

HPLC 测定散结镇痛胶囊中龙血素 A, B 含量

鹿丽丽¹, 萧伟^{2*}, 徐连明², 徐忠坤², 殷洪梅²

(1. 南京中医药大学, 南京 210000; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

[摘要] 目的: 建立散结镇痛胶囊中龙血素 A、龙血素 B 的含量测定方法。方法: 75% 甲醇超声提取龙血素 A、龙血素 B, 以 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为分析柱, 以乙腈-1% 冰醋酸为流动相进行梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 278 nm, 柱温 30 °C。结果: 龙血素 A 在 526.20 ~ 4.11 ng 线性关系良好 ($r = 0.999\ 9$), 平均回收率 101.84% (RSD 0.77%, $n = 6$); 龙血素 B 在 506.09 ~ 3.95 ng 线性关系良好, $r = 0.999\ 9$, 平均回收率 100.54% (RSD 1.46%, $n = 6$); 并具有较好的重复性和稳定性。结论: 样品处理方法合理, 方法学考察符合定量要求, 结果准确, 可用于散结镇痛胶囊中龙血素 A、龙血素 B 的含量测定。

[关键词] 散结镇痛胶囊; 龙血素 A; 龙血素 B; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0105-04

[doi] 10.11653/syfy2013140105

Determination of Loureirin A, B in Sanjie Zhentong Capsules by HPLC

LU Li-li¹, XIAO Wei^{2*}, XU Lian-ming², XU Zhong-kun², YIN Hong-mei²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for content determination of loureirin A, B in Sanjie Zhentong capsules. **Method:** Extracted loureirin A, B with ultrasonic method in the use of 75% methanol, Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a step gradient of acetonitrile-1% glacial acetic acid at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The sample amount was 10 μL and the detection wavelength was set at 278 nm. The column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** Loureirin A and B had a good linear relationship during 526.20-4.11 ng ($r = 0.999\ 9$) and 506.09-3.95 ng ($r = 0.999\ 9$) respectively. The average recoveries were 101.84% with RSD 0.77% ($n = 6$), 100.54% with RSD 1.46% ($n = 6$). The method also had good reproducibility and stability. **Conclusion:** The sample preparation is reasonable in the quantitative method, and the accurate results can be used for content determination of loureirin A and B of Sanjie Zhentong Capsules.

[Key words] Sanjie Zhentong capsules; loureirin A; loureirin B; content determination; HPLC

散结镇痛胶囊由《增效产乳备要》古方血竭散及《医学心悟》消瘰丸化裁而来^[1], 由三七、龙血竭等药味组成, 活血化瘀、软坚散结, 具有改善微循环、

抑制组织异常增生及免疫调节的功能, 在临床使用中 发现其对子宫内膜异位症有良好的疗效^[2]。方中龙血竭活血化瘀、消肿止痛^[3]、三七散瘀止血、消肿定痛^[4], 为君药; 薏苡仁、浙贝母化痰燥湿、消瘰散结^[5]。在原有的质量标准中, 本产品仅控制了浙贝母中贝母素甲、乙的含量, 而未对君药中的成分进行说明^[6]。龙血素 A、B 作为君药龙血竭的主要药效成分, 具有保护缺氧脑细胞、抗真菌^[7]、抑制体外 ADP 诱导的血小板聚集^[8]、活血化瘀、镇痛等作用^[9-10], 在整个制剂中也发挥着重要作用。本文作为散结镇痛胶囊质量标准的提升与完善, 通过实验

[收稿日期] 20120928(006)

[基金项目] 科学技术部国家重大新药创制项目 (2011ZX09201-201-20)

[第一作者] 鹿丽丽, 硕士研究生, 从事中药新型制剂的研究与开发, Tel: 15950726751, E-mail: ll_l_821@126.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新剂型的研究与开发, E-mail: wzzh-nj@tom.com

考察了君药龙血竭中龙血素 A, B 含量测定方法。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(四元泵,智能柱温箱,自动进样器,MWD 可变波长检测器,美国安捷伦公司),KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),BP211D 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

