

益脑宁丸质量标准的设计研究

杜小英¹ 宋愿智² 王 宁¹

(1. 陕西方舟制药有限公司, 陕西 西安 710075; 2. 陕西省食品药品检验所, 陕西 西安 710065)

摘 要:目的 建立益脑宁丸的质量控制方法。方法 用薄层色谱法对益脑宁丸中的炙黄芪、丹参等进行定性鉴别;用 HPLC 法对制剂中的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷进行定量测定。结果 薄层色谱中斑点清晰,易于识别;HPLC 法精密度,重现性良好,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷线性关系良好,平均加样回收率 98.2 %。结论 该方法可有效控制益脑宁丸的产品质量。

关键词:益脑宁丸;薄层鉴别;HPLC 法;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷
中图分类号: R 286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-0571(2015)06-0099-04
DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2015.06.041

益脑宁丸系《中药成方制剂》所收载品种,标准号 WS3-B-3309-98,由黄芪(炙),党参,麦芽,何首乌(制)等十五味药材经提取精制而成,具有益气补肾,活血通脉功能,在临床上用于脑动脉硬化症,中风后遗症,冠心病,心绞痛,高血压等属脾肾不足,血脉瘀阻证者的治疗^[1]。原质量标准无“含量测定”项,仅有几项简单的鉴别试验,虽 2003 年对该质量标准进行修订,删除铁盐检查项,修订【鉴别】(2)项,但还不能有效控制产品质量^[2]。益脑宁丸为其“片”剂改剂型品种,根据 SFDA《药品注册管理办法》及相关技术指导原则,在【鉴别】项增加了黄芪(炙)、丹参薄层色谱鉴别;增加【含量测定】项,利用 HPLC 法测定何首乌(制)中的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量,经试验证明,为控制益脑宁丸质量提供了一种较为科学的检测方法^[3-5]。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 P4000 高效液相色谱仪(美国 SSI 公司)。Phenomenex ODS(5 μm, 250 mm×4.6 mm ID)色谱柱;SSI P4000 泵;SSI 500 UV/Vis 检测器;HW2000 色谱工作站(千谱软件有限公司);塞多利斯 BP211D 电子分析天平。AS 3120A 超声波清洗器(Automatic science Instrument Co. ltd)。
1.2 试剂 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(批号:0844-201203,供含量测定用)、黄芪甲苷(批号:0781-201311,供含量测定

用)、丹参酮ⅡA(批号:110766-201216,供含量测定用)、齐墩果酸(批号:110709-201104,供含量测定用)、槲皮素(批号:0081-201104,供鉴别用)、芍药苷对照品(批号:110736-201222,供含量测定用)、何首乌(批号:934-201006,供鉴别用)、赤芍(批号:1093-201001,供鉴别用)、灵芝对照药材(批号:120968-200404,供鉴别用),以上对照药材和对照品均购自中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯试剂(美国 TEDIA 公司);水为二次蒸馏水;其它试剂均为分析纯(西安化学试剂厂)。益脑宁丸及不含被测药材的阴性对照样品自制。

2 方法与结果

2.1 鉴别

2.1.1 黄芪的鉴别 取本品 10 g,研细,加乙醇 200 mL,加热回流 1 h,放冷,过滤,滤液浓缩至 10 mL,放冷,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,长 10~12 cm),以水 200 mL 洗脱,弃去水液,再用 40 % 乙醇 100 mL 洗脱,弃去 40 % 乙醇洗脱液,继用 70 % 乙醇 100 mL 洗脱,收集 70 % 乙醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取阴性对照样品同法制成阴性对照溶液;再取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述三种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:8:2)10℃以下放置过

夜的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10 % 硫酸乙醇溶液,在 100 ℃ 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,显相同颜色的斑点;阴性对照溶液色谱在相应位置上无干扰(见图 1)。

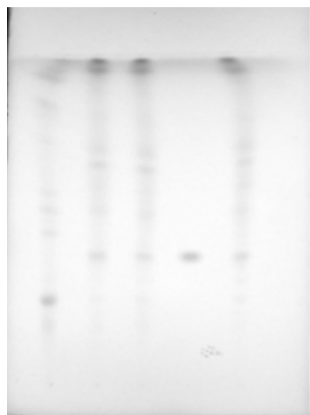


图 1 黄芪薄层图

1 为阴性对照,2,3,5 为样品,4 为黄芪甲苷对照品)

2.1.2 何首乌(制)的鉴别 取本品 3 g,研细,加乙醇 30 mL,加热回流 1 h,提取液滤过,并将滤过液浓缩至 1 mL,作为供试品溶液。另取阴性对照样品 3 g,同供试品配制方法,制成阴性对照溶液;再取何首乌对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述三种溶液各 3 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上,以甲苯-乙醇(2:1)溶液为展开剂,展至约 3.5 cm,取出,晾干,再以甲苯-乙醇(4:1)溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光条斑;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光条斑;阴性对照溶液色谱在薄层相应位置上无干扰(见图 2)。

