

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊质量标准

李志慧¹, 钱薏¹, 叶静¹, 魏宝红¹, 包巨太², 刘晓亚¹, 曹艳玲³, 韦灵玉¹, 张玉杰^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 河北联合大学中医学院, 河北唐山 063000;
3. 哈尔滨商业大学生命科学与环境研究中心, 哈尔滨 150028)

[摘要] 目的: 建立抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN)定性和定量检测方法, 为其提供质量控制手段。方法: 采用薄层色谱法对方中西洋参、麦冬、莱菔子、王不留行 4 味药物进行定性鉴别; 采用 HPLC-ELSD 法测定西洋参中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 含量。以 Agilent ZORBAX XDB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相乙腈-0.2% 甲酸(梯度洗脱), 柱温为室温; ELSD 参数: 漂移管温度 50 °C, 载气流速 2.0 L·min⁻¹, 增益 1。结果: 薄层色谱专属性强, 分离度好, 图谱斑点清晰, 阴性对照无干扰; 人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 质量分别在 0.75~3.75, 4.5~30, 6~40 μg 对数值与相应峰面积对数值呈良好的线性关系 ($r > 0.999$), 平均回收率分别为 97.10% (RSD 3.96%), 95.15% (RSD 2.21%), 95.60% (RSD 3.00%)。结论: 该方法简便、准确、重复性好且无干扰, 可用于 K-CoxB-JN 中主要药材的鉴别以及人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的含量控制。

[关键词] 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊 (K-CoxB-JN); 薄层色谱鉴别; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; HPLC-ELSD 法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)09-0073-04

[doi] 10.11653/syfyj2013090073

Quality Standard of K-CoxB-JN

LI Zhi-hui¹, QIAN Yi¹, YE Jing¹, WEI Bao-hong¹, BAO Ju-tai²,
LIU Xiao-ya¹, CAO Yan-ling³, WEI Ling-yu¹, ZHANG Yu-jie^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China;
3. School of Chinese Materia Medica, Haerbin University of Commerce, Haerbin 150028, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quantitative and qualitative determination for the quality control standard of K-CoxB-JN. **Method:** TLC was used to identify Panacis Quiaquefolii Radix, Ophiopogonis Radix, Raphani Semen and Vaccariae Semen. The content of ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁ in K-CoxB-JN was determined by HPLC-ELSD. An Agilent ZORBAX XDB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, and the mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% formic acid (gradient elution). The temperature was set at room condition. The parameter of evaporative light-scattering detector: the temperature of drift tube was at 50 °C and the nebulizer nitrogen flow rate was 2.0 L·min⁻¹; gain was 1. **Result:** The TLC spots were highly clear without the interference of negative sample, and had good separation effect. The linear relationship was obtained within the range of 0.75-3.75, 4.5-30 and 6-40 μg for ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁ respectively ($r > 0.999$). The average recoveries of the three components were 97.10% (RSD 3.96%), 95.15% (RSD 2.21%), 95.60% (RSD 3.00%) respectively. **Conclusion:** The method appeared to be simple, accurate, sensitive and reliable, and can be used in

[收稿日期] 20120707(001)

[基金项目] 国家重大新药创制科技重大专项(2009ZX09103-442)

[第一作者] 李志慧, 硕士研究生, 从事质量控制研究, Tel: 010-84738618, E-mail: hui_alassay@126.com

[通讯作者] * 张玉杰, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物制剂新技术及体内外评价研究, Tel: 010-84738618, E-mail: zhyj227@126.com

qualitative and quantitative analysis of K-CoxB-JN.

