

冠脉丸质量标准的研究

王春胜¹, 魏魁东¹, 刘茂军², 赵月霞¹, 李 丽¹

(1. 天津市汉沽区中医医院, 天津 300480; 2. 天津市和平区中医医院, 天津 300070)

冠脉丸是由丹参、延胡索、人参、茯苓、白术、炙甘草、瓜蒌、薤白、法半夏等14味中药组成的医院复方制剂, 具有益气活血、通阳散结、行气止痛的功效, 主要用于治疗气虚血瘀、痰浊中阻、胸阳不振所致的心前区疼痛、胸闷憋气等症。方中的丹参和延胡索为重要药味, 并且丹参中的丹参酮和延胡索中的生物碱与本制剂的药理作用密切相关。因此, 本实验建立了冠脉丸中丹参与元胡的定性及相关活性成分的定量分析方法, 以为制剂的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

岛津 LC-6A 高效液相色谱仪; LC-6A 输液泵, SPD-6AV1 紫外检测器, SCL-6B 色谱系统控制器, VST 色谱工作站; BP210S 型电子天平。

丹参酮 I_A 对照品 (批号 110766-200416)、延胡索乙素对照品 (批号 0726-200208)、丹参对照药材 (批号 120923) 和延胡索对照药材 (批号 120928) 均由中国药品生物制品检定所提供; 薄层色谱用硅胶 G (青岛海洋化工厂); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为市售分析纯; 冠脉丸由原天化医院提供, 9 g/丸; 冠脉丸处方中所用药材均由天津市汉沽区中医医院提供, 经笔者鉴定, 符合《中国药典》2005 年版一部的有关规定。

2 方法与结果

2.1 丹参的薄层色谱鉴别: 取冠脉丸数丸, 除去包装, 40℃低温烘干 2 h, 加硅藻土按照质量比 1:1 混合, 研匀; 取粉末约 9 g, 加氯仿 70 mL, 加热回流 1.5 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取除去丹参的阴性对照按照供试品溶液的制备方法操作, 同法制备阴性对照溶液。另取丹参酮 I_A 对照品适量, 加甲醇制成 2 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。取丹参对照药材 0.5 g, 加乙醚 5 mL, 置具塞试管中, 振摇, 放置 1 h, 滤过, 滤液挥干, 残渣加醋酸乙酯 1 mL, 使溶解, 即得丹参对照药材溶液。吸取丹参酮 I_A 对照品溶液 2 μL、阴性对照溶液、丹参对照药材溶液和供试品溶液各 5 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-醋酸乙酯

(19:1) 为展开剂, 展开, 取出晾干, 在日光下检视, 结果供试品色谱中, 在与对照品和对照药材色谱相应的位置上, 显相同的淡黄色斑点, 而阴性对照色谱中无相应斑点。

2.2 延胡索的薄层色谱鉴别: 取冠脉丸数丸, 除去包装, 40℃低温烘干 2 h, 加硅藻土按照质量比 1:1 混合, 研匀; 取约 9 g, 加乙醇-氨试液 5 mL 研匀, 加苯 30 mL 加热回流 2 h, 滤过, 滤液用 20% 盐酸提取 3 次 (20、15、15 mL), 合并酸液, 加氨试液使成碱性, 摇匀, 用氯仿提取 3 次 (25、20、20 mL), 合并氯仿液, 水洗后用无水硫酸钠脱水并浓缩至约 1 mL, 作为供试品溶液。取除去延胡索的阴性对照按照供试品溶液的制备方法操作, 同法制备阴性对照溶液。取延胡索对照药材 0.5 g, 加甲醇 25 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水溶解, 加浓氨试液调至碱性, 用乙醚提取 3 次, 每次 10 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得延胡索对照药材溶液。吸取阴性对照液、对照药材溶液和供试品溶液各 10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-乙醇 (5:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以碘化铋钾试液、亚硝酸钠乙醇试液, 结果供试品溶液色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显色剂作用后显相同的亮黄色斑点, 而阴性对照色谱中则无相应斑点。

2.3 丹参酮 I_A 的 HPLC 法测定

2.3.1 色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-水 (56:30:24); 体积流量: 1.2 mL/min; 检测波长: 268 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备: 精密称取丹参酮 I_A 对照品 10 mg, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (含丹参酮 I_A 0.4 mg/mL)。

2.3.3 供试品溶液的制备: 冠脉丸剪碎, 40℃低温烘干 2 h, 加硅藻土按照质量比 1:1 混合, 研匀。取本品粉末约 4.5 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 加甲醇适量, 超声提取 30 min, 放冷, 用甲醇补足减

