

宫瘤消胶囊的质量标准研究

马建霞¹, 俞晓英², 李旺^{1*}, 张立军²(1.兰州石化总医院药剂科, 兰州 730060; 2.甘肃中医药大学, 兰州 730000)

摘要: 目的 建立宫瘤消胶囊的质量标准, 为完善其质量标准提供科学依据。方法 采用 TLC 鉴别方中三棱、三七、沉香及丹参; 采用 HPLC 对方中丹酚酸 B 的含量进行测定。结果 TLC 中可检出三棱、三七、沉香与丹参的特征斑点, 阴性对照无干扰; 丹酚酸 B 在 0.202 2~2.022 0 μg 具有良好的线性关系, 平均回收率为 96.83%, RSD 为 1.69%($n=6$)。结论 该方法能准确可靠的进行定性、定量检测、重复性好, 可作为宫瘤消胶囊的质量控制标准。

关键词: 宫瘤消胶囊; 质量标准; 高效液相色谱法; 丹酚酸 B; 三七皂苷 R1; 人参皂苷 Rg1

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)03-0392-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.03.018

引用本文: 马建霞, 俞晓英, 李旺, 等. 宫瘤消胶囊的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 392-395.

Study on Quality Standard for Gongliuxiao Capsule

MA Jianxia¹, YU Xiaoying², LI Wang^{1*}, ZHANG Lijun²(1. Pharmacy Department, General Hospital of Lanzhou Petrochemical Company, Lanzhou 730060, China; 2. Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standard for Gongliuxiao capsule, and provide scientific evidence for the improvement of quality standard. **METHODS** TLC method was used to identify Sparganii Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma, Aquilariae Lignum Resinatum, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma. The concentration of salvianolic acid B was determined using HPLC. **RESULTS** TLC could detect qualitatively Sparganii Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma, Aquilariae Lignum Resinatum, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma. The spots were clear and the negative controls had no interference. Salvianolic acid B linearity was found in the range of 0.202 2-2.022 0 μg , the average recovery was 96.83%, RSD was 1.69%($n=6$). **CONCLUSION** The method is accurate and reliable, has good reproducibility, which can be used as quality control standard of Gongliuxiao capsule.

KEY WORDS: Gongliuxiao capsule; quality standard; HPLC; salvianolic acid B; *Panax notoginseng* saponins R1; ginsenoside Rg1

宫瘤消胶囊是由三棱、三七、丹参、沉香、莪术及牛膝 6 味药物组成的中药成方制剂, 具有破血行气、消癥化积之功效, 主治癥瘕积聚、心腹气痛、散瘀消瘤等。该制剂与国家标准 WS-11329(ZD-1329)-2002 “宫瘤消胶囊” 制剂不同, 一是配方组成和中医配伍理念不同; 二是功效也有一定的区别。该制剂在活血化瘀、软坚散结的基础上增加了健脾消食、补肝肾、强筋骨、凉血消痈及引血下行的功效。该制剂为传统经验方, 经临床运用多年, 治疗效果显著, 未见不良反应。该方目前一直作为院内制剂, 主要剂型为片剂和汤剂, 但汤剂口感差, 不易携带和保存, 不便于大规模生产且质量不易控制。胶囊剂能够掩盖药物不良气味, 更好地发挥疗效, 开发的宫瘤消胶囊已作为院内制剂逐步应用临床, 为了全面有效地控制宫瘤消胶囊的质量, 保证其临床用

药效果, 课题组对宫瘤消胶囊的质量标准进行研究, 采用 TLC 对主要药味三棱、三七、沉香与丹参进行定性鉴别^[1-2]; 建立了 HPLC 测定方中丹酚酸 B 的含量^[3], 并进行系统的方法学考察, 以有效控制该制剂的质量, 完善其质量标准。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BT125D 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); FW-1000AD 万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司); KQ-100 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); KDM 可调控温电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司); 药筛(浙江上虞市化验器械厂); XMTD 数显调节仪水浴锅(余姚市东方电工仪器); NE 6000 烘箱(中外合资重庆四达实验仪器公司制造); ZF-2 三用紫外仪(上海安亭电子仪器厂); LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津, DAD 检测

