 mg/g,最高达9.91 mg/g,近2000倍;丹参酮Ⅰ最低含量为0.03 mg/g,最高达13.48 mg/g,近450倍。

不同企业产品的差异极大的原因可能与各企业的生产工艺有关,原标准所附丹参提取物的生产工艺为水煮、烘干、粉碎、醇提、浓缩、水沉、取沉淀物干燥,即得。其中药材的水煮、干燥等步骤工艺参数不

明确。部分企业反映,药材的水煮、干燥步骤在实际操作中耗时较长,易造成丹参酮类成分的损失。

本次评价性抽验发现,厂家16丹参酮Ⅰ、丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮的平均含量高于其他厂家,把厂家16与厂家14的平均含量进行 t 检验。按 $\alpha=0.05$ 拒绝 H_0 ,从样本均数看,可认为厂家16明显高于其他厂家,具有统计学意义^[5]。

为避免市场流通的丹参舒心胶囊不同厂家的质量差异较大问题,建议由厂家16牵头,各生产企业通过实验考察,细化工艺参数,量化成品指标,从而有效控制丹参舒心胶囊的质量。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005:52.
- [2] 宋敏,杭太俊,张正行.丹参脂溶性成分指纹图谱标准的对照品对照法研究[J].药物分析杂志,2007,27(1):8.
- [3] 武为宝,唐军.UPLC法测定丹参中5种脂溶性成分的含量[J].药物分析杂志,2009,29(5):827.
- [4] 许永,赵成.不同提取方法对丹参中丹酚B含量测定的影响[J].安徽医药,2009,12(10):1193.
- [5] 张文彤.SPSS 11 统计分析教程(基础篇)[M].北京:北京希望电子出版社,2002:12.

复方骆驼蓬子软膏质量标准研究

李炜¹, 王海亮^{2*}, 张静赞¹

(1. 西安天健医药科学研究所, 陕西 西安 710075; 2. 西安碑林药业股份有限公司, 陕西 西安 710048)

关键词: 复方骆驼蓬子软膏; 骆驼蓬子; 阿托品; 东莨菪碱; 秋水仙碱; TLC; HPLC

摘要: 目的: 提高复方骆驼蓬子软膏(骆驼蓬子、天仙子、秋水仙)质量标准。方法: 采用TLC法对制剂中的骆驼蓬子、天仙子进行了鉴别。采用HPLC法, Phenomenex Luna C₁₈(5 μm, 250 mm × 4.6 mm ID)色谱柱, 东莨菪碱和阿托品以甲醇-水(20:80, 水中含0.02 mol/L 醋酸钠、0.2 mL/L 三乙胺、4 mL/L 四氢呋喃, 用冰醋酸调pH至6.0)为流动相, 检测波长为210 nm; 秋水仙碱以甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(45:55)为流动相, 检测波长为350 nm。结果: 阿托品、东莨菪碱和秋水仙碱的线性范围分别为0.131 6~1.316 μg($r=0.999 8$)、0.063 6~0.636 μg($r=0.999 8$)和0.081 76~0.817 6 μg($r=0.999 6$), 平均回收率分别为97.6%、97.7%和96.3%。结论: 定性定量方法简便、准确、专属性强、重现性好。提高后的质量标准可更有效的控制本品质量。

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-4528(2011)01-0069-05

Quality standard for Compound Luotuopengzi Ointments

LI Wei¹, WANG Hai-liang^{2*}, ZHANG Jing-yun¹

(1. Xi'an Tianjian Institute of Pharmaceutical Science, Xi'an 710075, China; 2. Xi'an Beilin Pharmaceutical Co., Ltd, Xi'an 710048, China)

收稿日期: 2010-07-26

作者简介: 李炜(1975-)男, 高级工程师, 从事中药新药研发工作。Tel: 13992813615 E-mail: xinyao21@126.com

* 通讯作者: 王海亮, 研究方向: 中药新药研发工作。E-mail: whl829@163.com

KEY WORDS: Compound Luotuopengzi Ointments; *Semen Pegani*; atropine; scopolamine; colchicine; TLC; HPLC

