

芪蛭皱肺胶囊的质量标准研究

魏舒畅, 黄燕, 李金田*, 刘永琦, 武晓玉
(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 建立芪蛭皱肺胶囊的质量控制方法。方法: 采用 TLC 方法对制剂中黄芪、水蛭、赤芍、丹参、枳实进行定性鉴别; 采用 HPLC 对制剂主药黄芪中黄芪甲苷进行含量测定。采用 Hypersil ODS-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (75:25) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 蒸发光散射检测器: 漂移管温度 75 °C, 载气流速 2.1 L·min⁻¹。结果: 黄芪、水蛭、赤芍、丹参、枳实的定性鉴别方法专属性强, 阴性无干扰; 黄芪甲苷加样回收率 (n=6) 97.97%, RSD 2.21%; 黄芪甲苷进样量在 0.28~1.68 μg 与峰面积自然对数呈良好线性关系。结论: 方法简便可行, 重复性好, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 芪蛭皱肺胶囊; 质量标准; 薄层色谱; 高效液相色谱; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0072-05

Study on the Quality Control Standard of Qizhizhoufei Capsule

WEI Shu-chang, HUANG Yan, LI Jin-tian*, LIU Yong-qi, WU Xiao-yu
(Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality control standard of qizhizhoufei capsule. **Method:** Radix Astragali, Hirudo, Radix Paeoniae Rubra, Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae and Fructus Aurantii Immaturus were identified by TLC. The content of Astragaloside in qizhizhoufei capsule was determined by HPLC. Hypersil ODS-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, with methanol-water (75:25) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was at 40 °C. Evaporative Light Scattering Detector (ELSD): the temperature of drift tube was 75 °C, the flow rate of carrier gas was 2.1 L·min⁻¹. **Result:** The TLC identification methods for the Radix Astragali, Hirudo, Radix Paeoniae Rubra, Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae and Fructus Aurantii Immaturus was highly specificity, the negative sample didn't interfere the identification of TLC. The average recoveries (n=6) of astragaloside was 97.97%, RSD was 2.21%. The linear range of astragaloside was 0.28-1.68 μg. **Conclusion:** The method is simple, repeatable and may be used for the quality control of qizhizhoufei capsule.

[Key words] Qizhizhoufei capsule; quality standard; TLC; HPLC; astragaloside

芪蛭皱肺胶囊由黄芪、水蛭、赤芍、丹参、枳实等 9 味中药组成, 具有益气培元、活血化瘀、瘪皱肺胀之功效, 主要用于痰浊水饮与血瘀相互影响导致的慢性阻塞性肺病 (COPD)^[1-3], 原方经临床多年使用疗效良好。为将其开发为临床疗效确切、服用方便

的中药新药, 本文在全面完成其制剂工艺之后对该品种的质量标准进行了系统研究。

1 材料

BS124S 型电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司)、Prominence LC-20A 高效液相色谱仪 (岛津公司, 日本)、SB-22007 型超声波清洗器 (上海必能超声有限公司)、ZF7 型紫外分析仪 (上海康华生化仪器制造有限公司)。黄芪、赤芍、水蛭、丹参、枳实对照药材 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 120974-200609, 121093-200402, 12106-200503, 120923-200509, 120936-200404) 及黄芪甲苷 (供含

[收稿日期] 20110504(007)

[基金项目] 甘肃省科技攻关科研项目 (2GS035-A43-067); 甘肃省教育厅产学研对接科研项目 (03zd-04)

[第一作者] 魏舒畅, 教授, 硕士生导师, 从事中药制剂工艺研究

[通讯作者] * 李金田, 教授, 硕士生导师, 从事中医药防治心肺疾病研究, E-mail: yanz-yao@126.com

量测定用)、芍药苷、橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为110781-200512,110736-200629,110721-200512),甲醇为色谱纯,芪蛭皱肺胶囊(甘肃中医学院中药制药实验室制备,批号20081201,20081202,20081203),其他试剂均为分析纯。

