

脉络通胶囊质量标准

谭琴¹, 沈婷¹, 金芳^{2*}, 郭青³, 姚仲青¹

(1. 扬子江药业集团有限公司, 江苏泰州 225321; 2. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038; 3. 江苏省食品药品检验所, 南京 210008)

[摘要] 目的: 提高脉络通胶囊的质量标准。方法: 采用 TLC 法鉴别制剂中丹参、山楂、川芎、地龙, 采用 HPLC 同时测定葛根素、芦丁、丹酚酸 B 含量。色谱条件: Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 以甲醇 (A)-1% 冰醋酸溶液梯度洗脱 (0~45 min, 25%~45% A, 45~55 min, 45%~25% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果: TLC 可鉴别丹参、山楂、川芎、地龙。葛根素的进样量在 0.130 6~1.959 6 μg 呈现良好的线性, $r=0.999\ 9$; 平均加样回收率 97.77%, RSD 0.70%; 芦丁的进样量在 1.054 2~15.813 6 μg 呈现良好的线性, $r=0.999\ 9$; 平均加样回收率 98.66%, RSD 0.89%; 丹酚酸 B 的进样量在 0.184 9~2.773 2 μg 呈现良好的线性, $r=0.999\ 5$; 平均加样回收率 99.55%, RSD 1.15%。结论: 该法专属性强, 重复性好, 结果准确, 可用于控制脉络通胶囊质量。

[关键词] 脉络通胶囊; 质量标准; 葛根素; 芦丁; 丹酚酸 B; 薄层色谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0093-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190093

Standard of Quality Control of Mailuotong Jiaonang

TAN Qin¹, SHEN Ting¹, JIN Fang^{2*}, GUO Qing³, YAO Zhong-qing¹

(1. Yangzi River Pharmaceutical Group Co. Ltd, Taizhou 225321, China;

2. Center for Drug Evaluation, CFDA, Beijing 100038, China; 3. Jiangsu Provincia Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To improve the standard of quality control of Mailuotong Jiaonang. **Method:** TLC identify *Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma*, *Crataegi fructus*, *Chuanxiong rhizome*, *Pheretima*. The Kromasil 100-5C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was column adopted with the temperature at 35 °C, mobile phase A was methanol, mobile phase B was 1% glacial acetic acid solution (0-45 min, 25%-45% A; 45-55 min, 45%-25% A) the flow rate at 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm. **Result:** The calibration curve of puerarin was linear in the range of 0.130 6-1.959 6 μg with the correlation of 0.999 9 ($n=9$). The average recovery of puerarin was 97.77%, RSD 0.70% ($n=6$). The calibration curve of rutin was linear in the range of 1.054 2-15.813 6 μg with the correlation of 0.999 9 ($n=9$). The average recovery of rutin was 98.66%, RSD 0.89% ($n=6$). The calibration curve of salvia acid B was linear in the range of 0.184 9-2.773 2 μg with the correlation of 0.999 5 ($n=9$). The average recovery of salvia acid B was 99.55%, RSD 1.15% ($n=6$). **Conclusion:** The method is specific, reliable and accurate, so it can be used for the quality control of Mailuotong Jiaonang.

[Key words] Mailuotong Jiaonang; standard of quality control; puerarin; rutin; salvianolic acid B; TLC; HPLC

脉络通胶囊由党参、当归、地龙、丹参等 10 味制成的硬胶囊, 具有益气活血、化瘀止痛的功效。用于

胸痹引起的心胸疼痛、胸闷气短、头痛眩晕及冠心病、心绞痛具有上诉诸证, 中风引起的肢体麻木、半

[收稿日期] 20140324(004)

[第一作者] 谭琴, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药研究, Tel:025-58616121, E-mail:qiner3421@sina.com

[通讯作者] * 金芳, 硕士, 主任药师, 从事中药新药审评工作, Tel:010-68585566, E-mail:jinf@cde.org.cn

身不遂等证,收载于国家食品药品监督管理局国家药品标准^[1]。原制剂标准中,对葛根素、芦丁进行了薄层鉴别,对葛根素进行了含量测定。为提高脉络通胶囊的质量标准,建立 HPLC 同时测定葛根素、芦丁、丹酚酸 B 的方法;修订了丹参、川芎、山楂的薄层鉴别方法,增加了地龙的薄层鉴别,可以为脉络通胶囊新的质量标准提供数据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AB 型高效液相色谱仪 (SPD-M20A 光电二极管阵列检测器,LC solution 色谱工作站,日本岛津),JL-720DT 型超声波清洗器(上海杰理超声仪器有限公司),92SM-202A 型电子天平(瑞士 Rrecisa 仪器有限公司),BS21S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),DK-S26 型电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)。