ABSTRACT: **AIM:** To improve the quality standard for Compound Luotuopengzi Ointments (*Semen Pegani*, *Semen Hyoscyami*, *Colchicum autumnale*). **METHODS:** *Semen Pegani* and *Semen Hyoscyami* were identified by TLC. The HPLC-quantitative analysis was carried out on a column of Phenomenex Luna C₁₈ (5 μm, 250 mm × 4.6 mm ID), atropine and scopolamine were determined using methanol-water (20 : 80, the water solution contained 0.02 mmol/L of sodium acetate, 0.2 mL/L of triethylamine, 4 mL/L of tetrahydrofuran and adjusted to pH 6.0 with acetic acid) as the mobile phase with UV detection at 210 nm. Colchicine was determined using methanol-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (45 : 55) as the mobile phase with UV detection at 350 nm. **RESULTS:** The linear ranges of atropine, scopolamine and colchicine were in the ranges of 0.131 6 - 1.316 μg ($r = 0.999 8$), 0.063 6 - 0.636 μg ($r = 0.999 8$), and 0.081 76 - 0.817 6 μg ($r = 0.999 6$), respectively. The average recoveries of atropine, scopolamine and colchicine were 97.6%, 97.7% and 96.3%, respectively. **CONCLUSION:** The identification and assay methods are simple, accurate, exclusive and with good reproducibility. The improved quality standards can be used to control the quality of this product effectively.

复方骆驼蓬子软膏收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册》^[1],是由骆驼蓬子、天仙子和秋水仙三味药材组成的复方制剂,临床用于湿寒所引起的关节酸痛、风湿性关节炎、坐骨神经痛、湿疹、疥癣、疥疮等。原标准仅对骆驼蓬子和天仙子中阿托品进行鉴别,曾有文献报道^[2]用紫外分光光度法对制剂中骆驼蓬子总生物碱进行含量控制,但尚未见对其中天仙子和秋水仙进行含量控制的报道。天仙子有大毒^[3],按照药品质量标准研究的要求,应制定制剂中天仙子含量控制方法,而秋水仙中秋水仙碱是易中毒的有效成分^[4]。为更有效的控制本品质量,本实验研究制定了骆驼蓬子和天仙子的鉴别方法,并建立了制剂中天仙子成分阿托品和东莨菪碱、秋水仙中秋水仙碱的含量测定方法。结果表明,所建立的方法简便、准确、专属性强、重现性好,提高后的质量标准可更有效的控制本品质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 SSI 高效液相色谱仪 (UV/VIS 400 型紫外检测器; P4000 泵; HW-2000 色谱工作站); BP210D 电子天平 (德国赛多利斯); AS3120 超声波清洗器 (天津); Phenomenex Luna C₁₈ (5 μm, 250 mm × 4.6 mm ID) 色谱柱; 20 μL 定量环。

1.2 试剂 硫酸阿托品对照品、氢溴酸东莨菪碱对照品均购自中国药品生物制品检定所; 秋水仙碱对照品 (陕西慧科植物开发有限公司提供, 经面积归一化法测定, 纯度为 98.9%); 骆驼蓬子对照药材 (经陕西省食品药品检验所严智慧主任药师鉴定为蒺藜科植物骆驼蓬 *Peganum harmala* L. 的干燥成熟

