

醒脑通脉胶囊质量标准的提升

覃翔^{1,2} 韦世民^{1,2} 黄鸿教^{1,2} 韦胡丹³ 陈壮^{1,2} (1.广西中医药大学附属瑞康医院 南宁 530011; 2.广西壮瑶药工程技术研究中心; 3.广西右江民族医学院)

摘要 目的:提升醒脑通脉胶囊的质量标准。**方法:**采用化学反应法鉴别冰片;薄层色谱法鉴别石菖蒲、地龙、胆南星;高效液相一测多评法测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量,色谱柱为 Shim-pack GIS C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,流速为1.0 ml·min⁻¹,柱温为25℃,检测波长为203 nm。以三七皂苷 R_1 为内标参照物,建立其与人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的相对校正因子,并计算含量;同时采用外标法测定醒脑通脉胶囊中3种皂苷的含量,将2种方法的测定结果进行对比,验证一测多评法(QAMS)的科学性及可行性。**结果:**冰片反应显色,阴性无干扰;石菖蒲、地龙、胆南星图谱清晰,阴性无干扰,重现性好;三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 分别在39.069~312.552 μ g·ml⁻¹ ($r=0.999\ 4$)、160.899~1 287.192 μ g·ml⁻¹ ($r=0.999\ 7$)、80.859~646.872 μ g·ml⁻¹ ($r=0.999\ 3$) 浓度范围内与峰面积线性关系良好,平均加样回收率(RSD)分别为103.55%(1.12%)、102.69%(1.25%)、102.45%(1.54%) ($n=6$);以三七皂苷 R_1 为内标,人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的相对校正因子分别为0.915 6、1.472 3,一测多评法的计算值与外标法测定值无明显差异。**结论:**该方法简便,专属性强,耐用性和重复性均较好,可用于醒脑通脉胶囊的质量控制。

关键词 醒脑通脉胶囊;质量标准;薄层色谱法;高效液相一测多评法;三七皂苷 R_1 ;人参皂苷 R_{g_1} ;人参皂苷 R_{b_1}

中图分类号:TQ460.7⁺2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2022)12-2223-07

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.12.029

Improvement of Quality Standard for Xingnao Tongmai Capsules

Qin Xiang^{1,2}, Wei Shimin^{1,2}, Huang Hongjiao^{1,2}, Wei Hudan³, Chen Zhuang^{1,2} (1.Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 2.Guangxi Zhuang Yao Medicine Engineering Technology Research Center; 3.Youjiang Medical College for Nationalities)

ABSTRACT Objective: To improve the quality standard for Xingnao Tongmai capsules.**Methods:** Borneol was identified by chemical reaction method; Acori tatarinowii rhizoma, Pheretima and Arisaema cum bile were identified by thin layer chromatography; the contents of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} were determined by HPLC-QAMS. The chromatographic column was Shim-pack GIS C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), the mobile phase was acetonitrile (A)-water (B) with gradient elution, the flow rate was 1.0 ml·min⁻¹, the column temperature was 25℃, and the detection wavelength was 203 nm. Using notoginsenoside R_1 as the internal reference substance, the relative correlation factors of ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} were calculated, and the contents were calculated; at the same time, the contents of the three saponins in Xingnao Tongmai capsules were determined by using an external standard method, the results of the two methods were compared to verify the scientificity and feasibility of QAMS.**Results:** Borneol developed chromogenic reaction without any negative interference; the spots of Acori tatarinowii rhizoma, Pheretima and Arisaema cum bile were clear with good reproducibility and without any negative interference; the solution concentrations of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} showed good linear relationships with the peak areas within the range of (39.069-312.552) μ g·ml⁻¹ ($r=0.999\ 4$), (160.899-1 287.192) μ g·ml⁻¹ ($r=0.999\ 7$) and (80.859-646.872) μ g·ml⁻¹ ($r=0.999\ 3$), respectively. The av-

基金项目:2021年广西中药壮瑶药院内制剂孵化基地项目[编号:桂中医药发(2021)7号];2022年广西中医药管理局自筹经费科研课题(编号:GXZYA20220110)

通信作者:陈壮 Tel:13878858459 E-mail:447862003@qq.com

4 吴缠婷,周良良,邹婉清,等.黄芩苷的药理特性及其作用机制研究进展[J].中华中医药学刊,2022,40(2):63-65

5 甄品,张昆鹏,李少一,等.黄芩苷对SAP并发膜周感染大鼠T淋巴细胞亚群及相关细胞因子水平的影响[J].中华医院感染学杂志,2022,32(3):321-325