基金项目: 甘肃省自然科学基金(17JR5RA037)

作者简介: 马建霞, 女, 主管药师 Tel: (0931)7965270
(0931)7965270 E-mail: 1926818052@qq.com

E-mail: 1926818051@qq.com *通信作者: 李旺, 男, 主管药师 Tel:

器, CLASS-VP 工作站)。

1.2 试药与试剂

宫瘤消胶囊(兰州石化总医院自制, 批号: 20151101, 20151102, 20151103; 规格: 每粒 0.35 g); 丹酚酸 B(批号: 110766-201406; 纯度 \geq 98.00%)、三七皂苷 R1(批号: 110781-200613; 纯度 \geq 97.50%)、人参皂苷 Rg1(批号: 110745-200617; 纯度 \geq 97.50%)、沉香对照药材(批号: 121222-201102)、三棱对照药材(批号: 121521-201103)均购自中国药品生物鉴定所; 正丁醇、乙酸乙酯等均为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 三七的 TLC 鉴别^[4] 分别取 3 批宫瘤消胶囊样品内容物 2 g, 研细, 加甲醇 50 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方比例称取三棱等 5 味药材(缺三七), 按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液; 另取三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1 对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 配制为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取供试品、阴性对照和对照品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)为展开剂, 展开, 取出晾干, 喷 10% 硫酸乙醇溶液, 在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热至斑点显色清晰, 进行观察。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 日光下显相同颜色的斑点, 阴性对照色谱在相应位置无相同颜色斑点, 结果见图 1A。

2.1.2 沉香的 TLC 鉴别^[5-6] 分别取 3 批宫瘤消胶囊样品内容物 3 g, 研细, 加乙醚 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加三氯甲烷 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 按处方比例称取三棱等 5 味药材(缺沉香), 按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液; 另取沉香对照药材 0.5 g, 精密称定, 按供试品溶液的制备方法制备。取供试品、阴性对照和对照药材溶液各 $10 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上以三氯甲烷-乙醚(10:1)为展开剂, 展开, 取出晾干。置 365 nm 紫外光灯下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照色谱在相应位置无相同颜色荧光斑点, 见图 1B。

2.1.3 丹参的 TLC 鉴别^[7] 分别取 3 批宫瘤消胶囊样品内容物 2 g, 研细, 加 75% 甲醇 25 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液浓缩至 2 mL, 作为供试品溶液; 按处方比例称取三棱等 5 味药材(缺丹参), 按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液; 另取丹酚酸 B 对照品, 精密称定, 加 75% 甲醇溶解, 配制为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取供试品、阴性对照和对照品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 分别点于同一聚酰胺薄膜层析板上以丙酮-36% 醋酸-氨水(10:25:2)为展开剂, 展开, 取出用氨蒸气熏蒸 5 min, 晾干, 置 365 nm 紫外光灯下检视, 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, 阴性对照色谱在相应位置无相同颜色荧光斑点, 见图 1C。

2.1.4 三棱的 TLC 鉴别^[2,8] 分别取 3 批宫瘤消胶囊样品内容物 5 g, 研细, 加乙醇 30 mL, 超声处理 20 min, 过滤, 滤液蒸干, 残渣加 2 mL 乙醇使溶解, 作为供试品溶液; 按处方比例称取丹参等 5 味药材(缺三棱), 按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液; 另取三棱对照药材 2 g, 精密称定, 按照供试品溶液的制备方法制成对照药材溶液。取供试品、阴性对照和对照药材溶液各 $10 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上以正己烷-乙酸乙酯(20:3)为展开剂, 展开, 取出喷以磷钼酸试液, 晾干, 日光下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照色谱在相应位置无相同颜色斑点, 见图 1D。

