

冠脉通片质量控制研究

贾 勋¹, 张丽芳¹, 王 佳¹, 孟凡英²

1. 天津同仁堂集团股份有限公司, 天津 300385

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 建立冠脉通片的质量控制方法。方法 采用 TLC 法, 分别以甲苯-醋酸乙酯-甲酸 (15:2:1)、乙酸丁酯-甲酸-水 (1.3:1:1) 10 °C 下放置的上层溶液为展开剂对何首乌及淫羊藿进行薄层色谱鉴别; 采用气相色谱法, 以水杨酸甲酯为内标物, 安捷伦 DB-WAX 毛细管柱 (30 m×0.53 mm, 1 μm), FID 检测器, 载气为氮气, 柱温为 140 °C, 测定冠脉通片中的冰片; 采用高效液相色谱法, Dikma-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.5% 乙酸 (88:12) 为流动相, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 281 nm, 柱温 25 °C, 测定冠脉通片中的丹参素。结果 薄层鉴别中样品色谱斑点清晰, 分离较好; 气相色谱中, 冰片中龙脑及内标物水杨酸甲酯均得到良好的分离, 冰片的平均回收率为 96.72% (RSD 为 0.67%); HPLC 测定丹参素在 0.100 8~0.604 8 μg 与峰面积值线性关系良好 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 100.22% (RSD 为 1.15%)。结论 本实验建立的方法简便、准确、可靠, 可用于冠脉通片的质量控制。

关键词: 冠脉通片; 何首乌; 淫羊藿; 冰片; 丹参素; 质量控制

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)01-0022-05

Quality control for Guanmaitong Tablets

JIA Xun¹, ZHANG Li-fang¹, WANG Jia¹, MENG Fan-ying²

1. Tianjin Tongrentang Group Co., Ltd., Tianjin 300385, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish quality standard for Guanmaitong Tablets. **Methods** Taking methylbenzene-ethyl acetate-formic acid and butyl acetate-formic acid-water as developing agent, *Polygoni Multiflori Radix* and *Epimedii Folium* were identified by TLC. The internal standard method was employed. Methyl salicylate, as internal standard, was added to the sample before treatment. The GC system consisted of Agilent DB-WAX, FID as the detector, nitrogen as carrier gas, and column temperature at 140 °C. Borneol in Guanmaitong Tablets was determined by GC and salvianolic acid A by HPLC. The chromatographic separation was achieved on a Dikma-C₁₈ column with a mobile phase of methanol-0.5% acetic acid solution (88:12). The flow rate was 1.0 mL/min; The detection wavelength was set at 281 nm, and column temperature at 25 °C. **Results** TLC spots developed were fairly clear and the blank test showed no interference. Camphor borneol and methyl salicylate were separated well under the chromatographic condition. The average recovery of synthetic borneol was 96.72%. The calibration curve was linear within range of 0.100 8—0.604 8 μg ($r = 0.999\ 8$). The average recovery was 100.22%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, and specific. It could be used for the quality control of Guanmaitong Tablets.

Key words: Guanmaitong Tablets; *Polygoni Multiflori Radix*; *Epimedii Folium*; borneol; danshensu; quality control

冠脉通片由枸杞子、何首乌、淫羊藿、红花、石菖蒲、丹参、桑寄生、冰片 8 味药材组成, 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第 19 册》, 现执行药品标准为 WS₃-B-3619-98。其有活血化瘀、芳香开窍、补益肝肾之功效^[1], 常用于肝肾不足, 痰瘀阻络之胸痹, 表现为心悸胸闷、胸痛头晕, 冠心病、心绞痛见以上证候的患者。本实验建立了制剂中何首乌、淫羊藿的薄层色谱鉴别

方法, 冰片的气相色谱测定方法^[2-4]及丹参素的高效液相色谱测定方法用以控制其质量^[5]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 4890 型气相色谱仪, Agilent 1200 高效液相色谱仪 (四元泵、自动进样器、vwd 检测器等), Chemstation 色谱工作站; 超声波清洗器 (上海超声仪器厂)。

