

复方丹参微丸的质量标准研究

★ 冷天平¹ 樊孝贵² (1. 江西省修水县卫生人员进修学校 修水 332400; 2. 江西省修水县人民医院 修水 332400)

摘要:目的:研究复方丹参微丸的质量标准。方法:采用薄层色谱法鉴别了复方丹参微丸中丹酚酸 B 及人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁;同时采用高效液相色谱法对微丸中人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 进行了含量测定。结果:在选择的薄层色谱条件下,斑点显色清晰、分离度好;人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ 分别在 67.92~679.2、66.93~669.3、30.16~301.6 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好;平均回收率人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ 分别为 97.98%、99.95%、98.52%。结论:建立的方法可以作为控制复方丹参微丸质量标准。

关键词:复方丹参微丸;高效液相色谱法;薄层色谱法;人参皂苷 R_{g1};人参皂苷 R_{b1};三七皂苷 R₁;质量标准

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

冠心病为心血管系统常见病,多发病,严重威胁人们的身体健康。现代医学对如何控制和预防冠心病心绞痛的发生仍缺乏有效的对策。复方丹参片收载于《中国药典》2005 版一部^[1],全方由丹参、三七、冰片组成,具有活血化瘀、理气止痛的功效。其组方严谨,疗效确切,不良反应少,是临床治疗冠心病心绞痛的名方。本课题将《中国药典》中复方丹参片进行剂型改进,方中丹参、三七采用大孔树脂进行精制,分别得到丹参总酚酸及三七总皂苷,再将提取物与冰片制成速释微丸,再灌装胶囊,本制剂具有服用量小、释药迅速、生物利用度高、见效快的优点。本实验主要对复方丹参微丸的质量标准进行了研究。

1 仪器、材料和试剂

丹酚酸 B、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ 对照品均购自中国药品生物制品检定所;丹参总酚酸、三七总皂苷自制;复方丹参微丸自制。

甲醇:色谱醇,上海振兴化工厂;乙腈:色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂;水为 millipo 超纯水;硅胶 G 板:青岛海洋化工厂;其他试剂均为分析纯。

Agilent1100 型高效液相色谱仪;四元梯度泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器(DAD);KDM 型调温电热套(山东甄城华鲁电热仪器有限公司);超声波清洗器(上海必能信超声有限公司)。

2 薄层鉴别

2.1 丹参的鉴别 取复方丹参胶囊 10 粒,剥出其中微丸,碾碎成细粉,称取微丸粉末约 1 g,置于 50 ml 锥形瓶中,加入甲醇 25 ml,摇匀,超声 2 次,每次 15 分钟,滤过,滤液适当浓

缩,作为供试品溶液。按照处方比例称取适量三七皂苷、冰片及辅料混匀,同上法进行处理,得到缺丹参阴性样品溶液。精密称取丹酚酸 B 对照品 1.24 mg 于 1 ml 容量瓶中,加适量甲醇超声溶解并定容至刻度,即得,对照品溶液浓度为 1.24 mg·mL⁻¹。照薄层色谱法(《中国药典》2005 版附录 VIB)进行试验,分别吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性样品溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-苯甲酸(1.5:2:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的蓝紫色斑点,阴性无干扰。

2.2 三七的鉴别 取复方丹参胶囊 20 粒,剥出其中微丸,碾碎成细粉,称取微丸粉末约 1 g,置于 50 ml 锥形瓶中,加入甲醇 25 ml,摇匀,超声 2 次,每次 15 分钟,滤过,滤液适当浓缩,作为供试品溶液。按照处方比例称取适量丹参总酚酸、冰片及辅料混匀,同上法进行处理,得到三七阴性样品溶液。精密称取人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ 对照品各 2 mg,置于 2 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 版附录 VIB)试验,分别吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性样品溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10) 10℃ 以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以硫酸溶液(1→10),于 105℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的红褐色斑点;置紫外光灯(365 nm)下检视,显相同的荧光斑点。

3 含量测定

3.1 色谱条件及系统适用性试验 大连依利特 HypersilOD-SC18 柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm);以乙腈为流动相 A,以水为流动相 B,按照表 1 规定进行梯度洗脱;检测波长为 286 nm。柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流速:1 mL \cdot min $^{-1}$;进样量 10 μL 。在上述色谱条件下人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 与其他组分能得到很好的分离,且与其他相邻色谱峰分离度均大于 1.5。理论塔板数按人参皂苷 R_{g1} 计应不低于 6 000,按人参皂苷 R_{b1} 计应不低于 4 000。

表 1 梯度洗脱表

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~12	19	81
12~60	19 \rightarrow 36	81 \rightarrow 64

3.2 溶液的制备 供试品溶液的制备:取 20 粒复方丹参复合胶囊,剥开取出微丸,将微丸研成细粉。取微丸细粉约 0.20 g,精密称定,置于 50 ml 锥形瓶中,分别加入 30、20 ml 甲醇超声提取,每次 20 分钟,提取液滤过至 50 ml 容量瓶中,甲醇定容至刻度,0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