失的质量,摇匀,离心,滤纸滤过,加甲醇至刻度,用0.8 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3.4 阴性对照溶液制备:取除去丹参的阴性对照粉末约4.5 g,精密称定,按供试品溶液的制备方法操作,即得。

2.3.5 标准曲线的绘制:精密吸取0.4 mg/mL丹参酮Ⅰ_A对照品溶液配制成0.5、1.5、8、10、12、20 μg/mL的溶液,分别吸取20 μL进样测定。以峰面

积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=24\,003\,X-5\,510.4$, $r=0.999\,9$ 。结果表明丹参酮Ⅰ_A在0.5~20 μg/mL与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.6 专属性试验:取丹参酮Ⅰ_A对照品、冠脉丸供试品和除去丹参的阴性对照溶液各20 μL,进样测定,结果见图1。可见阴性对照没有任何干扰。

2.3.7 精密度试验:精确吸取0.4 mg/mL丹参酮

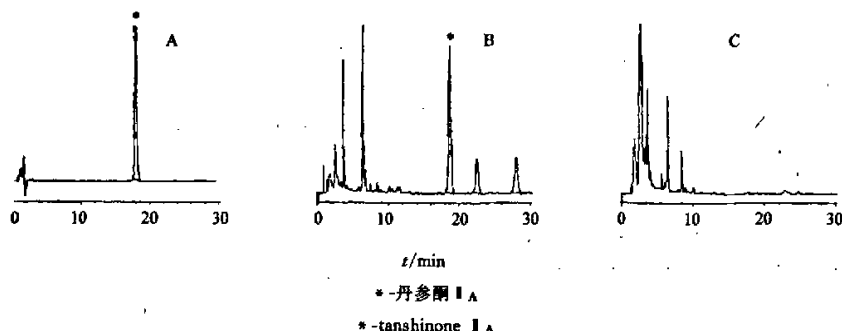


图1 丹参酮Ⅰ_A对照品(A)、冠脉丸(B)和阴性对照(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of tanshinone I_A(A), Guanmai Pill (B), and negative sample (C)

Ⅰ_A对照品溶液20 μL,重复进样6次,测定峰面积,计算,结果其RSD为0.71%。

2.3.8 稳定性试验:将同一供试品溶液分别于0、1、3、6、12、24 h进样20 μL,测定丹参酮Ⅰ_A峰面积,计算,结果其RSD为1.58%。说明供试品溶液中的丹参酮Ⅰ_A在24 h内比较稳定。

2.3.9 重现性试验 取冠脉丸粉末约4.45 g,共6份,分别制备供试品溶液,进样,测定,计算得丹参酮Ⅰ_A的质量分数为15.90 μg/g,RSD为1.28%。

2.3.10 回收率试验:取批号20051的冠脉丸药粉6份,每份约2.50 g,精密称定,加入20 μg/mL丹参酮Ⅰ_A对照品溶液约2 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果平均回收率为98.72%,RSD为1.53%。

2.3.11 样品的测定:取3批样品,分别制备供试品溶液。取供试品溶液和丹参酮Ⅰ_A对照品溶液分别进样20 μL,测定,计算样品中丹参酮Ⅰ_A的质量分数,结果见表1。

表1 冠脉丸中丹参酮Ⅰ_A和延胡索乙素的测定结果($n=2$)

Table 1 Determination of tanshinone I_A and tetrahydropalmatine in Guanmai Pills ($n=2$)

批号	丹参酮Ⅰ _A /(μg·丸 ⁻¹)	延胡索乙素/(μg·丸 ⁻¹)
20051	143.29	2.145
20052	148.71	2.220
20053	138.02	2.380

2.4 延胡索乙素的HPLC法测定

2.4.1 色谱条件:Kromasil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-三乙胺(70:30:0.5);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:室温;进样量:20 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备:精密称取延胡索乙素对照品5 mg置25 mL棕色量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(含延胡索乙素0.2 mg/mL)。

2.4.3 供试品溶液的制备:冠脉丸剪碎,40℃低温烘干2 h,加硅藻土按照质量比1:1混合,研匀。取本品粉末约4.5 g,精密称定,置50 mL锥形瓶中,精密加甲醇60 mL,超声提取30 min,放冷至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤纸滤过,挥去甲醇,加20 mL水混悬,加浓氨水2 mL,用乙醚萃取3次(每次15 mL),合并乙醚液,吹干,残渣用甲醇溶解并加至10 mL量瓶刻度,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.4.4 阴性对照溶液的制备:取除去延胡索的阴性对照粉末约4.5 g,精密称定,按供试品溶液的制备方法操作,即得。