种子); 复方骆驼蓬子软膏 (西安天健医药科学研究所研制)。硅胶 G (薄层层析用, 化学纯) 购自青岛海洋化工厂; 甲醇和四氢呋喃为 HPLC 级试剂 (美国 TEDIA 公司); 水为超纯水; 其余试剂为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 骆驼蓬子的薄层鉴别 取本品 10 g, 加三氯甲烷 30 mL 溶解后, 用 0.6 mol/L 盐酸溶液振摇提取两次, 每次 20 mL, 合并酸液, 滤过, 滤液加浓氨试液调 pH 值至 9, 用三氯甲烷振摇提取 3 次, 每次 30 mL, 合并氯仿液, 蒸干, 残渣加无水乙醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。同时制备不含骆驼蓬子的阴性制剂, 同法制成阴性对照溶液。另取骆驼蓬子对照药材 1 g, 加浓氨试液湿润, 用三氯甲烷 20 mL 回流提取 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法试验 (中国药典 2005 年版一部附录 VI B), 吸取上述 3 种溶液各 5 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液 (10 : 1 : 0.4) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷碘化铋钾试液。供试品色谱中, 在与对照药材相应的位置, 显相同颜色的斑点, 而阴性制剂无干扰, 见图 1。

2.2 天仙子的薄层鉴别 取硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱对照品, 加无水乙醇分别制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。同时制备不含天仙子的阴性制剂, 照骆驼蓬子鉴别项下供试品溶液的制备方法, 同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述两种对照品溶液各 5 μL, 阴性对照溶液和骆驼蓬

子鉴别项下的供试品溶液 20 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液(20:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,依次喷以碘化铋钾试液与 0.8 mol/L 亚硝酸钠溶液,热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品相应的位置,显相同颜色的斑点,而阴性制剂无干扰,见图 2。

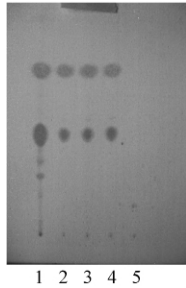


图 1 骆驼蓬子薄层色谱图

1. 骆驼蓬子对照药材 2-4. 样品 5. 缺骆驼蓬子的阴性制剂

Fig. 1 TLC chromatogram of Semen Pegani

1. Semen Pegani reference herb 2-4. Samples 5. Negative sample without Semen Pegani

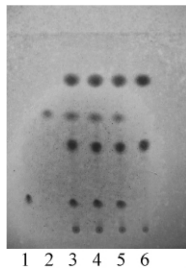


图 2 阿托品、东莨菪碱薄层色谱图

1. 氢溴酸东莨菪碱对照品 2. 硫酸阿托品 3-5. 样品 6. 缺天仙子的阴性制剂

Fig. 2 TLC chromatogram of scopolamine and atropine

1. Scopolamine reference substance 2. Atropine reference substance 3-5. Samples 6. Negative sample without Semen Hyoscyami

3 东莨菪碱和阿托品的含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈(5 μm 250 mm×4.6 mm ID);流动相:甲醇-水(20:

80,水中含 0.02 mol/L 醋酸钠、0.2 mL/L 三乙胺、4 mL/L 四氢呋喃,用冰醋酸调 pH 至 6.0);流速:1 mL/min;柱温:室温;检测波长:210 nm;进样量:20 μL。

3.2 供试品溶液的制备 取本品约 5 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密称定,加三氯甲烷 50 mL,超声提取 30 min,加 0.6 mol/L 盐酸 30 mL 回流 1 h,置分液漏斗中,分取酸液层,三氯甲烷液再用 0.6 mol/L 盐酸提取 3 次,每次 25 mL,合并酸水液,酸液加浓氨试液调 pH 值为 9,用三氯甲烷提取 3 次,每次 30 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣用流动相溶解转移至 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