2 芪蛭皱肺胶囊的薄层色谱鉴别

2.1 黄芪的薄层色谱鉴别 取本品内容物4 g,加水5 mL溶解,用水饱和正丁醇萃取2次(30 mL/次),合并正丁醇萃取液,用氨试液充分洗涤2次(20 mL/次),弃去氨液,正丁醇液挥干,残渣加甲醇5 mL定容,作为供试品溶液。取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液,作为对照品溶液。取黄芪对照药材0.5 g,加甲醇20 mL,加热回流提取1 h,过滤,滤液蒸干,残渣加水5 mL,依法制成黄芪对照药材溶液。另取黄芪阴性胶囊内容物4 g依法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法实验^[1],吸取上述4种溶液各 $1\ \mu\text{L}$ 分别点于同一硅胶G薄层板,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(10:21:14:5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷10%硫酸乙醇溶液显色,105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中在与对照品、对照药材色谱相对应位置上,呈相同的紫红色斑点,而阴性对照无干扰。

2.2 赤芍的薄层色谱鉴别 取本品内容物5 g,研细,加甲醇40 mL,超声提取30 min,过滤,滤液蒸干,残渣加水10 mL溶解,用水饱和正丁醇萃取2次(30 mL/次),合并正丁醇萃取液,用氨试液充分洗涤两次(20 mL/次),弃去氨液,正丁醇液挥干,残渣加甲醇2 mL定容,作为供试品溶液^[4]。称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。另取赤芍对照药材1 g,依法制成赤芍对照药材溶液。另取赤芍阴性胶囊内容物5 g,研细,依法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法实验^[1],吸取上述4种溶液各 $1\ \mu\text{L}$ 分别点于同一硅胶G薄层板,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(8:3:2:0.04)为展开剂,展开,取出,晾干,喷10%硫酸乙醇溶液显色,105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中与对照药材色谱相对应位置上,显相同颜色斑点,而阴性对照无干扰。

2.3 水蛭的薄层色谱鉴别 取本品内容物10 g,加丙酮40 mL,超声30 min,过滤,滤液挥干,残渣加无水乙醇1 mL溶解,作为供试品溶液。另取水蛭对照药材1 g,依法制成水蛭对照药材溶液。取水蛭阴性胶囊内容物10 g,依法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法实验^[1],吸取上述4种溶液各 $1\ \mu\text{L}$ 分别点于

同一硅胶G薄层板,以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(4:1:0.1)为展开剂^[5],展开,取出,晾干,喷10%硫酸乙醇溶液显色,105℃加热至斑点显色清晰。日光下,供试品色谱中与水蛭对照药材色谱相应位置上,显相同颜色斑点,阴性对照无干扰;置紫外光灯(365 nm)下,供试品色谱中与水蛭对照药材色谱相应位置上,显相同颜色荧光斑点,阴性对照无干扰。

2.4 丹参的薄层色谱鉴别 取本品内容物5 g,研细,加水20 mL溶解,离心3 min($2\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),上清液用石油醚(30~60℃)萃取3次(20 mL/次),弃去石油醚层,水层用乙酸乙酯^[6]振荡萃取3次(20 mL/次),弃去水层,取乙酸乙酯层蒸干,加乙醇1 mL,作为供试品溶液。另取丹参对照药材3 g,加水60 mL,煎煮1 h,过滤,滤液浓缩至20 mL,依法制成丹参对照药材溶液。取丹参阴性处方胶囊内容物5 g,依法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法实验^[1],吸取阴性对照溶液、供试品溶液各 $3\ \mu\text{L}$ 、丹参对照药材溶液 $15\ \mu\text{L}$ 点于同一硅胶G薄层板,以三氯甲烷-丙酮-甲酸(25:10:4)为展开剂,展开,取出,晾干,置氨蒸汽中熏后,喷5%三氯化铁乙醇溶液显色。日光下,供试品色谱中与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色斑点,阴性对照无干扰。

2.5 枳实的薄层色谱鉴别 取本品内容物5 g,加乙酸乙酯-无水乙醇(1:1)30 mL,超声40 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇3 mL溶解,作为供试品溶液。称取橙皮苷对照品适量,加适量甲醇使其制成饱和溶液,作为对照品溶液。另取枳实对照药材0.5 g,依法制成枳实对照药材溶液。取枳实阴性胶囊内容物5 g,依法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法实验^[1],吸取阴性对照溶液 $10\ \mu\text{L}$ 、供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$ 、枳实对照药材 $2\ \mu\text{L}$ 、橙皮苷对照品溶液 $5\ \mu\text{L}$ 点于同一含羧甲基纤维素钠和1%氢氧化钠硅胶G薄层板,以乙酸乙酯-甲醇-水(80:18:13)为展开剂,展开,取出,晾干,喷三氯化铝试液^[7]显色,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中与对照药材色谱、对照品色谱相应位置上,显相同颜色荧光斑点,阴性对照无干扰。

