

百贝益肺胶囊含量测定的方法改进

孙荣飞¹, 张金玺¹, 赵晓星¹, 者从章²(1.昭通市食品药品检验所, 云南 昭通 657000; 2.永孜堂制药有限公司, 云南 昭通 657000)

摘要: 目的 增加评价指标, 建立科学、合理的百贝益肺胶囊含量测定方法。方法 C₁₈小柱纯化样品, 优化色谱条件为: Vp-ODS 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 20 ℃; 变动流速; 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱; 进样量: 10 μL; 检测波长: 203 nm。结果 所测成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 分别在 40.24~241.44($r=0.999\ 6$), 91.50~549.00($r=0.999\ 9$), 35.72~241.32($r=0.999\ 8$) μg·mL⁻¹ 内线性关系良好; 加样回收率为 94.15%~99.81%, RSD 为 1.12%~1.94%。
结论 该方法准确, 重复性良好, 可为修订标准提供依据。

关键词: 百贝益肺胶囊; 含量测定; 改进

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)12-1740-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.021

引用本文: 孙荣飞, 张金玺, 赵晓星, 等. 百贝益肺胶囊含量测定的方法改进[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1740-1742.

Improvement of Content Determination of Baibei Yifei Capsule

SUN Rongfei¹, ZHANG Jinxi¹, ZHAO Xiaoxing¹, ZHE Congzhang²(1.Zhaotong Institute of Food and Drug Control, Zhaotong 657000, China; 2.YongZitang Pharmaceutical Company Limited, Zhaotong 657000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To augment evaluation index, and establish a scientific and reasonable method for the content determination of Baibei Yifei capsule. **METHODS** Samples were purified by C₁₈ column, optimized chromatographic conditions: Vp-ODS column (150 mm×4.6 mm, 5 μm); column temperature: 20 ℃; fluctuan flow rate; the mobile phase acetonitrile (A)-water (B), gradient elution. The injection volume was 10 μL. The detection wavelength was 203 nm. **RESULTS** The contents of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁ were linear in 40.24–241.44($r=0.999\ 6$), 91.50–549.00($r=0.999\ 9$), 35.72–241.32($r=0.999\ 8$) μg·mL⁻¹, respectively. The recovery rate was 94.15%–99.81%, RSD was 1.12%–1.94%. **CONCLUSION** The method is accurate and reproducible, which can provide the basis for the revision of the standard.

KEY WORDS: Baibei Yifei capsule; content determination; improvement

百贝益肺胶囊始收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第 1 册, 由白及、浙贝母、桔梗、百部、百合、海浮石、紫菀、三七、功劳木、甘草组成, 2012 年升级成国家标准, 增加贵细药材三七的含量测定, 以人参皂苷 Rg₁ 为评价指标^[1]。三七为药典收录品种, 中国药典 2015 年版以 3 个成分控制其质量^{[2]11-12}; 原标准^[1]以单一成分, 也非标志性成分作为评价指标, 存在一定的不科学性, 且需要特定 Inertsil ODS-SP 型色谱柱。因此, 本实验增加三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rb₁ 为含量测定指标, 选择通用 ODS 短柱, 进行方法改进, 使其测定方法更加科学合理。

1 仪器、试剂及材料

LC-2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); MS105DU 电子天平(梅特勒-托利多上海公司); WF-120EH 超声仪(宁波海曙五方); WondaSep C₁₈ 小柱(日本岛津, 500 mg/6 mL)。

三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 对照品均来源于中国药品生物制品检定所, 批号分别为: 110745-200312、110703-201128、110704-201223, 含量分别为未标示(以 100%计)、93.4%和 95.9%; 乙腈为色谱纯, 甲醇为分析纯, 水为纯化水。百贝益肺胶囊(昭通永孜堂制药有限公司, 批号: 20160520, 20161129, 20170222, 规格: 每粒 0.4 g); 缺三七阴性对照样品(永孜堂制药有限公司, 批号: 20170222)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Vp-ODS 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 20 ℃; 流速: 0~25 min, 1 mL·min⁻¹, 25~30 min, 1 → 0.7 mL·min⁻¹, 30~80 min, 0.7 mL·min⁻¹; 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~25 min, 19%A, 25~30 min, 19%→28%A, 30~65 min, 28%→29%A; 65~75 min, 29%→40%A;