收稿日期: 2011-09-18

作者简介: 贾 勋 (1984—), 男, 助理工程师。

*通讯作者 王 佳 (1984—), 女, 本科, 助理工程师。E-mail: jessica_water@163.com

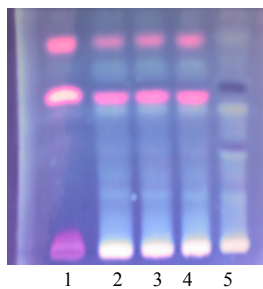
1.2 试药

何首乌对照药材(批号 120934-200507)、淫羊藿对照品(批号 110737-200415)、龙脑对照品(批号 110881-200706)、水杨酸甲酯(批号 110707-200107)、丹参素钠对照品(批号 110855-200508)均由中国食品药品检定研究院提供;冠脉通片(批号 886002、081001、081002、887034、891035、987018、987019)由天津同仁堂集团股份有限公司提供;缺何首乌冠脉通片空白样品(自制)、缺淫羊藿冠脉通片空白样品(自制)、缺龙脑冠脉通片空白样品(自制)、缺丹参冠脉通片空白样品(自制);水(重蒸水);其他为分析纯试剂。

2 薄层色谱鉴别

2.1 何首乌的薄层色谱鉴别

取冠脉通片7片,除去包衣,研细,加乙醇100 mL,加热回流1 h,滤过,滤液浓缩至3 mL,作为供试品溶液。取何首乌对照药材0.3 g,加乙醇50 mL,同法制成对照药材溶液。按处方量取除何首乌的其他药味根据制法制成的空白样品粉末2 g,按供试品溶液的制备方法制成空白样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VI B)试验,分别吸取上述两种溶液各10~15 μL,点于同一活化后的硅胶G薄层板上,以甲苯-醋酸乙酯-甲酸(15:2:1)为展开剂展开,取出晾干,置365 nm紫外灯下检视。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。结果见图1。



1-何首乌对照药材 2~4-冠脉通样品(886002、081001、081002)
5-空白样品
1- reference crude drug of *Polygoni Multiflori Radix*
2—4- sample of Guanmaitong Tablets (886002, 081001, 081002)
5- blank sample

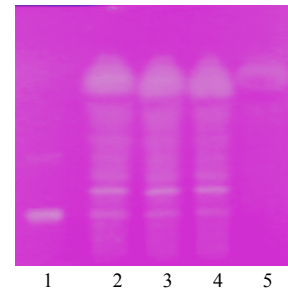
图1 何首乌的薄层色谱图

Fig. 1 TLC of *Polygoni Multiflori Radix*

2.2 淫羊藿的薄层色谱鉴别

取冠脉通片7片,除去包衣,研细,加醋酸乙酯50 mL,超声40 min,滤过,滤液蒸干,残渣加

1 mL 乙醇溶解,作为供试品溶液。另取淫羊藿对照品,加甲醇制成1 mg/mL溶液,作为对照品溶液。按处方量取除淫羊藿的其他药味根据制法制成的空白样品粉末2 g,按供试品溶液的制备方法制成空白样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VI B)试验,分别吸取对照品溶液5~10 μL、供试品溶液10~15 μL,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶H薄层板上,以乙酸丁酯-甲酸-水(1.3:1:1)10 °C下放置的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%三氯化铝试液,105 °C烘2~5 min,置365 nm紫外灯下检视。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。结果见图2。



1-淫羊藿对照品 2~4-冠脉通样品(886002、081001、081002)
5-空白样品
1-icariin reference substances 2—4- samples of Guanmaitong
Tablets (886002, 081001, 081002) 5- blank sample

图2 淫羊藿的薄层色谱图

Fig. 2 TLC of *Epimedii Folium*

3 冰片的气相色谱测定

3.1 色谱条件

DB-WAX 毛细管色谱柱(30 m×0.53 mm, 1 μm),FID 检测器;柱温140 °C,进样口温度180 °C,检测器温度220 °C;载气氮气,燃气氢气,氮气柱体积流量5 mL/min,补偿气28 mL/min;空气330 mL/min,氢气33 mL/min。手动进样,分流进样,分流口体积流量50 mL/min,分流比1:10,进样体积1 μL。