龙血素 A(批号 111660-200301)、龙血素 B(批号 111558-201006)由中国药品生物检定所提供。冰醋酸、甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,水为纯化水。散结镇痛胶囊(规格 0.4 g/粒)由江苏康缘药业股份有限公司提供。

2 方法与结果

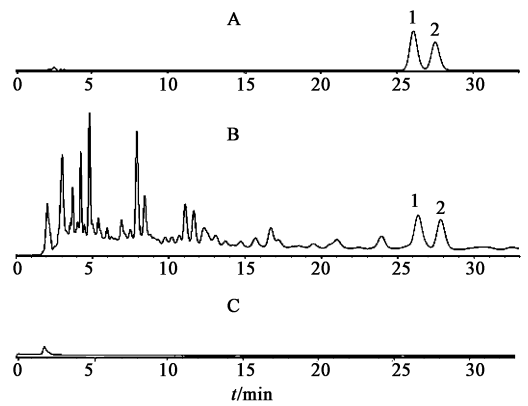
2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为 A(乙腈)-B(1% 冰醋酸),梯度洗脱程序[0 ~ 30 min, A-B(40:60), 31 ~ 35 min, A-B(70:30)],检测波长 278 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取龙血素 A、龙血素 B 适量,加甲醇制成每 1 mL 含龙血素 A 26.311 μg、龙血素 B 25.30 μg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取装量差异下的本品内容物 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 50 mL,称定质量,100 W 超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用 75% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 按处方比例和工艺制备阴性空白样品,按供试品溶液的制备方法制备阴性空白样品溶液。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液与阴性样品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按照 2.1 项下色谱条件进行测定,试验结果见图 1。

2.5 线性关系的考察 分别精密称取龙血素 A、龙血素 B 对照品 8.77, 8.44 mg 置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得标品贮备液。精密吸取上述贮备液 3 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含龙血素 A 52.62 μg、龙血素 B 50.61 μg 的对照品溶液 1。将所得到的对照品溶液 1 逐级对半稀释,得每 1 mL 含龙血素 A 26.31 μg、龙血素 B 25.30 μg,龙血素 A 13.16 μg、龙血素 B 12.65 μg,龙血素 A 6.58 μg、龙血素 B 6.33 μg,龙血素 A 3.29 μg、龙血素 B 3.16 μg,龙血素 A 1.64 μg、龙血素 B 1.58 μg,龙血素 A 0.82 μg、龙血素 B 0.79 μg,龙血素 A 0.41 μg、龙血素 B 0.40 μg



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性样品;

1. 龙血素 A; 2. 龙血素 B

图 1 对照品、样品和阴性样品 HPLC

的对照品溶液 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 分别精密吸取上述溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以对照品进样量为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 绘制标准曲线, 龙血素 A 回归方程为 $Y = 3273.2X + 5.1515$ ($r = 0.9999$), 线性范围为 526.20 ~ 4.11 ng; 龙血素 B 回归方程为 $Y = 2528.6X + 4.8071$ ($r = 0.9999$), 线性范围为 506.09 ~ 3.95 ng, 线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 计算峰面积 RSD, 得龙血素 A 峰面积 RSD 0.37%、龙血素 B 峰面积 RSD 0.39%, 表明精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批样品, 分别制备 6 份供试品溶液, 按上述含测方法测定龙血素 A 含量和龙血素 B 含量, 结果龙血素 A 含量 RSD 1.56%、龙血素 B 含量 RSD 1.61%。表明本方法重复性较好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 h 进行测定。结果龙血素 A 含量 RSD 1.49%、龙血素 B 含量 RSD 1.56%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品 0.5 g, 分别精密加入一定量的龙血素 A、龙血素 B 对照品, 按 2.3 项下操作, 平行操作 6 份, 按 2.1 项下条件测定含量, 计算回收率。结果见表 1。