作者简介: 孙荣飞, 男, 主管药师 Tel: (0870)3156089 E-mail: 286707498@163.com

75~80 min, 40%→19%A); 进样量: 10 μ L。检测波长: 203 nm。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 对照品适量, 加甲醇分别制成 0.80, 1.83, 0.71 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品内容物 2.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 10 mL, 蒸干, 残渣加水 2 mL, 使溶解, 使通过已活化的 C_{18} 小柱, 依次用水 5 mL、20%乙醇 10 mL 洗脱, 弃去洗脱

液, 再用 50%乙醇 20 mL 洗脱, 收集洗脱液, 浓缩至近干, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 即得。

2.2.3 阴性溶液的制备 精密称取缺三七阴性对照样品 2.5 g, 按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、样品溶液、阴性对照溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪测定。结果供试品溶液色谱中, 在与三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 对照品相同保留时间处有吸收峰, 而阴性样品溶液在相同保留时间处未显吸收峰, 表明阴性样品对测定无干扰, 结果见图 1。

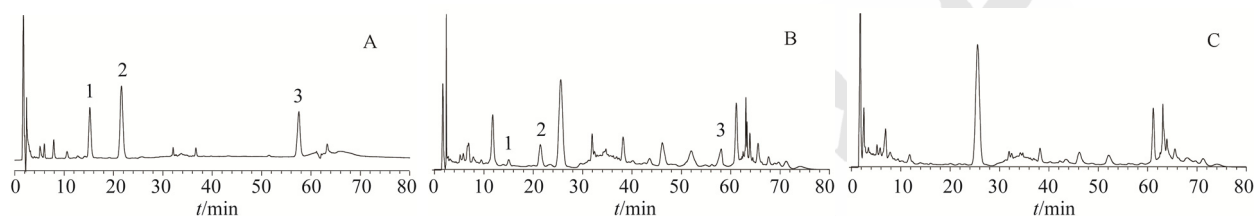


图1 百贝益肺胶囊 HPLC 色谱图

A-对照品; B-样品; C-阴性样品; 1-三七皂苷 R_1 ; 2-人参皂苷 R_{g1} ; 3-人参皂苷 R_{b1} 。

Fig. 1 HPLC chromatogram of Baibei Yifei capsule

A-control sample; B-sample; C-negative sample; 1-notoginsenoside R_1 ; 2-ginsenoside R_{g1} ; 3-ginsenoside R_{b1} 。

2.3.2 线性关系 分别取“2.2.1”项下对照品储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 进样测定。以峰面积为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X), 绘制 3 个对照品的标准曲线。结果三七皂苷 R_1 回归方程为 $Y=2\ 655.91X+203.93(r=0.999\ 6)$ 、人参皂苷 R_{g1} 为 $Y=2\ 128.79X+6\ 143.73(r=0.999\ 9)$ 、人参皂苷 R_{b1} 为 $Y=2\ 669.56X+1\ 2947.70(r=0.999\ 8)$, 线性范围分别为 40.24~241.44, 91.50~549.00, 35.72~214.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 仪器精密度 取同一混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 的峰面积 RSD($n=6$)分别为 0.6%, 0.3%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性 取“2.2.2”项下供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分隔 0, 2, 4, 8, 24, 48 h 分别进样, 测得混合对照品及供试品中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 的峰面积 RSD($n=6$)

分别为 1.5%, 1.0%, 1.3%, 表明冷藏密封放置 48 h, 该溶液稳定。

2.3.5 重复性 精密称取同一批号(20160520)样品, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录测定峰面积并计算。结果每粒含三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 含量的 RSD 分别为 1.9%, 1.6%和 2.1%($n=6$)。