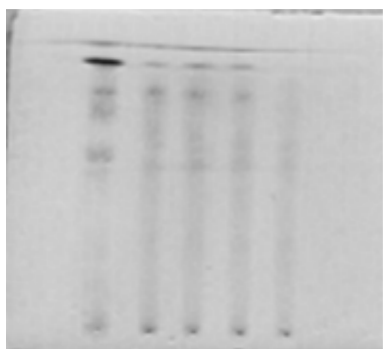


图 2 何首乌薄层图

(1 为何首乌对照药材,2,3,4 为样品,5 为阴性对照样品)

2.1.3 赤芍的鉴别 取本品 8 g,研细,加 95 % 乙醇 50 mL,超声(功率 250 W,频率 33 kHz)提取 20 min,滤过,滤液至坩埚中蒸干,残渣加水 30 mL 振摇,滤过,滤液用水饱和的正丁醇分别萃取三次,每次 30 mL,合并正丁醇萃取液,置水浴上蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取阴性对照样品 8 g,同供试品制备方法制成阴性对照溶液;再取赤芍对照药材 1 g,同供试品制备方法制成对照药材溶液。取芍药苷对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液。作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品及阴性对照溶液各 5 μ L、对照品及对照药材溶液各 3 μ 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-甲酸(40:5:10:0.5)溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10 % 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 烘至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照溶液色谱在相应位置上无干扰(见图 3)。

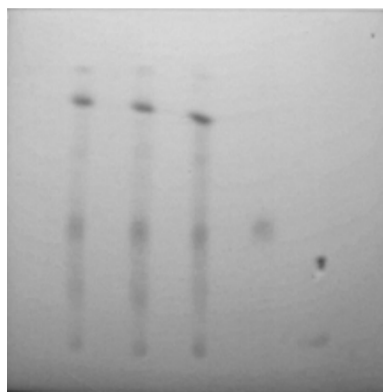


图 3 赤芍薄层图

(1,2,3,为样品,4 为芍药苷对照品,5 为阴性对照样品)

2.1.4 女贞子的鉴别 取本品 5 g,研细,加水饱和的正丁醇 40 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣用乙醚浸泡 3 次,每次 5 mL,每次浸泡约 2 min,合并乙醚液,备用,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。取阴性样品 5 g,同供试品配制方法,制成阴性供试品;再取齐墩果酸对照品适量,用乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照中国药典 2010 年版一部附录 VIB 薄层色谱法进行试验,吸取供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μ L、对照品溶液 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯(20:5:8)溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10 % 硫

酸乙醇溶液,放置烘箱 105 ℃ 烘至薄层斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的颜色斑点;阴性对照溶液色谱在相应位置上无干扰(见图 4)。

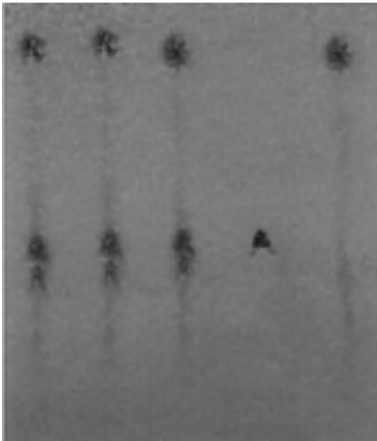


图 4 女贞子薄层图

(1,2,3,为样品,4 为齐墩果酸对照品,5 为阴性对照样品)

2.1.5 丹参的鉴别 取本品 10 g,研细,加乙醚 100 mL,加热回流 30 min,放冷,过滤,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取阴性对照样 10 g,同供试品制备方法制成阴性对照溶液;另取丹参酮 II A 对照品适量,加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述三种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯(18:2)溶液为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的红色斑点;阴性对照溶液色谱在相应位置上无干扰(见图 5)。

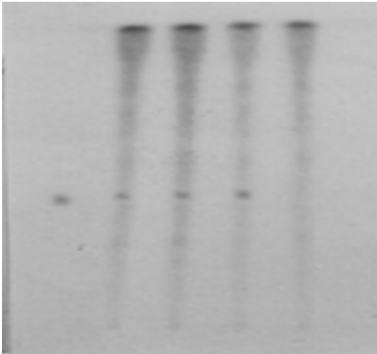
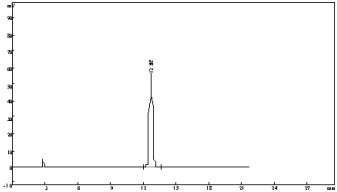


图 5 丹参薄层图

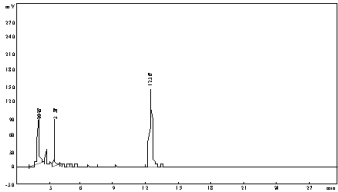
(1 为丹参酮 II A 对照品,2,3,4 为样品,5 为阴性对照样品)