[Key words] K-CoxB-JN; TLC; ginsenoside R_{g₁}; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; HPLC-ELSD; content determination

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN)来源于临床的有效方剂,由西洋参、麦冬等 7 味中药组成。有益气养阴、补益心气、增加机体免疫功能等作用,可缩短病程,疗效稳定确切^[1],并具有明显的镇痛和抗应激作用^[2-3]。综合本方药物的化学成分、药效特点及临床应用等情况,拟将其采用醇提、水提、大孔树脂净化等加工工艺制成胶囊剂^[4]。为了更好地控制 K-CoxB-JN 产品质量,保证其疗效,采用薄层色谱法对方中 4 味药物进行定性鉴别研究;采用 HPLC-ELSD 法建立制剂君药西洋参中人参皂苷 R_{g₁}, Re, Rb₁ 的含量测定方法,为该制剂质量标准的制定提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,四元梯度泵,Alltech 3300 蒸发光散射检测器;ZF-90 型暗箱式紫外透射灯(上海顾村光电仪器厂);硅胶 G 预制板(青岛海洋化工厂分厂);人参皂苷 R_{g₁}, Rb₁, Re, F₁₁, Rb₃、芥子碱硫氰酸盐、王不留行黄酮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110703-200322, 110754-200822, 110704-201122, MAA010701, 111686-200501, 111702-200501, 111853-201001);西洋参、麦冬、莱菔子、王不留行对照药材(中国药品生物制品检定所,批号分别为 120997-200608, 1013-9903, 121074-200402, 121094-200703);乙腈(色谱纯,美国 MREDA 公司);其他试剂均为分析纯。抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(规格 0.4 g/粒,批号 201001, 201002, 201003)。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 西洋参的薄层鉴别^[5-7] 取本品内容物 5 g,加甲醇 20 mL,加热回流提取 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 20 mL 使溶解,加水饱和正丁醇振摇提取 2 次,每次 25 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗 2 次,每次 10 mL,分取正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取西洋参对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。取缺西洋参的阴性样品,同法制成阴性对照溶液。再取人参皂苷 R_{g₁}, Rb₁, Re, F₁₁, Rb₃ 对照品,加甲醇制成每 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 VI B)试验,分别吸

取上述溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水(15:45:22:10)4℃放置 12 h 后的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。

2.1.2 麦冬的薄层鉴别^[8] 取本品内容物 5 g,加甲醇 50 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 30 mL 使溶解,加盐酸 3 mL,回流 1 h,放冷,用三氯甲烷振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取麦冬对照药材 2 g,同法制成对照药材溶液。取缺麦冬的阴性样品,同法制成阴性对照品。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-丙酮(4:1)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,显相同颜色的荧光斑点,且阴性样品无干扰。

2.1.3 莱菔子的薄层鉴别^[5] 取本品内容物 3 g,加乙醚 30 mL,加热回流 1 h,滤过,弃去乙醚液,药渣挥干,加甲醇 25 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取莱菔子对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。取缺莱菔子药材的阴性药材,同法制成阴性对照溶液。再取芥子碱硫氰酸盐对照品,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 VI B)试验,吸取上述溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以醋酸乙酯-甲酸-水(10:2:3)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,且阴性无干扰。

2.1.4 王不留行的薄层鉴别^[5] 取本品内容物 3 g,加甲醇 40 mL,加热回流 30 min,放冷,滤过,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取王不留行对照药材 1.5 g,同法制成对照药材溶液。取缺王不留行药材的阴性样品,同法制成阴性对照溶液。再取王不留行黄酮苷加甲醇制成每

1 mL 含 0.1 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 VB)试验,吸取上述溶液各 1 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲醇-水(4:6)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液,热风吹干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。

2.2 含量测定

2.2.1 溶液制备^[9-10]

2.2.1.1 对照品溶液 精密称取对照品人参皂苷 Rg₁, Re 和 Rb₁ 适量,分别加甲醇制成每 1 mL 含人参皂苷 Rg₁ 0.25 mg、人参皂苷 Re 1.5 mg、人参皂苷 Rb₁ 2.0 mg 的混合溶液,摇匀,即得。

2.2.1.2 供试品溶液 取本品 6 粒,除去胶囊壳,研细,精密称取 2 g,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇定容,称重,超声处理 30 min,放冷,加甲醇补回原质量,摇匀后过滤,取 25 mL 续滤液置于蒸发皿中于 70 $^{\circ}$ C 水浴挥干。残渣加 15 mL 水使之溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 20 mL。合并正丁醇液。用 20 mL 氨试液洗涤 4 次,每次 2 mL,弃去洗涤液。用旋转蒸发器回收正丁醇,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,即得。