3 芪蛭皱肺胶囊中黄芪甲苷含量测定^[8]

3.1 色谱条件 色谱柱 Hypersil ODS- C_{18} (4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 甲醇-水(75:25),流速 $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温40℃,蒸发光散射检测器漂移管温度75℃,载气流速 $2.1\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

3.2 溶液的制备 对照品溶液的制备:将黄芪甲苷对照品置五氧化二磷真空干燥器中干燥至恒重,

取约 5.6 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,4 ℃ 贮存,备用。

供试品溶液的制备:取本品内容物约 2.5 g,精密称定,加 1.0 mL 氨水润湿 5 min,再加 50 mL 水、40 mL 正丁醇,加热回流提取 2 h,放冷,加入适量 NaCl 至饱和,离心 5 min(2 000 r·min⁻¹),取上层正丁醇层浓缩至 2~3 mL 后,置于 10 mL 量瓶中加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

阴性对照溶液的制备:精密称取阴性胶囊约 2.5 g,依法制备阴性对照溶液。

3.3 专属性考察 在以上色谱条件下,取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液分别进样 10 μL,记录色谱图,黄芪甲苷的保留时间适中,分离度高($R > 1.5$),按黄芪甲苷峰计算,理论塔板数在 4 000。

3.4 线性关系考察 精密量取黄芪甲苷对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL,分别定容于 10 mL 量瓶,进样 10 μL,按上述色谱条件进行分析,测

定峰面积,以黄芪甲苷进样质量(μg)的自然对数值 Y 为因变量,峰面积的自然对数值 X 为自变量,得线性回归方程为 $Y = 0.779 2 X - 4.315 9$ ($r = 0.999 7$),黄芪甲苷进样量在 0.28 ~ 1.68 μg 有较好的线性关系。

3.5 精密度试验 精密吸取上述 140 mg·L⁻¹ 对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 2.89%。

3.6 稳定性试验 精密吸取上述对照品溶液 10 μL,分别于 0, 4, 8, 12, 24, 36 h 进样,测定,黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 1.72%。

3.7 重复性试验 取同一批样品胶囊约 2.5 g, 5 份,按 3.2 项制备样品并测定,黄芪甲苷含量的 RSD 为 2.19%。

3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品约 2.5 g, 6 份,分别精密加入一定量黄芪甲苷对照品,按 3.2 项制备样品并测定,计算回收率,平均回收率为 97.97%, RSD 为 2.21%,结果见表 1。

表 1 黄芪甲苷加样回收率试验

实验号	称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	2.502 3	0.425	0.340	0.752	98.36		
2	2.501 6	0.425	0.340	0.747	97.70		
3	2.500 9	0.425	0.425	0.825	97.06	97.97	2.21
4	2.501 8	0.425	0.425	0.805	94.71		
5	2.501 3	0.425	0.510	0.923	98.67		
6	2.501 1	0.425	0.510	0.950	101.33		

3.9 样品测定 取 3 批自制样品,按供试品溶液制备方法制备,依法测定,计算样品中黄芪甲苷的含量,每批平行测定 3 次,结果见表 2。由于本品每粒内容物 0.5 g,每粒胶囊含黄芪甲苷应不少于 0.08 mg。见图 1。

表 2 芪蛭邹肺胶囊含量测定($\bar{x} \pm s, n = 3$) mg·g⁻¹

批号	黄芪甲苷含量			平均含量
	1	2	3	
20081201	0.17	0.17	0.18	0.17
20081202	0.18	0.20	0.18	0.19
20081203	0.19	0.19	0.21	0.20

4 讨论

由于黄芪为处方的君药,在制剂中所占比例较大,因此对黄芪进行了定性、定量分析,所得方法简便、灵敏、具有专属性,可起到较好的质量控制作用。供试品处理时,采用氨水洗涤可有效除去黄酮类成

分,消除背景色干扰^[9-10],经比较,该法优于 2010 年版《中国药典》一部黄芪项下的方法及其他方法。经参考文献,黄芪的展开剂在药典的基础上加入中等极性的乙酸乙酯,已调整此展开系统的极性及其互溶程度^[11]。