3.2 溶液的制备

3.2.1 内标溶液的制备 精密称取水杨酸甲酯适量,加醋酸乙酯制成5.0 mg/mL溶液,摇匀备用。

3.2.2 对照品溶液的制备 精密称取龙脑对照品7.8 mg到10 mL量瓶,加内标液1 mL,醋酸乙酯补至刻度,摇匀备用,质量浓度为0.78 mg/mL。

3.2.3 供试品溶液的制备 精密配制内标液与醋酸乙酯配成1:9的混合溶液。取冠脉通片10片,除

去包衣, 研细, 精密称取 1 g, 精密加入上述混合溶液 20 mL, 称定质量, 超声提取 40 min, 凉至室温, 称定质量, 用混合溶液补足损失的质量, 摇匀静置后上清液过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜即得。

3.2.4 空白样品溶液的制备

取缺龙脑空白样品 1 g, 按供试品溶液制备方法进行制备, 得空白样品对照溶液。

3.3 专属性试验

采用内标物法测量冰片中的龙脑, 特征峰与其他组分分离效果较好, 空白实验无干扰。见图 3。

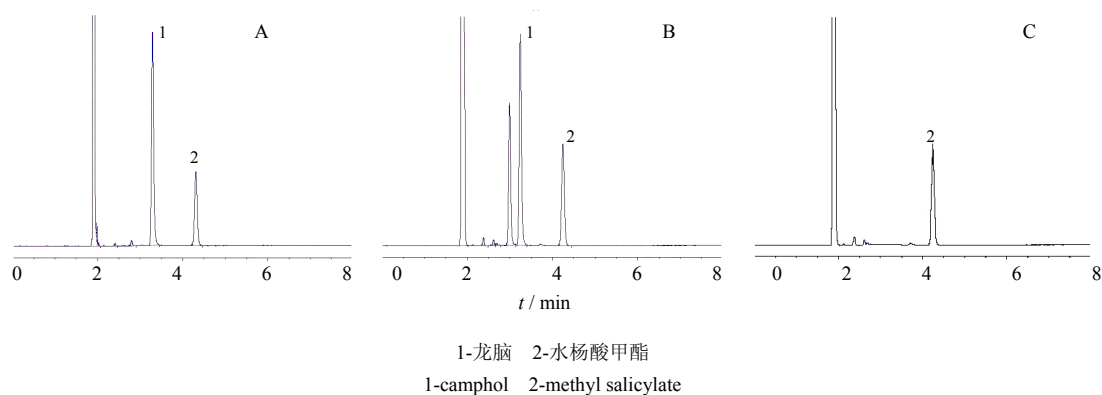


图 3 冠脉通片对照品 (A)、供试品 (B)、空白样品 (C) 的气相色谱图

Fig. 3 GC chromatograms of reference substances (A), samples tested (B), and blank samples (C) of Guanmaitong Tablets

3.4 线性关系考察

精密称取龙脑对照品适量, 加醋酸乙酯制成 2.1 mg/mL 龙脑对照品溶液。分别吸取 1、2、3、4、5 mL 及 1 mL 内标液于 10 mL 量瓶中, 醋酸乙酯标定至刻度, 摇匀备用。按“3.1”项下条件进样 2 次, 每次 1 μL , 依法测定龙脑及内标物水杨酸甲酯的峰面积, 以龙脑与内标物峰面积比对进样量 (μg) 进行回归处理, 得回归方程 $Y = 3.006X + 0.026$ ($r=0.9999$)。结果表明, 龙脑进样量在 0.21~1.05 μg 与龙脑和内标峰面积的比值有良好的线性关系。

3.5 精密度试验

取批号为 886002 样品按“3.2.3”项下方法进行处理, 按“3.1”项下条件重复进样 6 次, 以龙脑对照品峰面积与内标峰面积的比值计算 RSD 为 0.80%, 结果表明精密度良好。