1.2 试药与样品 葛根素(批号 110752-200912,96.0%)、芦丁(批号 100080-200707,90.5%)、丹酚酸 B(批号 111562-201111,98.2%)对照品均购自中国食品药品检定研究院,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。脉络通胶囊样品(扬子江药业集团南京海陵药业有限公司,批号 11100808,11110809,11110810)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别^[1-2]

2.1.1 丹参薄层鉴别 取本品内容物 2 g,加水 50 mL,加热溶解,冷却,用盐酸调节 pH 至 2,用乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 15 mL,合并提取液,挥干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取丹参对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。另取原儿茶醛对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:8:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 三氯化铁-1% 铁氰化钾(1:1)溶液。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,同法制得的阴性对照品溶液中,未见与对照品色谱相应位置上有相同颜色的斑点。

2.1.2 山楂薄层鉴别 取本品内容物 5 g,加乙酸乙酯 10 mL,超声处理 15 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取山楂对照药材 3 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品溶液 10 μ L,对照药材溶

液 3 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:4:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 30% 硫酸乙醇溶液,80 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。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;置紫外光灯(365 nm)下检视,显相同颜色的荧光斑点。

2.1.3 川芎薄层鉴别 取本品内容物 2 g,加乙酸乙酯 10 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取川芎对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品溶液 10 μ L,对照药材溶液 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-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,显相同颜色的斑点。

2.1.4 地龙薄层鉴别^[2] 取本品 5 g,加三氯甲烷 20 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解,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(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品溶液 3 μ L,对照药材溶液 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,显相同颜色的荧光斑点。同法制得的阴性对照品溶液中,未见与对照药材色谱相应位置上有相同颜色的斑点。

2.2 含量测定^[3-8]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相甲醇(A)-1% 冰醋酸溶液(B)梯度洗脱(0~45 min,25%~45% A,45~55 min,45%~25% A),检测波长 254 nm,理论塔板数按葛根素峰计算不低于 2 500。

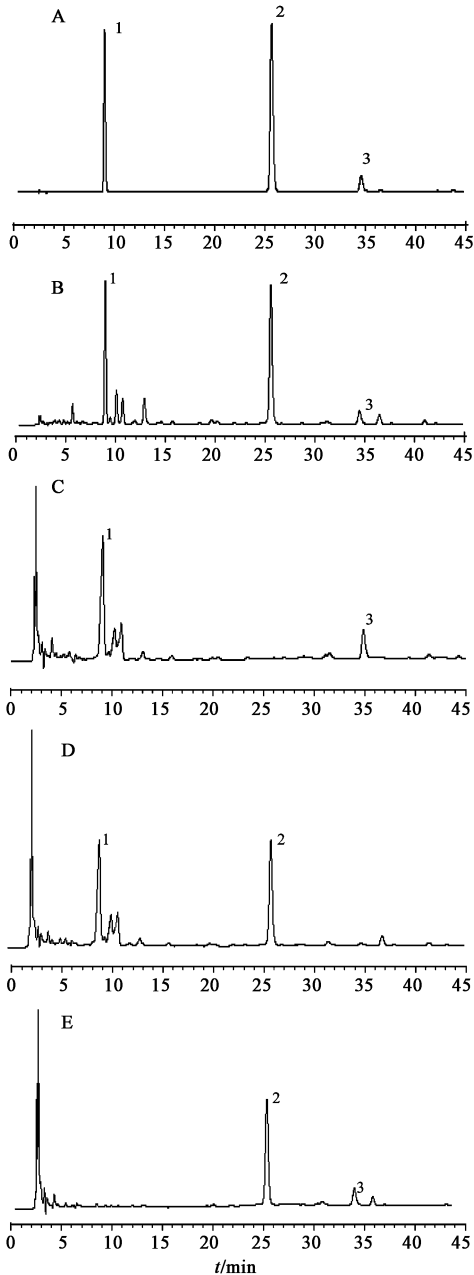
2.2.2 对照品溶液的制备 取葛根素、芦丁、丹酚酸 B 对照品,精密称定,加 70% 甲醇制成每 1 mL 分别含葛根素 0.06 mg,芦丁 0.5 mg,丹酚酸 B 0.1 mg 的混合溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品装量项下内容物 0.1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称重,回流提取 20 min,取出,放凉,用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,离心(5 000 r \cdot min⁻¹),取上清液作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按样品制法分别制