2.10 样品测定 取 3 批样品按 2.3 项下方法制得供试品溶液, 分别吸取上述对照品溶液和供试品溶液 10 μL, 依次注入液相色谱仪, 按 2.1 项下条件测定。测定结果见表 2。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择 鉴于超声提取法节省溶剂、操作简便等特点, 着重考查了超声提取

表1 龙血素A、B加样回收率(n=6)

成分	No.	称样量/g	样品中含量/ μg	加入对照品量/ μg	实测量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
龙血素A	1	0.5045	590.89	587.59	1184.92	101.10	101.84	0.77
	2	0.5043	590.66	587.59	1190.88	102.15		
	3	0.5036	589.84	587.59	1187.54	101.72		
	4	0.5004	586.09	587.59	1189.76	102.74		
	5	0.5050	591.48	587.59	1183.61	100.77		
	6	0.5031	589.25	587.59	1191.73	102.53		
龙血素B	1	0.5045	471.41	478.71	951.65	100.32	100.54	1.46
	2	0.5043	471.22	478.71	961.94	102.51		
	3	0.5036	470.57	478.71	946.50	99.42		
	4	0.5004	467.58	478.71	942.19	99.15		
	5	0.5050	471.88	478.71	961.10	102.20		
	6	0.5031	470.10	478.71	947.01	99.62		

表2 不同批次散结胶囊含测

批号	称样量/g	龙血素A含量/(mg/粒)	龙血素B含量/(mg/粒)
Z110501	1.0045	0.47	0.37
Z110503	1.0028	0.47	0.43
Z110510	1.0023	0.49	0.40

法。分别对不同溶剂(甲醇,75%甲醇,50%甲醇,25%甲醇,乙醇,75%乙醇,50%乙醇,25%乙醇),溶剂用量(30,40,50,60,70 mL)、超声时间(15,30,45,60 min)进行考察(图2~4),结合指标成分的含量,优选出提取的最佳溶剂为75%甲醇、溶剂用量为50 mL、提取时间为30 min。最终确定样品的处理方法为取装量差异下的本品内容物1 g,精密称定,用50 mL 75%甲醇超声提取30 min。

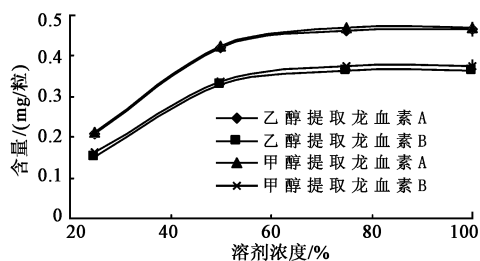


图2 不同溶剂龙血素A、B含量测定

3.2 洗脱程序的选择 有关龙血素A、B的HPLC测定的方法多有报道,有梯度洗脱^[11],亦有等度洗脱^[12-13]。为了节省检测时间并得到较好的分离度,笔者在试验中考察了多种流动相洗脱程序对龙血素A、B的影响,包括梯度洗脱,以及不同比例的等度洗脱。结合二者的出峰时间和分离效果,最终确定

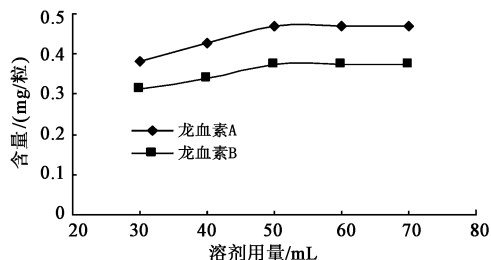


图3 不同溶剂用量龙血素A、B含量测定

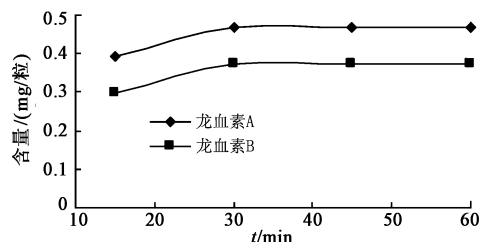


图4 不同提取时间龙血素A、B含量测定

本文中的洗脱程序。

[参考文献]

[1] 韦冰,张凤兰. 散结镇痛胶囊治疗子宫内膜异位症的临床观察[J]. 中医中药,2007,20(4):91.
 [2] 颜月园,萧伟,吴云,等. 散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):58.
 [3] 黄韵然,梁美宜,周毅生,等. 龙血竭结肠定位片包衣处方优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):44.
 [4] 唐婧姝,裴清华. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):211.