3.6 稳定性试验

精密吸取“3.4”项下供试品溶液 1 μL 于 0、2、4、6、8、12 h 各进样一次, 按“3.1”项下条件测定, 以龙脑对照品峰面积与内标峰面积比值的 RSD 为 0.57%, 表明龙脑在 12 h 内进行测定含量稳定。

3.7 重现性试验

取批号为 886002 批冠脉通片样品, “3.2.3”项下方法进行处理 6 份, 按“3.1”项下条件测定, 平均为 11.96 mg/g, RSD 为 1.001%, 结果表明实验重现性良好。

3.8 加样回收率试验

精密称取龙脑对照品适量加入内标液与醋酸乙酯 1:9 的提取液中配制含龙脑 0.30 mg/mL 的溶液。精密称取批号为 886002 样品 0.5 g 各 6 份, 分别加入上述龙脑对照品溶液 20 mL, 称定质量, 超声提取 40 min, 凉至室温, 称定质量, 用混合溶液补足损失的质量, 摇匀静置后上清液过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得, 作为供加样回收用的供试品溶液。按“3.1”项下条件测定, 计算平均回收率为 96.72%, RSD 为 0.67%。

3.9 样品测定

取不同批次的样品, 按“3.2.3”项下方法进行处理, 按“3.1”项下条件测得各自龙脑的量, 批号为 081001、081002、887034、891035、987018、987019 的样品测定结果分别为 3.94、9.10、2.27、2.15、2.79、3.42 mg/片 ($n=2$)。

4 丹参素的高效液相色谱测定

4.1 色谱条件

美国 Dikma 公司 C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.5% 醋酸溶液-甲醇 (12:88), 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 281 nm, 进样 10 μL 。

4.2 溶液的制备

4.2.1 对照品溶液的制备 取丹参素钠对照品精密称定 2 mg 到 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇制成 0.04

mg/mL 丹参素钠溶液（相当于丹参素质量浓度为 0.036 mg/mL），摇匀，即得。

4.2.2 供试品溶液的制备 取冠脉通片 20 片，除去包衣，研细，精密称取 2 g，精密加入 50% 甲醇 50 mL，称定质量，超声提取 30 min，放冷，用 50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，离心，取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜，即得。

4.2.3 空白对照溶液的制备 取缺丹参药材的空白样品 2 g，按照“4.2.2”项下方法操作，即得。

4.3 专属性试验

按“4.1”项下条件分析，进样，即得。由图谱可知，空白样品中相应丹参素峰位置上无干扰，结果见图 4。

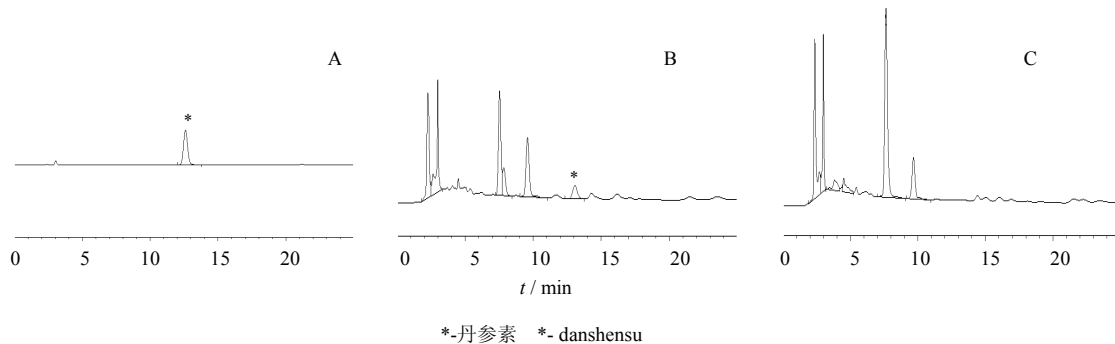


图 4 对照品 (A)、供试品 (B)、空白样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of reference substances (A), samples tested (B), and blank samples (C) in Guanmaitong Tablets