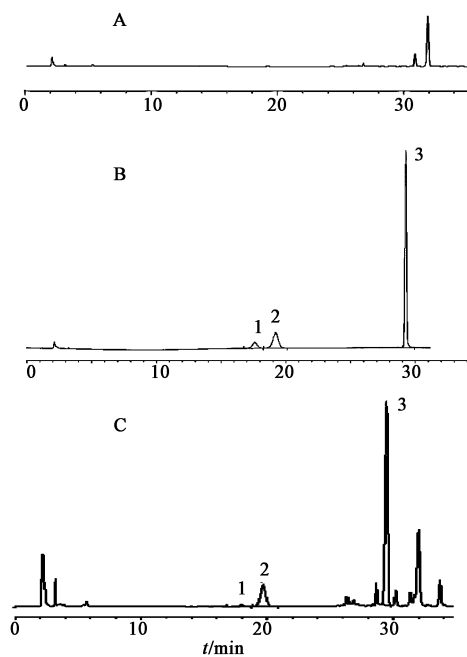
2.2.1.3 阴性对照溶液 按处方比例及制备工艺制得不含西洋参的阴性对样品,按 2.1.2 项下方法制得阴性对照溶液。

2.2.2 色谱条件^[11] Agilent ZORBAX XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);ELSD 参数漂移管温度 50 $^{\circ}$ C,载气流速 2.0 L \cdot min⁻¹,增益 1;柱温室温;以乙腈为流动相 A,以 0.2% 甲酸为流动相 B,按表 1 中的规定进行梯度洗脱;理论板数按人参皂苷 Rg₁ 峰计算应不低于 6 000。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	A/%	B/%
0	20	80
20	20	80
23	30	70
43	40	60

在选定的条件下,人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 与样品中其他组分色谱峰可基线分离,且阴性样品在 Rg₁, Re, Rb₁ 出峰处无干扰。人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 对照品及样品、阴性对照品色谱图。见图 1。



A. 阴性对照品; B. 对照品; C. 供试品;

1. 人参皂苷 Rg₁; 2. 人参皂苷 Re; 3. 人参皂苷 Rb₁

图 1 CoxB-JN HPLC 色谱

2.2.3 方法学研究

2.2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 3, 5, 10, 15, 20 μ L, 依次注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积对数值为纵坐标(Y), 以对照品进样量对数值为横坐标(X) 绘制标准曲线, 得人参皂苷 Rg₁ 回归方程为 $Y = 1.473X + 1.7635$ ($r = 0.9992$), 人参皂苷 Re 回归方程为 $Y = 1.3483X + 1.7797$ ($r = 0.9994$), 人参皂苷 Rb₁ 回归方程为 $Y = 1.2642X + 2.0812$ ($r = 0.9993$)。结果表明人参皂苷 Rg₁ 在 0.75 ~ 3.75 μ g, 人参皂苷 Re 在 4.5 ~ 30 μ g, 人参皂苷 Rb₁ 在 6 ~ 40 μ g 呈线性关系。

2.2.3.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μ L, 重复进样 5 次, 人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的峰面积积分值的平均值分别为 1 762.24 (RSD 1.18%), 2 593.82 (RSD 1.18%), 5 540.18 (RSD 1.25%), 表明精密度良好。

2.2.3.3 稳定性试验 依法制备供试品溶液, 分别于制备后 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h 进样 10 μ L 测定峰面积, 结果人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 峰面积的 RSD 分别为 2.89%, 2.50%, 2.50%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.3.4 重复性试验 取同一批次的 K-CoxB-JN (批号 201003) 6 份, 分别精密称定, 按 2.2.1 供试品溶液制备项下操作, 按前述测定方法测定制剂中

人参皂苷 Rg_1 , Re 和 Rb_1 的含量分别为 0.055% (RSD 4.9%), 0.447% (RSD 2.9%), 0.910% (RSD 2.8%)。结果表明此法重复性良好。

2.2.3.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的 K-CoxB-JN 内容物(批号 201003)1 g,按照 1:1 比例加入各对照品,按 2.2.1 供试品溶液制备项下操作,制备溶液,测定,计算回收率。结果见表 2。