在测定黄芪甲苷含量时,样品制备采用了氨水-正丁醇双相溶剂加热回流提取的方法,使酸性物质充分进入水相,再通过调整流动相组成及比例优化分离条件,经实验发现该方法不但黄芪甲苷的回收率高、干扰小、基线噪音小、定量谱图能达到较好的效果,而且操作比已有文献中的样品制备方法简便。回流提取时间经 60~150 min 考察,发现在提取 120 min 后黄芪甲苷提取量不再增加^[12]。

相关文献中赤芍的薄层色谱展开剂为三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇^[13],经 8:1:2~8:2:2~8:3:2 调整,基本达到分离,主斑点 Rf 值适中,但拖尾现象明

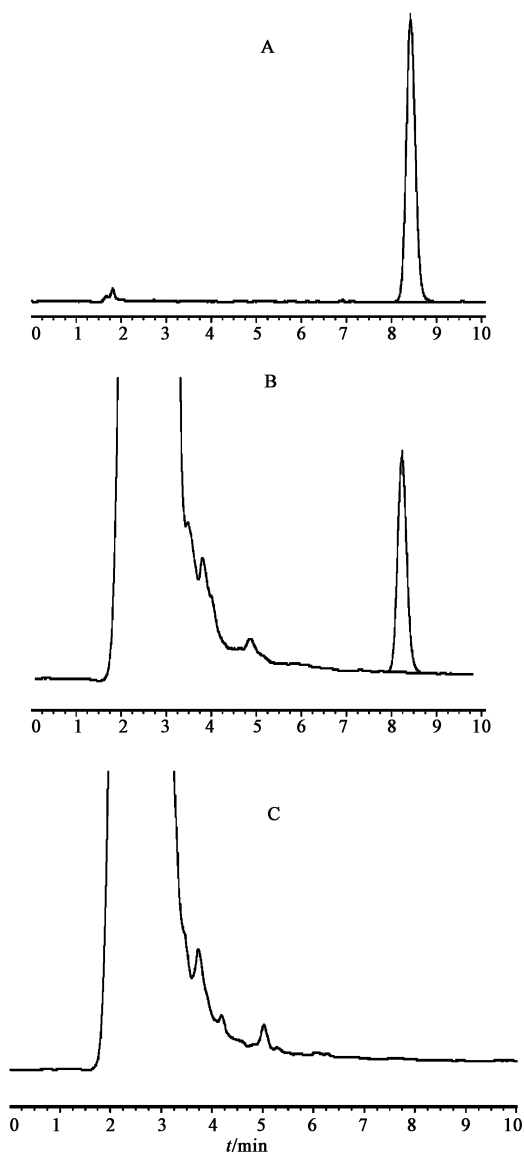


图1 黄芪甲苷对照品(A)、芪蛭皱肺胶囊(B)及阴性对照(C)HPLC色谱

显,经加入甲酸0.04份后拖尾现象消失,所有斑点均圆整,阴性无干扰。

药典中水蛭药材的样品提取溶剂为甲醇,实验发现,甲醇极性大,提取成分复杂,薄层验证斑点杂而多,而极性相对稍小的丙酮所提取成分简单,斑点清晰,分离度高。用丙酮制备的样品薄层Rf值约0.12与0.75处的蓝色小斑点经多次重复在对照药材与阴性样中均未出现,可能系成分间增溶或反应

所致。

由于本制剂中的药材含有较多极性相似成分,在薄层色谱鉴别中相互干扰现象比较严重,为保证各味药鉴别色谱的专属性,在建立上述5味药的鉴别方法时,根据不同药材中成分的细微差别摸索确定的样品制备方法及其薄层展开剂的组成与配比均与药典和文献中相应药材的鉴别方法有所不同。