4.4 线性关系考察

精密称取丹参素钠对照品 7 mg（含丹参素 6.3 mg），置 50 mL 棕色量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，作为储备液，再分别取 2、4、6、8、10、12 mL 于 25 mL 量瓶，50% 甲醇定容至刻度，分别进样 10 μL，按“4.1”项下条件分析，测定峰面积，以丹参素对照品进样量（μg）为横坐标，峰面积值为纵坐标，绘制丹参素标准曲线，得回归方程 $Y=718.353X+2.457$ ($r=0.9998$)，结果表明丹参素在 0.100 0~0.601 9 μg 线性良好。

4.5 精密度试验

取 886002 批冠脉通片样品，除去包衣，研细，按照“4.2.1”项下方法精密称取 2 g，精密加入 50% 甲醇 50 mL，按“4.1”项下条件分析，连续进样 6 次，测得其峰面积值 RSD 为 1.04%，符合要求。

4.6 重现性试验

取 886002 批冠脉通片样品，除去包衣，研细，按照“4.2.2”项下方法精密称取 2 g，共 6 份，分别精密加入 50% 甲醇 50 mL 按“4.1”项下条件每份进样两次求平均值，测得丹参素质量分数为 0.958 5 mg/g，RSD 为 1.09%，符合要求。

4.7 稳定性试验

取 886002 批冠脉通片样品，除去包衣，研细，按照“4.2.2”项下方法精密称取 2 g，精密加入 50% 甲醇 50 mL，按“4.1”项下条件分析，分别在 0、2、

4、6、8、16 h 进样，测得各自峰面积值的 RSD 为 1.12%，符合要求。

4.8 回收率试验

取 886002 批冠脉通片样品，除去包衣，研细，精密称取 1 g，共 6 份，分别精密加入 0.022 mg/mL 丹参素对照溶液（相当于 0.019 5 mg/mL 丹参素）50 mL，再按照“4.2.2”项下方法制备供回收率测定用供试品溶液，按“4.1”项下条件进样分析，计算丹参素回收率，结果平均回收率为 100.22%，RSD 为 1.15%。

4.9 冠脉通片中丹参素测定

取样品（均为糖衣片），按照“4.2.2”项下方法操作，按色谱条件测定了 6 批冠脉通片的丹参素，批号为 081001、081002、887034、891035、987018、987019 的样品测定结果分别为 0.284、0.247、0.206、0.217、0.184、0.193 mg/片 ($n=2$)。

对 6 批样品进行检测，得出每片含丹参素的平均值为 0.222 mg；由于传统工艺中丹参采用水提取法，加上制剂过程中存在不可避免的损失，本课题组拟定冠脉通片中丹参素测定指标为 6 批冠脉通片平均值的 75%，即以冠脉通片每片含丹参按丹参素计，不得少于 0.17 mg。

5 讨论

本实验建立的制剂中何首乌、淫羊藿的薄层色谱鉴别方法，冰片的气相色谱测定方法及丹参素的高效液相色谱测定方法均简便、准确、可靠，可用

于控制该制剂的质量。

5.1 薄层色谱鉴别

5.1.1 何首乌的 TLC 鉴别 该方法能有效分辨出两个特征点,且空白样品中无干扰,其 Rf 值分别为 0.63 和 0.88。试验中曾用过《中国药典》和一些文献中的何首乌鉴别法,结果表明,药典方法中采用二次展开操作步骤比较繁琐,色谱图中两特征点比较接近,无法确定;而某些文献中的方法 Rf 值过高,不适于鉴别。本方法中采用活化后的硅胶 G 板分离效果较好,而未活化过的分离度较差,故采用 105℃ 烘干 1 h 活化处理的硅胶 G 板进行试验。

5.1.2 淫羊藿的 TLC 鉴别 本试验未采用 2010 版《中国药典》中淫羊藿的薄层鉴别方法:“乙醇温浸 30 min,以醋酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:1:1:1)为展开剂,喷以 1%三氯化铝试液置紫外灯 365 nm 下检视”。因实验条件中乙醇温浸时间长且溶出杂质过多,展开系统效果不利于实验的快速有效进行,故更换提取系统为醋酸乙酯超声提取,展开系统醋酸乙酯-丁酮-甲酸-水(1:3:1:1)且将显色剂的浓度增加到了 5%,加热烘烤后紫外 365 nm 下斑点明显,且空白样品无干扰,其 Rf 值为 0.33。