表 2 K-CoxB-JN 中 3 种成分加样回收率测定

测定成分	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
Rg_1	0.547	0.59	1.12	95.00	97.10	3.96
	0.550	0.59	1.15	101.50		
	0.548	0.59	1.14	101.00		
	0.549	0.59	1.11	95.50		
	0.552	0.59	1.09	92.50		
Re	3.830	4.06	7.72	95.70	95.15	2.21
	3.850	4.06	7.64	93.41		
	3.831	4.06	7.61	93.09		
	3.842	4.06	7.84	98.59		
	3.861	4.06	7.72	94.95		
Rb_1	8.411	8.08	16.55	100.76	95.60	3.00
	8.455	8.08	16.17	95.56		
	8.415	8.08	16.03	94.22		
	8.438	8.08	15.96	93.16		
	8.481	8.08	16.10	94.32		

2.3 样品测定 取 3 批 K-CoxB-JN,批号分别为 201001,201002,201003,按 2.2.1 项下方法制成供试品溶液,进样 10 μ L,测定峰面积,依法计算人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 含量,结果见表 3。

表 3 K-CoxB-JN 中皂苷成分的含量 %

批号	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb_1	人参皂苷 总量
201001	0.052	0.446	0.882	1.38
201002	0.056	0.476	0.910	1.44
201003	0.055	0.382	0.839	1.28

3 讨论

由于样品色谱图中峰较多,分离度要求高,故对流动相选择配比进行了考察。经多次摸索,选用文献^[12]中乙腈-甲酸系统,使峰形得到了改善,同时提高了各组分间的分离度。流动相在前 20 min 采用等度洗脱[乙腈-甲酸(20:80)],可使人参皂苷 Rg_1 与 Re 分离,由于 Rb_1 分析时间较长,采用了梯度洗

脱的方法,减短了总分析时间,使得人参皂苷与供试品溶液中的杂质峰理想分离。本法同样适用于西洋参药材的含量测定,可在 30 min 左右获得分离理想的 3 种皂苷单峰,较 2010 年版《中国药典》中西洋参药材含量测定方法(60 min 内出峰)提高了工作效率。

君药西洋参主要成分人参皂苷 Rg_1 , Re 和 Rb_1 成分相差较大,较难同时控制。因此本方法通过方法学评价,能迅速、准确、稳定的对样品进行测定,可用于抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊的质量控制手段。

[参考文献]

- [1] 邢纪萍,包巨太,李志田,等. 抗柯萨奇 B 中药胶囊治疗病毒性心肌炎的临床疗效评价[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(6):701.
- [2] 张博男,韩淑英,李洁,等. 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方水提物的镇痛和抗应激作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):133.
- [3] 储金秀,韩淑英,余红,等. 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方的优化及抗应激作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):153.
- [4] 包巨太,韦灵玉,刘倩,等. 正交试验法优选抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):16.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:122,255,49.
- [6] 孙华. 近年来西洋参鉴别方法研究进展[J]. 时珍国医国药, 1999,10(1):61.
- [7] 李永国,王峥涛. 人参、西洋参质量标准研究进展[J]. 中国药品标准, 2005, 6(5):10.
- [8] 戚雁飞. 运用薄层色谱方法区别麦冬与山麦冬[J]. 浙江中医学院学报, 2003, 28(6):85.
- [9] 陈祖云,石凌云,黄勇,等. HPLC-ELSD 法测定脑通颗粒中的黄芪甲苷和人参皂苷 Rb_1 的含量及稳定性[J]. 中国药房, 2011, 22(23):2164.
- [10] 毕晓黎,罗文汇,李素梅. HPLC-ELSD 法测定三七止血胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):75.
- [11] 蔡艳,郭文胜. HPLC-ELSD 测定西洋参中人参皂苷含量[J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(1):64.
- [12] 王守箐. HPLC-ELSD 测定参芪降糖颗粒中的人参皂苷 Rg_1 和 Re 的含量[J]. 中草药, 2005, 36(2):219.

[责任编辑 顾雪竹]