在丹参薄层色谱中丹参药材的专属性斑点Rf值偏大,在Rf值0.5处为非专属性斑点,经多次调整色谱条件专属性斑点Rf值均在0.65~0.8。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:附录ⅥB.
- [2] 焦扬,傅开龙,周平安.慢性阻塞性肺病中医药临床研究评述[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(12):951.
- [3] 何军强.中医对COPD病因病机的认识及中医固本治疗[J].陕西中医学院学报,2005,28(3):12.
- [4] 倪慧,陈蕾,卿德刚.痛痹丸的薄层色谱鉴别[J].中国中医药科技,2006,13(3):112.
- [5] 曾聪彦,梅全喜,吴惠妃,等.黄蛭口服液的薄层鉴别研究[J].中医药学刊,2006,24(9):1669.
- [6] 齐建波,胡佳.健乳胶囊的薄层鉴别研究[J].时珍国医国药,2006,17(10):2016.
- [7] 张志红,刘爱芹,于胜海,等.咳喘宁冲剂的薄层色谱鉴别[J].齐鲁药事,2005,24(5):288.
- [8] 王鹏,叶利明,刘海峰,等.高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定当归补血颗粒中黄芪甲苷的含量[J].药物分析杂志,2006,26(10):1377.
- [9] 孙黎,姚晓东,苏克剑.肾八味胶囊的薄层定性鉴别[J].中国药师,2007,10(10):1045.
- [10] 雷钧涛,吕世杰,任旷,等.TLC法定性鉴别芩丹颗粒中四味中药[J].中国药房,2008,19(3):194.
- [11] 吴健,夏伦祝,孟梅尔.养肝益水颗粒质量标准的研究[J].中国中医药科技,2008,15(4):291.
- [12] 孙东东,李祥,邱荣丽,等.糖尿平胶囊质量标准研究[J].时珍国医国药,2006,17(3):385.
- [13] 王志萍,韦慧鲜,申文慧,等.脑血栓片中芍药苷的定性定量测定[J].时珍国医国药,2008,19(5):1161.

[责任编辑 蔡仲德]

HPLC 测定 11 种中药口服液中 6 种防腐剂的含量

孙蒙*, 闫小玉, 毕开顺, 陈晓辉
(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定中药口服液体制剂中防腐剂含量的方法。方法:Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 240 nm, 柱温 30 °C。结果:苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸酯类在 1.0 ~ 181.1 mg·L⁻¹ 线性关系良好($r > 0.999$); 平均回收率 95.5% ~ 100.8% (RSD 0.7% ~ 1.5%)。结论:方法简单、可靠, 精确, 可用于中药口服液体制剂中防腐剂含量的测定。

[关键词] 口服液体制剂; 苯甲酸; 山梨酸; 对羟基苯甲酸酯; 测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0076-04

Simultaneous Determination of Preservatives in Traditional Chinese Oral Liquid Preparation by HPLC

SUN Meng*, YAN Xiao-yu, BI Kai-shun, CHEN Xiao-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of preservatives in traditional chinese oral liquid preparation. **Method:** The chromatographic separation was achieved on a Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution as mobile phase (gradient elution). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detective wavelength was set at 240 nm, and the column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** Benzoic acid, sorbic acid and parahydroxybenzoate ester have a good resolution and linear correlation in certain range, respectively ($r > 0.999$). The average recoveries were 95.5% - 100.8% (RSD 1.5% - 1.8%). **Conclusions:** The method is simple, reliable and accurate for determination of preservatives in traditional chinese oral liquid preparation.

[Key words] oral liquid preparation; benzoic acid; sorbic acid; parahydroxybenzoate ester; determination

防腐剂能抑制微生物的生长和繁殖, 延长药品的保存期限。但过量摄入防腐剂会对人体产生危害。口服液体制剂通常选用苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐剂, 在浓度上要求很高, 多了对咽喉刺激性大, 少了达不到防腐效果。苯甲酸对胃、皮肤和黏膜均有一定的刺激性^[1], 山梨酸的不良反应是刺激性和接触性皮炎, 对羟基苯甲酸酯类口服产生延迟型接触性皮炎也有报道^[2]。为保证用药安全, 有必要控制防腐剂的使用和用量。本文建立 HPLC 同时测定苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐

剂的含量。

1 仪器与试剂

Hitachi L-2300 高效液相色谱仪及 L-2130 紫外检测器, 旗美 QT-330 柱温箱, BP210S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯对照品, 纯度 > 98%。乙腈为色谱纯, 乙酸铵为分析纯, 水为娃哈哈水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 大连中汇达公司), 流动相乙腈(A)-20 mmol·L⁻¹ 的乙酸铵溶液(B), 梯度洗脱[0 min, A-B(8:92); 9 min, A-B(8:92); 25 min, A-B(85:15)]; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 240 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。在此色谱条件

[收稿日期] 20110627(010)

[通讯作者] * 孙蒙, 从事药物分析, Tel: 024-23986259, E-mail: 424734643@qq.com