成缺葛根、槐米、丹参的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 精密吸取葛根素、芦丁、丹酚酸 B 对照品溶液、脉络通胶囊供试品溶液、阴性对照溶液,按上述色谱条件分别进样,记录色谱图,结果显示阴性对照溶液 HPLC 图中,未出现与对照品色谱峰相同保留时间的色谱峰,表明阴性无干扰,见图 1。



1. 葛根素; 2. 芦丁; 3. 丹酚酸 B;
A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺槐米阴性;
D. 缺丹参阴性; E. 缺葛根阴性

图 1 脉络通胶囊 HPLC

2.2.6 线性关系考察 精密吸取葛根素、芦丁、丹酚酸 B 分别为 0.065 32, 0.527 12, 0.092 45 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

的对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30 μL , 分别进样,按正文项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 3 种成分线性方程

回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
$Y_{\text{葛根素}} = 3.8 \times 10^5 X + 1.2 \times 10^4$	0.999 9	0.130 6 ~ 1.959 6
$Y_{\text{芦丁}} = 1.8 \times 10^6 X + 1.5 \times 10^4$	0.999 9	1.054 2 ~ 15.813 6
$Y_{\text{丹酚酸 B}} = 1.1 \times 10^6 X + 5.1 \times 10^3$	0.999 5	0.184 9 ~ 2.773 2

2.2.7 精密度试验 取同一份对照品溶液,重复进样 8 次,进样 10 μL ,记录所测各组分峰面积,结果葛根素、芦丁、丹酚酸 B 色谱峰面积的 RSD 分别为 0.17%, 0.21%, 0.48%,表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液(批号 11100809),分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 48 h 分别进样 10 μL ,记录所测各组分峰面积。结果葛根素、芦丁、丹酚酸 B 色谱峰面积的 RSD 分别为 0.28%, 0.27%, 0.60%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 取批号为 11100809 的样品,按供试品溶液制备方法,制备 6 份,进样,测定,按外标一点法计算。结果葛根素、芦丁、丹酚酸 B 平均质量分数分别为 31.42, 237.91, 48.50 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$;RSD 分别为 0.28%, 0.36%, 0.29%,表明重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 分别取葛根素、芦丁、丹酚酸 B 对照品 16, 25, 130 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度,制成分别为 0.16, 0.25, 1.3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3 种对照品溶液。

取已知含量样品(批号 11100809)细粉 6 份,每份约 0.05 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入上述 3 种对照品溶液各 10 mL,再精密加入 70% 甲醇 20 mL,称重,加热回流 20 min,冷却,用 70% 甲醇补足减失质量,离心,取上清液进样,测定。结果见表 2。

2.2.11 耐用性试验 取供试品溶液(批号 11100809),分别用 3 种不同品牌的色谱柱依法测定,计算。结果 3 种色谱柱所测含量葛根素、芦丁、丹酚酸 B 的 RSD 分别为 3.21%, 1.99%, 1.67%,表明耐用性良好。

2.2.12 样品测定 取 3 个批次样品,按正文项下供试品溶液制备方法制备。依法进样测定,以外标一点法计算。结果见表 3。葛根素、芦丁、丹酚酸 B 的平均质量分数分别为 12.968, 97.313, 20.900 $\text{mg}/\text{粒}$ 。

限度制定:按原标准中葛根素不得少于 5.0

表 2 脉络通胶囊中 3 种成分的加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
葛根素	0.050 0	1.64	1.631	3.25	98.79	97.77	0.70
	0.050 2	1.64	1.631	3.245	98.24		
	0.050 5	1.65	1.631	3.232	96.90		
	0.050 2	1.64	1.631	3.239	97.85		
	0.050 3	1.65	1.631	3.238	97.56		
	0.050 3	1.65	1.631	3.233	97.29		
芦丁	0.050 0	13.16	13.049	26.195	99.91	98.66	0.89
	0.050 2	13.19	13.049	26.159	99.36		
	0.050 5	13.27	13.049	26.073	98.13		
	0.050 2	13.20	13.049	26.056	98.54		
	0.050 3	13.22	13.049	25.938	97.44		
	0.050 3	13.22	13.049	26.084	98.56		
丹酚酸 B	0.050 0	2.47	2.499	4.991	100.81	99.55	1.15
	0.050 2	2.48	2.499	4.998	100.80		
	0.050 5	2.49	2.499	4.96	98.71		
	0.050 2	2.48	2.499	4.969	99.60		
	0.050 3	2.48	2.499	4.97	99.46		
	0.050 3	2.48	2.499	4.931	97.89		

mg/粒为依据,按 3 批样品含量均值计算,芦丁应不得少于 $97.313/12.968 \times 5.0 = 37.5$ mg/粒,丹酚酸 B 应不得少于 $20.900/12.968 \times 5.0 = 8.0$ mg/粒。