维吾尔药养心达瓦依米西克蜜膏的质量标准

沙拉麦提·艾力*, 王亚丽, 苏来曼·哈力克
(新疆维吾尔自治区食品药品检验所, 乌鲁木齐 830004)

[摘要] 目的: 建立养心达瓦依米西克蜜膏的质量标准。方法: 采用 TLC 法对方中西红花、肉桂进行定性鉴别, 并用 RP-HPLC 法测定西红花中西红花苷 I 的含量; 采用 Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-水 (45:55) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 440 nm, 进样量 10 μL。结果: 薄层鉴别专属性强, 分离效果好。西红花苷 I 在 0.019 2 ~ 0.153 6 μg 呈良好的线性关系 (r = 0.999 9), 平均回收率为 98.7% (n = 6), RSD 1.51%。结论: 方法简便、准确、重复性好, 可作为养心达瓦依米西克蜜膏的质量控制方法。

[关键词] 养心达瓦依米西克蜜膏; 质量标准; 薄层色谱; 高效液相色谱; 西红花; 肉桂; 西红花苷 I

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0108-04

[doi] 10.11653/syjf2013140108

Study on Quality Control of Uyghur Medicine Preparation Yangxin Dawayi Mixike Migao

SHA La Maiti · Ai-li*, WANG Ya-li, SU Ley-man · Ha-lik

(Xinjiang Uyghur Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the quality standard of Yangxin Dawayi Mixike Migao. **Method:** The TLC method was used for the qualitative identification of Stigma Croci and Cortex Cinnamomi in the formula. The content of crocin-I in Yangxin Dawayi Mixike Migao was determined simultaneously by RP-HPLC method with a Luna C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-water (45:55); the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 440 nm, and the column temperature was set at 35 °C.

[收稿日期] 20120227(033)

[基金项目] 国家药典会国家药品(维药)标准提高项目(799)

[通讯作者] * 沙拉麦提·艾力, 副主任药师, 从事维吾尔药材及制剂质量研究, Tel: 0991-2305956, E-mail: sala001@sina.com

- [5] 陈丽娟. 散结镇痛胶囊治疗子宫内异位症腹腔镜术后疗效观察[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(11):57.
- [6] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准[WS₃-232(Z-38)-2009(Z)]散结镇痛胶囊[S]. 2009.
- [7] 胡迎庆, 宫飙, 屠鹏飞. 龙血树属植物化学成分及生物活性研究进展[M]. 国外医药:植物药分册, 2000, 15(1):5.
- [8] 张天宝, 吕静慈, 雍克岚, 等. 广西龙血竭中几种化学成分对血小板聚集影响的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4):695.
- [9] 张凡, 马全顺, 陈素, 等. 龙血素 B 对三叉神经节河豚毒素不敏感型钠通道电流的调制作用[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6):947.
- [10] 王灿, 陈素, 刘向明. 龙血素 B 抑制大鼠背根神经节细胞辣椒素诱发的电流反应[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(2):211.
- [11] 李云, 萧伟, 秦建平, 等. HPLC 测定龙血竭提取物中龙血素 A、B 和 7,4'-二羟基黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):45.
- [12] 李忠琼, 向东. HPLC 测定龙血竭中龙血素 A 和龙血素 B 的含量[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(4):348.
- [13] 胡迎庆, 付勇, 张庆云. RP-HPLC 测定龙血竭胶囊中龙血素 A 和 B 的含量[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(2):112.

[责任编辑 顾雪竹]