2.2 丹酚酸 B 含量测定

^[9-11]

2.2.1 色谱条件 Akasil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59), 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长 286 nm , 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2.2 对照品溶液制备 取丹酚酸 B 对照品适量, 精密称定, 加 75% 甲醇溶解, 配制为 $2.0220 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 取宫瘤消胶囊样品内容物 0.4 g, 精密称定, 置具塞的锥形瓶中, 加入 75% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放至室温, 用 75% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置, 取上清液用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔膜过滤, 作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液制备 按处方比例取不含丹参的其他药材, 照供试品溶液制备方法进行提取, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔膜过滤, 作为阴性对照溶液。

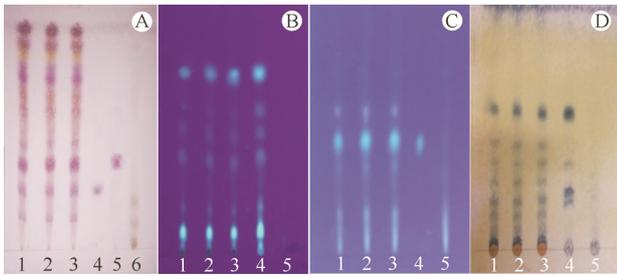


图1 宫瘤消胶囊的薄层色谱图

A-1~3 为3批宫瘤消胶囊样品, 4为三七皂苷 R1, 5为人参皂苷 Rg1, 6为三七阴性对照, 日光下检视; B-1~3 为3批宫瘤消胶囊样品, 4为沉香对照药材, 5为沉香阴性对照, 365 nm 紫外灯下观察; C-1~3 为3批宫瘤消胶囊样品, 4为丹酚酸 B, 5为丹参阴性对照, 365 nm 紫外灯下观察; D-1~3 为3批宫瘤消胶囊样品, 4为三棱对照药材, 5为三棱阴性对照, 日光下检视。

Fig. 1 TLC chromatograms of Gongliuxiao capsule

A-1~3: 3 batches samples of Gongliuxiao capsules; 4-*panax notoginseng* saponins R1; 5-ginsenoside Rg1; 6-negative control of *Notoginseng Radix et Rhizome*, observed under natural light. B-1~3: 3 batches samples of Gongliuxiao capsules; 4-*Aquilariae Lignum Resinatum*; 5-negative control of *Aquilariae Lignum Resinatum*, observed under ultraviolet light (365 nm). C-1~3: 3 batches samples of Gongliuxiao capsules; 4-salvianolic acid B; 5-negative control of *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, observed under Ultra violet light (365 nm). D-1~3: 3 batches samples of Gongliuxiao capsule; 4-*Sparganii Rhizoma*; 5-negative control of *Sparganii Rhizoma*, observed under natural light.

2.2.5 系统适用性实验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液分别按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。供试品色谱图中, 在与对照品色谱图相应保留时间上有相同色谱峰, 阴性样品无干扰, 结果见图2。

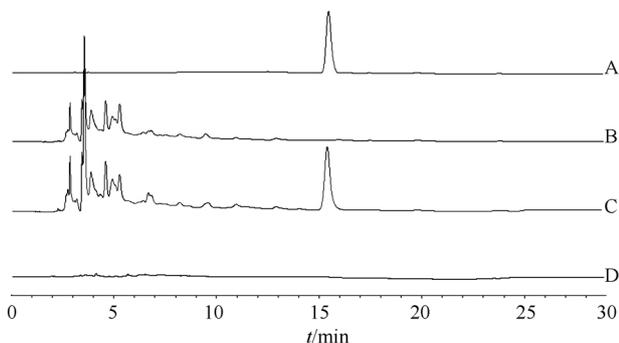


图2 丹酚酸 B(A)、缺丹参阴性对照(B)、宫瘤消胶囊样品(C)及空白溶剂(D)的 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of salvianolic acid B (A), negative control without *Salvia miltiorrhiza* Bge (B), sample of Gongliuxiao capsule (C) and blank solvent (D)