5.2 气相色谱的测定

5.2.1 提取溶媒的考察 根据冰片中龙脑的性质曾选用过水、甲醇、乙醇、醋酸乙酯等溶剂提取,试验结果表明相同溶剂量下醋酸乙酯溶出的龙脑量最多、杂质溶出最少,表明提取效果最好,故选用醋酸乙酯为实验的提取溶剂。

5.2.2 提取方法与时间的选择 冠脉通片中的冰片药材为易挥发物质且受热和长时间处理会加剧挥发,本实验先后比较过超声法、回流法、挥发油类回流法等,结果表明只有超声法得到的龙脑损失最少且操作简便适于生产检验,又试验提取时间 30、40 和 50 min,结果表明 40 min 龙脑提取量最高,所以确定超声 40 min 为实验提取方法。

5.2.3 计算方法的选择^[5] 由于为手工进样,留针时间、室温等对进样量的影响使进样量不易精确控制,故采用内标法定量,水杨酸甲酯为测定龙脑常用内标物,试验证明与样品中峰无干扰、性质稳定不易变化,故实验用水杨酸甲酯为内标物测定冰片中龙脑,实验中多以龙脑和水杨酸甲酯峰面积的比值为考察因素。

5.2.4 柱气量与分流比的选择 经反复试验以体积流量为 5 mL/min 和分流比 1:10 分离效果最佳且易

于控制,不会造成样品峰失真。

5.3 高效液相色谱的测定

5.3.1 提取溶媒的考察 曾用水,0.5%醋酸水溶液,70%、50%、30%甲醇提取样品中丹参素,发现 50%甲醇与 0.5%醋酸水溶液比较,提取出的杂质相对较少,提取效率最高,且 50%甲醇分离度好,影响的杂质峰较 0.5%醋酸水溶液少,故采用 50%甲醇为样品提取丹参素的溶剂。

5.3.2 提取方法的选择 查阅相关文献得知,丹参中丹参素的量不稳定,在受热后丹参中其他成分(丹酚酸 B 等)会向丹参素转化,影响测定的准确性^[7],故采用不受热的超声方法提取制剂中的游离丹参素。

5.3.3 提取时间的考察^[8] 精密称取同一样品,除去糖衣,研细,精密称取 2 g 共 8 份,各精密加入 50%甲醇溶液 50 mL,分别超声提取 20、30、40、60 min 测定峰面积,所得结果比较,超声 30 min 所测结果高于 20 min,与超声 40 及 60 min 时所测结果比较无明显变化,故采用超声 30 min 提取。

5.3.4 流动相及色谱柱的选择 曾采用乙腈-水(70:30)、甲醇-水(80:20)、0.5%醋酸水-甲醇(75:25、80:20、85:15、88:12)等流动相,经比较采用甲醇-0.5%醋酸水(85:15)为流动相,因为考虑到丹参素热不稳定和水溶性所以提取时设计为超声处理,但相应除杂不是太完全要求色谱柱效高分离性能好,故使用美国 Dikma 公司 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱分离效果良好,丹参素峰与相邻杂质峰分离度大于 1.5。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制剂 [S]. 19 册. 1993.
- [2] 邢俊波,曹红. 气相色谱法测定脑通注射液中冰片的含量 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2245-2246.
- [3] 许妍,周彦如. 气相色谱法测定健心片中冰片的含量 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1090-1091.
- [4] 郭军,黄熙,王骊丽,等. GC-FID 法同步测定人含服速效救心丸后血中冰片、川芎嗪含量 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 730-732.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 于绍华,李启红. 气相色谱内标法测定冰片含量的不确定度分析 [J]. 内蒙古中医药, 2010, 15: 112-113.
- [7] 毛声俊,侯世祥,唐昌炯,等. 丹参素在加温加速条件下的含量变化规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 02(28): 220-222.
- [8] 倪力军,史晓浩,高秀蛟,等. 提取时间、溶剂对丹参提取物质量的影响研究 [J]. 中成药, 2003, 10(25): 780-782.