阴性样品溶液的制备:按照微丸制备的处方称取适量丹参总酚酸及辅料混匀,按照上述供试品溶液的制备方法进行处理,得到缺三七阴性样品溶液。

对照品储备液的制备:取人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 对照品适量,精密称定,共同置于 10 ml 容量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,作为对照品储备溶液,浓度分别为人参皂苷 R_{g1} 679.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、人参皂苷 R_{b1} 669.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和三七皂苷 R₁ 301.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液 0.2、0.4、0.6、1.0、1.6、2.0 ml 置于 2 ml 容量瓶中,甲醇定容至刻度,得到混合对照品梯度浓度溶液。精密吸取上述溶液各 10 μL 进样,记录峰面积。

以对照品质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,并进行线性回归,线性方程分别为:人参皂苷 R_{g1} $Y=3.3024X-11.415$ ($r=0.9998$),表明人参皂苷 R_{g1} 在 67.92~679.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好;人参皂苷 R_{b1} $Y=2.4132X+23.823$ ($r=0.9996$),表明人参皂苷 R_{b1} 在 66.93~669.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好;三七皂苷 R₁ $Y=2.4084X+18.254$ ($r=0.9998$),表明三七皂苷 R₁ 在 30.16~301.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

3.4 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,记录峰面积,结果人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ RSD 分别为 0.63%、1.41%、2.89%,表明仪器精密度良好。

3.5 重现性试验 按 3.2 项下样品制备法平行制备供试品溶液 6 份,精密吸取各样品溶液 10 μL ,进样,记录峰面积,并计算微丸中人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ 含量,得 6 份供试品中人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ RSD 分别为 1.37%、1.61%、2.80%,表明该方法重现性良好。

3.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL ,分别在 0.2、5、8、12、18、24 h 进样,按上述色谱条件测定,得到人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ RSD 分别为 0.89%、1.14%、2.14%,表明供试品溶液在 24 小时内稳定。

3.7 加样回收试验 取已知含量的胶囊,剥出微丸后研碎成细粉,取约 0.01 g,精密称定,置于 50 ml 锥形瓶中,共 6 份,分别按相当于样品中人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 的 80%、100%、120% 的量加入对照品,按 3.2 项下“供试品溶液的制备”法制备样品溶液,精密吸取 10 μL 进样,记录峰面积,计算回收率。结果平均回收率人参皂苷 R_{g1} 为 97.98%,RSD 为 1.41%;人参皂苷 R_{b1} 为 99.95%,RSD 为 3.44%;三七皂苷 R₁ 为 98.52%,RSD 为 2.18%。

3.8 样品含量测定 取复方丹参胶囊中试样品 3 批,按照 3.2 项下色谱条件测定样品中人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁ 含量,并计算其总量,每批样品做 3 份。结果见表 1。

表 1 3 批胶囊样品含量测定结果 mg \cdot 粒 $^{-1}$

批号	份	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}	三七皂苷 R ₁	平均总量
20061201	1	24.71	19.12	4.83	47.49
	2	26.43	17.47	5.19	
	3	22.09	17.65	4.98	
20061202	1	22.78	19.55	5.78	48.89
	2	24.29	20.44	5.47	
	3	24.68	18.43	5.2	
20061203	1	23.08	17.39	6.03	47.57
	2	23.17	20.85	5.35	
	3	23.16	18.83	4.86	

根据表 1 数据,同时考虑到三七皂苷 R₁ 含量较低且不稳定,因此初步确定每粒胶囊中人参皂苷 R_{g1} 含量不得低于 20 mg \cdot 粒 $^{-1}$,人参皂苷 R_{b1} 不得低于 15 mg \cdot 粒 $^{-1}$ 。二者总量不得低于 35 mg \cdot 粒 $^{-1}$ 。

4 讨论

(1) 本课题通过查阅大量文献,采用大孔树脂技术对复方丹参方中丹参及三七进行精制,获得对心脑血管系统有显著生理活性的丹参总酚酸及三七总皂苷有效部位,制成速释微丸。选择了方中丹酚酸 B、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_{g1}、三七皂苷 R₁ 为指标性成分,建立了薄层鉴别和含量测定方法,为筛选制剂制备工艺,评价制剂质量提供稳定可靠的手段。

(2) 2005 版《中国药典》复方丹参片三七鉴别项中,样品处理方法繁琐,本实验建立的薄层鉴别法具有样品处理简单、斑点显色清晰、分离度好的优点,能够作为复方丹参微丸中丹参及三七的鉴别;利用梯度洗脱法同时测定了微丸中人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 的含量,该方法具有样品处理简单,操作简便,重现性好,回收率高的优点,可以作为三七总皂苷及制剂的质量控制标准。

参考文献

- [1] 国家卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(2005)一部[J]. 北京:化学工业出版社.

(收稿日期:2007-07-03)