2.2.6 线性关系考察 精密吸取丹酚酸 B 对照品贮备液 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mL 用 75% 甲醇定容至 10.0 mL, 摇匀。分别按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 测定峰面积, 以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归。结果表明, 丹酚酸 B 在

0.202 2~2.022 0 μg 内呈良好线性关系, 回归方程 $Y=10^7X+1966.4$, $r=0.9999$ 。

2.2.7 仪器精密度试验 精密吸取对照品溶液和同一批供试品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录丹酚酸 B 的峰面积, 结果对照品溶液和供试品溶液峰面积 RSD 值分别为 0.35%, 0.57%($n=6$), 表明仪器的精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 测定。其丹酚酸 B 峰面积的 RSD 为 0.74%($n=6$), 结果表明 12 h 内样品的稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取同一批宫瘤消胶囊样品内容物, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算样品中丹酚酸 B 的含量。结果表明, 本法有良好的重复性, 丹酚酸 B 含量的 RSD 为 0.58%($n=6$)。

2.2.10 加样回收试验 取已知丹酚酸 B 含量的宫瘤消胶囊内容物 0.2 g(含量 $12.57 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)共 6 份, 精密称定, 随机分成 3 组, 每组 2 份, 向每组中分别加入不同体积对照品储备液(1.0, 2.5, 4.0 mL), 浓度为 $1.011 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按“2.2.2”项下方法制备, 依法测定, 计算丹酚酸 B 的平均回收率为 96.83%, RSD 为 1.69%, 表明该方法的回收率良好, 结果见表 1。

表 1 丹酚酸 B 加样回收率试验

Tab. 1 The results of recovery for the salvianolic acid B

称样量/ g	含有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.198 5	2.495 1	1.011 0	3.470 6	96.48	96.83	1.69
0.195 9	2.462 5	1.011 0	3.463 0	98.97		
0.202 2	2.541 7	2.527 5	4.949 6	95.27		
0.199 4	2.506 5	2.527 5	5.005 0	98.85		
0.197 3	2.480 1	4.044 0	6.372 3	96.25		
0.200 6	2.521 5	4.044 0	6.369 8	95.16		

2.2.11 样品含量测定 取 3 批宫瘤消胶囊供试液(平行 3 份), 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 测定样品中丹酚酸 B 的含量, 结果见表 2。

表 2 3 批宫瘤消胶囊中丹酚酸 B 的含量($n=3$)

Tab. 2 The contents of salvianolic acid B of 3 batches of Gongliuxiao capsule samples ($n=3$)

批次	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
20151101	12.57	0.35	12.74
20151102	12.86	0.38	
20151103	12.79	0.31	

3 讨论

3.1 TLC 分析

3.1.1 考察指标选择 实验通过 TLC 采用药典中单味药的控制指标丹酚酸 B、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1 及其对照药材分别对方中三棱、三七、沉香、丹参等药材进行定性鉴别,斑点清晰、分离度好,可用于宫瘤消胶囊制剂的定性鉴别。

3.1.2 TLC 条件选择 实验分别考察了不同的溶剂展开系统及展开比例,对宫瘤消胶囊样品进行展开分析,结果显示上述所选的展开条件最佳。实验曾尝试用同一薄层色谱条件进行分析,但由于复方制剂成分复杂、极性大小不同,很难在统一条件进行分析。同时实验还考察了不同的薄层板、不同的显色条件及不同温湿度对结果的影响。结果表明,温度在 10~30 °C,相对湿度在 45%~65%之间时,各指标成分斑点的 Rf 值变化不大、斑点集中,不影响分离效果。

3.2 HPLC 色谱分析

3.2.1 考察指标选择 淤血内停为子宫肌瘤的主要病机,丹参作为该制剂的君药,由于丹参水溶性成分丹酚酸 B 含量较高,但稳定性较差,故在复方制剂中采用丹酚酸 B 作为考察指标,并通过 HPLC 对其进行定量控制,以便于更好地控制制剂的质量。