2.4.5 标准曲线的绘制:精密吸取0.2 mg/mL延胡索乙素对照品溶液配制成20、10、5、2.5、1、0.6、0.2、0.1 μg/mL溶液,分别取20 μL进样测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=2\,811\,4\,X+1\,220$, $r=1.000$ 。结果表明延胡索乙素在0.1~20 μg/mL与峰面积呈

良好的线性关系。

2.4.6 专属性试验:取延胡索乙素对照品、冠脉丸供试品和除去延胡索的阴性对照溶液各 20 μ L, 进样测定, 结果见图 2。可见阴性对照没有任何干扰。

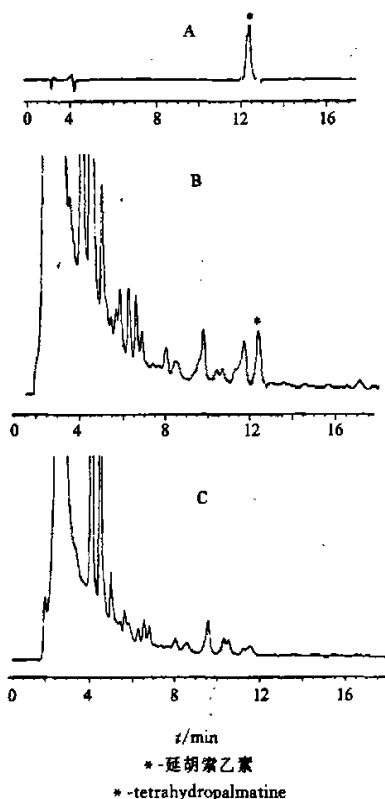


图2 延胡索乙素对照品(A)、冠脉丸(B)和阴性对照(C)的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of tetrahydropalmatine reference substance (A), Guanmai Pills (B), and negative sample (C)

2.4.7 精密度试验 精确吸取 0.2 mg/mL 延胡索乙素对照品溶液 20 μ L, 重复进样 6 次, 测定延胡索乙素峰面积, 计算, 结果其 RSD 为 1.03%。

2.4.8 稳定性试验:吸取同一供试品溶液分别于

0、2、5、12、24 h 进样 20 μ L, 测定延胡索乙素峰面积, 计算, 结果其 RSD 为 1.69%, 说明供试品溶液中延胡索乙素在 24 h 内稳定。

2.4.9 重现性试验:取冠脉丸粉末约 4.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别制备供试品溶液, 进样, 测定, 计算得延胡索乙素的质量分数为 0.24 μ g/g, RSD 为 1.71%。

2.4.10 加样回收率试验:取批号 20051 的冠脉丸药粉 6 份, 每份约 2.50 g, 精密称定, 加入 0.6 μ g/mL 延胡索乙素对照品溶液约 1 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率。结果平均回收率为 100.99%, RSD 为 1.8%。

2.4.11 样品的测定:取 3 批样品, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 采用外标法计算样品中延胡索乙素的质量分数, 结果见表 1。

3 讨论

丹参的测定时, 选择了流动相甲醇-水 (80:20)、(82:18)、甲醇-水-乙腈 (70:20:10)、(65:20:15)、(60:25:15)、(52:23:25)、(46:24:30)、(41:24:35)。结果采用甲醇-水-乙腈 (46:24:30) 作为流动相不仅可以使杂质峰有效地分离, 而且保留时间较适宜。其他流动相虽然可以使杂质峰有效地分离, 但是保留时间过长, 而甲醇-水不能使丹参酮 I_A 与其他杂质峰得到很好的分离。

延胡索的测定预试验时采用硅藻土分散、浓氨水碱化、乙醚冷浸、醋酸萃取、浓氨水再碱化后, 氯仿萃取, 无水硫酸钠脱水的处理方法^[1], 结果效果不好, 经过比较选用了《中国药典》2005 年版一部延胡索项下的直接超声提取的方法, 其提取效果较充分且杂质较少。

Reference:

- [1] Wei H Z, Rao Y, Wang Y M, et al. Determination of dl-tetrahydropalmatine in Yuanhu Zhitong Tablets and Yuanhu Zhitong Solution by HPCE [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2002, 22(4): 272-274.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022) 27474913 23006821

传真: 23006821

联系人: 陈常青