表 3 脉络通胶囊测定结果

批号	葛根素	芦丁	丹酚酸 B
11100808	12.364	95.386	21.335
11100809	13.128	98.732	20.511
11100819	13.412	97.820	20.855

3 讨论

3.1 鉴别项的选择 为拟修订的原标准中鉴别(1)-葛根鉴别、鉴别(2)-槐米鉴别,增加葛根对照药材、槐米对照药材,结果供试品色谱图中检出与葛根对照药材相一致的 2 个斑点,阴性未检出,2 个斑点中较大的斑点为葛根素,由于葛根素已在含量测定项进行控制,故该项文中未说明。供试品色谱图中检出与槐米对照药材相一致的 2~3 个斑点,阴性未检出,斑点中最大的斑点为芦丁,由于芦丁已在提高后的含量测定项进行控制,故该项未上正文。

3.2 测定波长的选择 葛根素在 249 nm 处有最大吸收,芦丁在 255,354 nm 处有最大和次强吸收,丹酚酸 B 在 286 nm 处有最大吸收,比较在不同波长下各指标的响应值,结果波长为 254 nm 时,3 种成分均有较大响应。在 254 nm 下,样品中 3 种成分色谱行为良好,DAD 检测下其光谱图与对照品一致。

3.3 指标的确定 根据流动相极性范围和在此范围内可被测定的处方中所含成分,选择羟基红花黄色素 A、葛根素、阿魏酸、芦丁、丹酚酸 B、党参炔苷

作为测定指标进行考察。结果 6 个对照品可在 254 nm 下的同一张色谱图中良好呈现和分离(图 2),但供试品溶液(DAD 筛查)只出现葛根素、芦丁、丹酚酸 B 色谱峰,羟基红花黄色素 A、阿魏酸、党参炔苷均未检出。分析原因:羟基红花黄色素 A 为红花中成分,其对热极不稳定;阿魏酸为川芎和当归中的共有成分,可能在工艺中大孔树脂洗脱环节损失;党参炔苷在党参中含量太少,样品前处理需经净化和富集才能检出^[9]。因此样品回流前处理不适合这 3 种成分的测定,最终确定测定指标为葛根素、芦丁、丹酚酸 B。

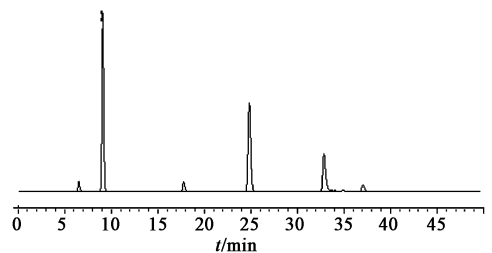


图 2 6 个对照品溶液 HPLC(254 nm)

[参考文献]

- [1] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准[S]. YBZ25172005-2009Z.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [3] 饶毅,魏惠珍,崔金国,等. HPLC 法同时测定心可舒制剂中葛根素和丹酚酸 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2007,27(9):1431.
- [4] 董惠文. 高效液相色谱法测定镇脑宁胶囊中葛根素和阿魏酸的含量[J]. 海峡药学,2011,23(7):69.
- [5] 陈岳蓉. HPLC 测定丹葛颈舒胶囊中葛根素和丹酚酸 B 含量[J]. 中成药,2009,31(9):1474.
- [6] 杜志茂,黄安军,白娟. HPLC 法同时测定消栓通络胶囊中阿魏酸、芦丁和丹酚酸 B 的含量[J]. 中国药事, 2010,24(7):693.
- [7] 刘春旭,张颖,刘东春,等. HPLC 法快速测定通脉颗粒中葛根素和阿魏酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(7):44.
- [8] 卢召战,朱靖博,刘天赐. pH 及添加剂对丹酚酸 B 水溶液稳定性的影响[J]. 大连工业大学学报,2008, 27(3):209.
- [9] 郭青,孙珊,吕霞. 益气止血颗粒中党参炔苷的前处理方法和 RP-HPLC 含量测定[J]. 中国药品标准,2009, 10(5):364.

[责任编辑 顾雪竹]