2.3.6 加样回收率 精密称取已知含量的样品 1.25 g, 加入“2.2.1”项下对照品储备液适量, 挥去甲醇, 按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液, 测得 3 个成分的峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。

2.3.7 样品测定 取样品 3 批, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱进样测定, 记录峰面积, 并计算样品含量, 结果见表 2。

3 讨论

三七主成分的测定、提取方法相对成熟, 基本上类似。水饱和正丁醇反复萃取、大孔树脂分离纯化最为常用^[3-6]; 固相萃取也有运用^[7], 还有

表 1 三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 回收率
Tab. 1 Recoveries of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁

成分	样品中含 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
三七 皂苷 R ₁	0.95	0.89	1.82	97.75	99.81	1.94
	0.92	0.89	1.82	101.12		
	0.92	0.89	1.79	97.75		
	0.95	0.89	1.86	102.24		
	0.92	0.89	1.80	98.88		
	0.93	0.89	1.83	101.12		
人 参 皂 苷 Rg ₁	3.29	3.29	6.51	97.87	97.57	1.12
	3.21	3.29	6.40	96.96		
	3.21	3.29	6.38	96.35		
	3.32	3.29	6.50	96.66		
	3.19	3.29	6.45	99.09		
	3.24	3.29	6.48	98.48		
人 参 皂 苷 Rb ₁	2.06	2.05	3.99	94.15	94.15	1.57
	2.02	2.05	3.93	93.17		
	2.02	2.05	3.98	95.61		
	2.08	2.05	3.97	92.19		
	2.00	2.05	3.92	93.66		
	2.03	2.05	4.00	96.10		

表 2 样品含量测定结果(n=3)

mg			
批号	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Rb ₁
201600520	0.22	1.02	0.48
20161129	0.25	1.18	0.52
20170222	0.21	0.94	0.56

复方丹参片中直接用 70% 甲醇提取^{[1]1214-1215}。在本实验中,除了比较上述的提取方法,还考察了以下方法:①分别用 10% 乙醇、乙醚超声,弃提取液,残渣用甲醇或水饱和正丁醇超声提取;②过氧化铝柱、氧化铝与大孔树脂混合柱,用不同浓度乙醇洗脱;③通过薄层色谱法纯化。从实验结

果看,水饱和正丁醇萃取、大孔树脂纯化、固相萃取、薄层色谱纯化可以大幅度去除杂质,其中薄层色谱纯化的样品最好,考虑到实验的简便、准确、重复性,最终选择固相萃取纯化的样品,结合梯度洗脱、流速变化、低柱温的色谱条件,取得相对满意的结果。

本实验考察了 ZORBAX SB-C₁₈ 和 Inertsil ODS-3 色谱柱,取得了一致的结果。本实验中,柱温对色谱峰的影响明显,短柱在 25 ℃ 以下可以获得良好分离度,35 ℃ 以上目标峰不能完全分离,结合色谱柱承受温度及分离度,确定柱温为 20 ℃,取得良好效果。

REFERENCES

[1] 国家食品药品监督管理总局发布. 国家药品标准[S]: WS-10115(ZD-0115)-2002-2012Z.

[2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 11-12, 1214-1215.

[3] YANG H, LAO G Y, TANG D Z. Determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ in Compound Huanggen granules by HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2015, 18(1): 55-58.

[4] HUANG Y Y. Determination of contents of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ in Sanqi Shangyao capsules by HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2015, 26(12): 1706-1708.

[5] ZHANG C H, WANG Y L, FU C. Simultaneous determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ in Dried pills by HPLC-ELSD [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 91-93.

[6] YU X, LIU J, WANG Y N, et al. Simultaneous determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re and ginsenoside Rb₁ in Dredge powder by HPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2016, 33(7): 537-541.

[7] ZHANG H J, YUAN R Q, HU J Y. Determination of saponins in Formulated Danshen tablets by SPE-HPLC-MSn technique [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22(9): 2174-2176.

收稿日期: 2017-06-26
(本文责编: 曹粤锋)