2.1.6 其他鉴别 另还对制剂中的灵芝和桑寄生药材进行了薄层色谱法鉴别试验方法,但因其阴性对照溶液有干扰,主斑点扩散、拖尾等,故未

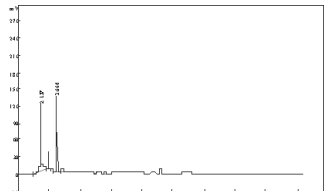
列入标准正文。
2.2 含量测定
2.2.1 色谱条件与系统适用性试验用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;乙腈-水(20:80)为流动相;检测波长为 320 nm。理论板数按 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰计算应不低于 3000。色谱图见图 6。



对照品溶液色谱图



供试品溶液色谱图



阴性对照溶液色谱图

图 6 益脑宁丸中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷色谱图

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品内容物,研细,精密称定 1.6 g,置圆底烧瓶中,精密加入 50 % 乙醇 50 mL,密塞,称定重量,加热回流 30 min,放冷,再称定重量,并用 50 % 乙醇补足减失的重量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。
2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品适量,加稀乙醇制成每 1 mL 含 0.04 mg 的溶液,即得。
2.2.4 线性关系考察 精密吸取浓度为 10.86、21.72、43.44、65.16、86.88 和 108.6 μg/mL 的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液各 10 μL,按上述的色谱条件进行测定,以峰面积积分值(y)和对照品量(x)进行回归,得方程: $y = 2551057.85x + 8256.78$, 相关系数 $r = 0.9997$ 。结果表明 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷在 0.1085 ~ 1.085 μg 范围内显

良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一批号(140101)供试品溶液,按上述色谱条件测定,重复进行 6 次,记录峰面积,结果 RSD 为 1.41 %,表明本仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一批号(140101)供试品溶液,按上述色谱条件,分别于 0、1、2、4、6 和 8 h,进行测定,记录峰面积,结果 RSD 为 1.86 %,表明本品在 8 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密吸取同一批号(140101)5 份样品,按供试品溶液制备方法制备并测定,结果 RSD 为 0.92 %,表明本方法重现性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的供试品溶液 6 份,分别加入一定量的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液,依法进行测定,计算回收率,结果平均回收率为 97.2 %,RSD 为 0.89 %,详见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

序号	称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.8009	2.1784	1.7184	3.8435	96.9	97.2	0.89
2	0.8017	2.1806	1.7184	3.8509	97.2		
3	0.8001	2.1763	2.1480	4.2792	97.9		
4	0.7997	2.1752	2.1480	4.2867	98.3		
5	0.8022	2.1820	2.5776	4.6823	97.0		
6	0.8004	2.1771	2.5776	4.6542	96.1		

2.2.9 样品测定取供试品,依法测定,结果 10 批样品中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量均值为 2.10 mg/g。

3 讨论

本品是由黄芪(炙),党参,麦芽,何首乌(制)等十五味药材组成,本文除对黄芪、何首乌、赤芍、女贞子、丹参药材进行了薄层色谱定性鉴别,还对样品中灵芝、桑寄生进行了薄层色谱鉴别研究,经反复试验,终因分离效果不明显,故未收入标准中。利用 HPLC 法测定何首乌(制)中的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量^[6-8],经试验证明,本方法重复性、精密度、灵敏度、回收率等均符合要求,能有效控制产品的质量。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中药成方制剂[S]. 北京:中国医药科技出版社,1998:226.
[2] 国家药典委员会. 益脑宁片质量标准[J]. 中国药品标准杂志,2003,4(4):24-25.
[3] 国家食品药品监督管理局,局令 28 号,药品注册管理办法[S]. 2007:7-10.
[4] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:196.
[5] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[S]一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:130.
[6] 罗晨曲,吕情花. 高效液相色谱法测定养血安神丸中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量[J]. 药学实践杂志,2013,31(5):386-387.
[7] 农凤鸣,陈松,陆广马,等. HPLC 法测定安神补脑液中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量[J]. 中国药师,2014,17(1):90-92.
[8] 崔玲,李跃辉. HPLC 法测定通乐颗粒中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷[J]. 药物评价研究,2013,36(5):371-373.

(收稿日期:2015-03-30 编辑:文颖娟)

撰稿知识

正确使用统计学符号

根据国家标准 GB3358-82《统计学名词及符号》的有关规定,请作者书写统计学符号时注意以下规格:

- ①样本的算术平均数用英文斜体小写 \bar{x} 表示,不用正体 $\bar{x} \pm s$,也不用 M 或 Mean(中位数仍用 M);②标准差用英文斜体小写 s ,不用 SD;③标准误用英文斜体小写 $s_{\bar{x}}$,不用 SE,也不用 SEM;④ t 检验用英文斜体小写 t ;⑤ F 检验用英文斜体大写 F ;⑥卡方检验用希腊文斜体小写 χ^2 ;⑦相关系数用英文斜体小写 r ;⑧自由度用希腊文斜体小写 γ ;⑨样本用英文斜体小写 n ;⑩概率用英文斜体大写 P 。

王益平 辑