3.2.2 提取溶剂、方式与时间选择 实验分别考察了 50%甲醇、75%甲醇与 100%甲醇作为提取溶剂,结果显示,100%甲醇作为提取溶剂时,提取效果较差,提取率不高;50%,75%甲醇作为提取溶剂时,提取效果相差不大(丹酚酸 B 的峰面积相差不大),但 50%甲醇作为提取溶剂时,过滤困难,故采用 75%甲醇提取。此外实验分别考察了超声 30 min、浸渍 24 h、回流 1 h 等提取方式,结果显示,浸渍提取相对于超声和回流稍好一些,但提取时间较长;超声提取相比于回流提取,效果更好,可能由于丹酚酸 B 受热不稳定^[12]。故采用超声处理方法,操作简便,提取效率高,对丹酚酸 B 提取较完全。同时实验分别考察了超声 15, 30, 45 min,结果显示,超声 30 min 效果较好。故最终选择上述所筛选的试验方法进行供试品溶液的制备。

3.2.3 色谱条件选择 由于复方成分复杂,干扰因素过多,采用一般的甲醇和水、乙腈和水作为流动相很难分离,为此,实验考察了甲醇-磷酸二氢钾溶液、甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水-冰醋酸、甲醇-乙腈-甲酸-水等作为流动相,结果表明采用甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59)作为流动相时分离效果较好,色谱峰的对称性较好,由于在流动相中加入少量甲酸时可以改善色谱峰的峰形。同时实验还考察了波长、柱温对分离效果的影响,结果显示本研究所用的色谱条件最好。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典中药薄层色谱彩色图集[M]. 广东科技出版社, 1993.
- [2] WANG H, WEI W D. TLC identification and content determination of total flavonoids relating Rhizoma Sparganii [J]. J Chengdu Univ TCM(成都中医药大学学报), 2016, 39(1): 10-14.
- [3] CUI X H, QI H T, SHENG N, et al. HPLC simultaneous determination of gallic acid, tanshinol, paeoniflorin, salvianolic acid B and tanshinone II A in Yi Gan Kang granules [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2014, 34(3): 432-436.
- [4] ZHAO Z X, WANG M, WANG Y N, et al. Identification of Notoginseng Radix et Rhizoma by TLC and the determination of 6 kinds of compounds in Xinkeshu pills [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2016, 31(6): 656-659.
- [5] XU Y L, XU X M, MA Y L. TLC identification of Bawei Chenxiang wan [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2016, 25(13): 23-24.
- [6] GUO Q J, XIAO L H, XIONG Y. Quality standards of Chenxiang Huazhi pills [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(7): 632-634.
- [7] WU D, WANG D Q, LI C Y. Study on TLC identification for compound danshen tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(9): 1658-1660.
- [8] 中国药典. 四部[S]. 2015: 13.
- [9] LI J Y, WANG Q, ZHI W, et al. Immobilization of salvianolic acid B-loaded chitosan microspheres distributed three-dimensionally and homogeneously on the porous surface of hydroxyapatite scaffolds [J]. Biomed Mater, 2016, 11(5): 1748-1751.
- [10] ZHANG L, ZHANG Q, LIU J, et al. Quantitative determination of scutellarin and salvianolic acid B in Shenqi Xiaopi granules [J]. J Beijing Univ TCM (北京中医药大学学报), 2013, 36(8): 550-553.
- [11] 王刚, 杜士明, 陈黎, 等. 高效液相色谱法测定活血通淤片中丹参素和丹酚酸 B 含量[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(15): 1333-1334.
- [12] LU X H. Affect of different processing methods on salvianolic acid B of salvia miltiorrhiza [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(2): 103-105.

收稿日期: 2017-07-17

(本文责编: 曹粤锋)