3.3 线性关系考察 取氢溴酸东莨菪碱(1 mg 相当于东莨菪碱 0.789 mg)对照品、硫酸阿托品(1 mg 相当于阿托品 0.833 mg)对照品适量,配制成对照品混合溶液,即东莨菪碱(0.031 8 mg/mL)、阿托品(0.065 8 mg/mL)。取适量,配制成东莨菪碱对照品浓度为 0.003 18、0.009 54、0.015 9、0.022 26、0.031 8 mg/mL 的对照品溶液;即阿托品对照品浓度为 0.006 58、0.019 74、0.032 9、0.046 06、0.065 8 mg/mL 的对照品溶液,在上述色谱条件下,进样,记录色谱图,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,东莨菪碱和阿托品回归方程和相关系数分别为: $Y = 1\ 385\ 742.1X + 114.7$ $r = 0.999\ 8$; $Y = 1\ 724\ 685.6X + 11\ 382.1$ $r = 0.999\ 8$ 。东莨菪碱在 0.063 6 ~ 0.636 μg 范围内、阿托品在 0.131 6 ~ 1.316 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

3.4 干扰性试验 取不含天仙子的阴性制剂,按样品溶液制备项下的方法处理,进样。结果,阴性制剂在东莨菪碱、阿托品对照品色谱峰处无干扰峰出现,表明处方中其它成分对测定无影响。结果见图 3。

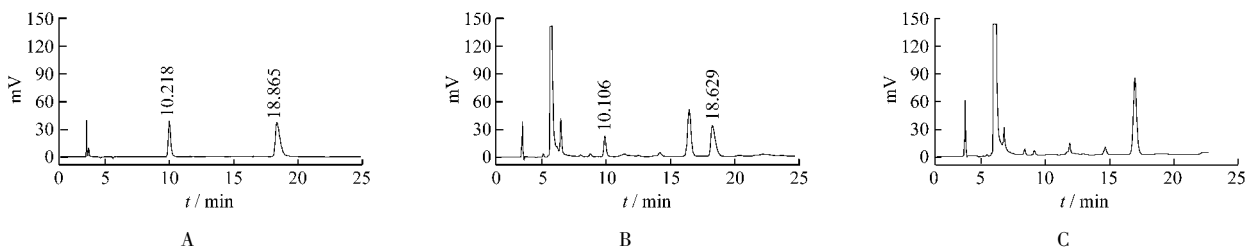


图 3 HPLC 色谱图

A. 东莨菪碱对照品(10.218 min)和阿托品对照品(18.865 min) B. 制剂 C. 缺天仙子的空白制剂

Fig. 3 HPLC chromatograms

A. Scopolamine reference substance(10.218 min) and atropine reference substance(18.865 min) B. Sample C. Negative sample without Semen Pegani

3.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液,重复进样5次,以东莨菪碱峰面积计,RSD为0.78%,以阿托品峰面积计,RSD为0.62%。表明仪器精密度好。

3.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,分别在0、2、4、8、12 h测定,东莨菪碱的RSD为1.03%、阿托品的RSD为0.84%。

3.7 重复性试验 取同一批号样品6份,按样品溶液的制备项下的方法处理,测定,东莨菪碱和阿托品总量的RSD为1.42%。

3.8 回收率试验 取浓度为0.017 4 mg/mL的东莨菪碱对照品溶液2、2、3、3、4、4 mL,分别置具塞锥形瓶中;再取浓度为0.042 8 mg/mL的阿托品对照品溶液2、2、3、3、4、4 mL依次置具塞锥形瓶中。挥干溶剂,分别精密加入已知东莨菪碱和阿托品含量的制剂约2.5 g,平行6份,按样品溶液制备项下处理并测定。计算加样回收率,结果东莨菪碱的平均回收率为97.7%,RSD为1.17%;阿托品平均回收率为97.6%,RSD为1.56%。

3.9 样品含量测定 取3批自制样品,依法测定,计算东莨菪碱的含量分别为0.026、0.023、0.028 mg/g,阿托品的含量分别为0.050、0.048、0.053 mg/g。

4 秋水仙碱的含量测定

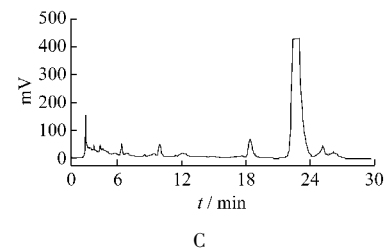
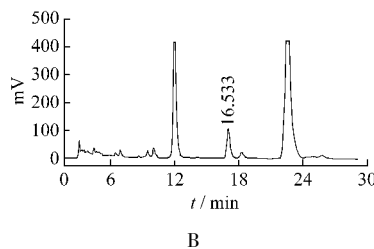
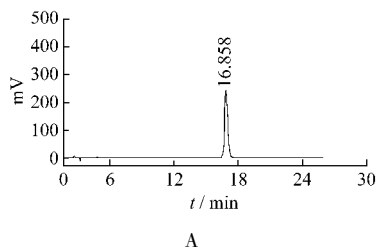


图4 HPLC 色谱图

A. 秋水仙碱对照品 B. 制剂 C. 缺秋水仙的空白制剂

Fig. 4 HPLC chromatograms

A. Colchicine reference substance B. Sample C. Negative sample without *Bulbus Colchici*

4.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液,重复进样5次,以秋水仙碱峰面积计,RSD为1.05%,表明精密度良好。

4.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,分别在0、2、4、8、12 h测定峰面积,秋水仙碱的RSD为1.67%。

4.7 重复性试验 取同一批号样品6份,按样品溶液的制备项下的方法处理,测定含量,计算RSD为1.42%。

4.8 回收率试验 取浓度为0.016 32 mg/mL的秋

4.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈ (5 μm, 250 mm × 4.6 mm ID);流动相:甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(45 : 55);流速:1 mL/min;柱温:室温;检测波长:350 nm;进样量:20 μL。

4.2 供试品溶液的制备 根据秋水仙碱的性质^[5],设计供试品处理方法为:取本品约2 g,置100 mL具塞锥形瓶中,精密称定,加甲苯50 mL,超声提取20 min,加水萃取4次,每次25 mL,合并水液,水浴蒸干,残渣用流动相溶解转移至10 mL量瓶中并稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

4.3 线性关系考察 取秋水仙碱对照品溶液(0.040 88 mg/mL),配制成浓度为0.004 088、0.012 66、0.020 44、0.028 62、0.040 88 mg/mL的对照品溶液,在上述色谱条件下,进样,记录色谱图,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,回归方程和相关系数分别为: $Y = 4\ 219\ 231X + 7\ 611$ $r = 0.999\ 6$ 。秋水仙碱在0.081 76 ~ 0.817 6 μg范围内与峰面积线性关系良好。

4.4 干扰性试验 取不含秋水仙的阴性制剂,按样品溶液制备项下的方法处理,进样。结果阴性制剂在秋水仙碱色谱峰处无干扰峰出现,表明处方中其它成分对测定无影响。结果见图4。

秋水仙碱对照品溶液2、2、3、3、4、4 mL,分别置具塞锥形瓶中,挥干溶剂,分别精密加入已知秋水仙碱含量的制剂约1.0 g,平行6份,按样品溶液制备项下处理并测定。计算加样回收率,结果秋水仙碱的平均回收率为96.3%,RSD为2.21%。

4.9 样品含量测定 取3批自制样品,依法测定,计算秋水仙碱的含量分别为0.092、0.088、0.095 mg/g。

5 讨论

5.1 骆驼蓬子和天仙子中的主要成分均为生物碱,

两者鉴别中所用供试品溶液相同、展开剂相似,但点样量差异较大,为使鉴别效果更好,故制定标准时将两项分开进行。

5.2 检测波长的选择 分别取硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱对照品适量,加甲醇配制成一定浓度的对照品溶液,在190~400 nm范围内扫描,结果表明最大吸收峰分别在210 nm和209 nm处,确定检测波长为210 nm;参考文献[5-6]确定秋水仙碱的检测波长为350 nm。

5.3 流动相的选择 曾参考文献[7-8],试验磷酸盐缓冲液(pH2.5)-乙腈(65:35)含6.25 mol/L十二烷基磺酸钠、乙腈-0.05 mol/L庚烷磺酸钠水溶液(35:65)为流动相,供试品色谱中东莨菪碱、阿托品峰均不能达到基线分离,最后在文献[9]流动相基础上适当调整,分离效果良好;参考文献[6,10]经过试验后,确定秋水仙碱含量测定的流动相为正文方法。

5.4 含量控制指标中东莨菪碱、阿托品和秋水仙碱均是毒性成分,但同时又是制剂中的有效成分,质量标准中应结合更多批次大生产制剂,制定出各成分合理的含量范围。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 卫生部药品标准·维吾尔药分册[S]. WS₃-BW-0167-98:170.
- [2] 张学农,孙殿甲,周颖,等. 骆驼蓬子软膏的质量标准研究[J]. 中成药,1997,19(12):10-12.
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2005:37.
- [4] 牛文凯,邱泽武. 秋水仙碱中毒的诊断与处理[J]. 药物不良反应杂志,2006,8(5):368-369.
- [5] 中国药典[S]. 二部. 2005:411-412.
- [6] 玉素甫奖·艾力,曼尔丹·尼牙孜. HPLC法测定通滞苏润江胶囊中秋水仙碱的含量[J]. 中国民族医药杂志,2008,9:31-33.
- [7] 李惠芬,张庆伟,张小梅,等. 应用离子对色谱技术同时测定天仙子中的三种生物碱[J]. 中草药,1999,30(3):184-185.
- [8] 马翠英,陈德昌,杨兆起. 反相离子对 HPLC 法测定天仙子中的生物碱及 TLC 法鉴定天仙子和南天仙子[J]. 药物分析杂志,1996,16(2):119-122.
- [9] 王还,潘莉,张小文. HPLC法测定天仙子和马尿泡中三种托烷类生物碱的含量[J]. 西北药学杂志,2002,17(1):9-10.
- [10] 魏莉,王志林,洁. 风湿凝胶的质量标准研究[J]. 中成药,2008,30(5):附6-附7.

柔肝胶囊化学成分的 UPLC-ESI-QTOF/MS 分析

束 艳, 宿树兰, 钱大玮*, 尚尔鑫, 段金廛, 薛彩福
(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室 江苏 南京 210046)

关键词:柔肝胶囊;化学成分;UPLC-ESI-QTOF/MS

摘要:目的:采用液质联用技术(LC-MS)对中药柔肝胶囊(丹参、姜黄等)中的化学成分进行定性分析。方法:运用 ACQUITY UPLC HSS T₃(2.1 mm×100 mm,1.8 μm)柱,以甲醇-0.1%甲酸为流动相梯度洗脱;质谱使用 ESI 离子源,正离子与负离子模式下采集数据。结果:通过 Q-TOF/MS 正、负离子质谱信息及元素组成分析并结合对照品与相关文献数据对照,共鉴定出 19 个化合物,主要结构类型为:水溶性酚酸类、姜黄素类、皂苷类及异黄酮类化合物。结论:本法对柔肝胶囊的成分鉴定提供一种快速准确的分析方法。

中图分类号:R927.1

文献标识码:A

文章编号:1001-4528(2011)01-0073-06

Chemical composition of Rougan Capsule by UPLC-ESI-QTOF/MS

SHU Yan, SU Shu-lan, QIAN Da-wei*, SHANG Er-xin, DUAN Jin-ao, XUE Cai-fu
(Jiangsu Provincial Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

收稿日期:2010-09-19

作者简介:束艳(1984-),女,在读硕士研究生,研究方向:生物药剂学。Tel:(025)85811917

* 通讯作者:钱大玮(1962-),男,硕士生导师,教授,研究方向:中药质量控制与生物药剂学。Tel:(025)85811916 E-mail:qiandw05@yahoo.com.cn