6 云云,汪长中,桂丽,等.黄芩苷经由TLR4信号转导通路抗呼吸道合胞病毒作用的研究[J].中成药,2013,35(6):1116-1120

7 田新,李梓欣,战瑞雪,等.菊苣酸抗氧化及抗炎作用机制研究进展[J].中药材,2022,45(2):504-508

8 王红,冯帅,史磊,等.菊苣酸的研究进展[J].药学研究,2021,9(40):614-619

9 吴超,丛晓娟,高源,等.菊苣酸的研究现状与展望[J].中华中医药杂志,2021,36(12):7234-7237

10 彭小园,陈子月,崔兵,等.耳聋胶囊HPLC指纹图谱建立及5种成分测定[J].中成药,2022,44(3):718-723

11 卜琛琛,刘学良,刘亚蓉,等.复方金银花颗粒质量标准提高研究[J].承德医学院学报,2021,38(1):31-36

12 李婷,张义生,杨柳,等.妇科灌肠液质量标准的建立[J].中国药师,2021,24(3):579-582

13 江静怡,史方超,白玲玲,等.消银颗粒质量标准研究[J].中国药业,2022,31(5):82-85

(2022-06-20 收稿 2022-08-09 修回)

erage recovery (*RSD*) was 103.55% (1.12%), 102.69% (1.25%) and 102.45% (1.54%), respectively ($n=6$); using notoginsenoside R_1 as the internal reference substance, the relative correction factors of ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} were 0.9156 and 1.472 3, respectively. There was no significant difference between the calculated value of QAMS and the measured value of external standard method. **Conclusion:** The method is simple, specific, durable and reproducible, and can be used for the quality control of Xingnao Tongmai capsules.

KEY WORDS Xingnao Tongmai capsules; Quality standard; Thin layer chromatography; HPLC-QAMS; Notoginsenoside R_1 ; Ginsenoside R_{g_1} ; Ginsenoside R_{b_1}

醒脑通脉胶囊是广西中医药大学附属瑞康医院的院内制剂(桂药制字:Z01060151),由三七、胆南星、地龙、石菖蒲和冰片组方而成,具有活血祛瘀、醒脑通脉的功效,适用于短暂性脑缺血发作、缺血性心脑血管病,在我院临床应用已有 20 余载,疗效确切、安全稳定,患者普遍反映良好^[1,2]。醒脑通脉胶囊现行质量标准仅有中国药典中胶囊剂项下规定的检查项,无质量控制项。本文建立冰片的化学反应鉴别法;石菖蒲、地龙、胆南星的 TLC 鉴别法;三七中有效成分三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的外标(ESM)及一测多评(QAMS)含量测定法,旨在提升其质量标准,以便更加全面地控制醒脑通脉胶囊的质量,报道如下。

1 仪器与试药

岛津 LC-2030(Plus) 高效液相色谱仪(包括真空脱气机、四元泵、自动进样器、UV 检测器);WFH-205B 可见透身紫外反射仪(上海精科实业);XS205DU 电子天平(Mettler Toledo,十万分之一);VGT-2227QTD 超声波清洗机(广东固特超声);TH-II 型数控薄层色谱加热器(上海科哲生化科技);定量毛细管(德国赫施曼,1 μ l, 2 μ l, 5 μ l);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工, 10 cm \times 10 cm, 批号:20201225)。

醒脑通脉胶囊(广西中医药大学附属瑞康医院制剂室,批号分别为 20210816、20210818、20210820、20210922、20210923、20210924);三七(批号:20201102,广西德润堂中药科技有限公司)、地龙(批号:20210610,广西柳州百草堂药业有限公司)、胆南星(批号:20110201,成都兴沣瑞中药饮片有限责任公司)、石菖蒲(批号:20200211,广西柳州百草堂药业有限公司)、冰片(批号:190713,四川青神康华制药有限公司)等药材经广西中医药大学附属瑞康医院主任药师陈壮鉴定,符合中国药典 2020 年版一部规定;石菖蒲对照药材(批号:121098-201807)以及亮氨酸(批号:110876-200204)、猪去氧胆酸(批号:100087-201411,纯度 99.7%)、三七皂苷 R_1 (批号:110745-201921,纯度 90.4%)、人参皂苷 R_{g_1} (批号:110703-202034,纯度 94.0%)、人参皂苷 R_{b_1} (批

号:110704-202028,纯度 93.1%) 等对照品均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为市售娃哈哈纯净水。

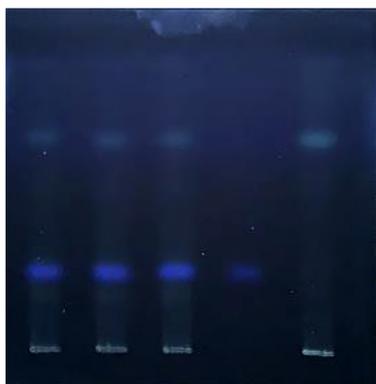
2 方法与结果

2.1 鉴别

2.1.1 冰片 取本品的胶囊内容物 10 g,加乙醚 30 ml,超声处理(600 W, 40 kHz) 2 min,滤液置蒸发皿,自然挥干,残渣滴新制的 1%香草醛硫酸溶液 1~2 滴,溶液边缘显淡紫色;取处方缺冰片的其余药材,按处方相同制备工艺制得的阴性样品 10 g,照上述试验进行检验,溶液显棕褐色。

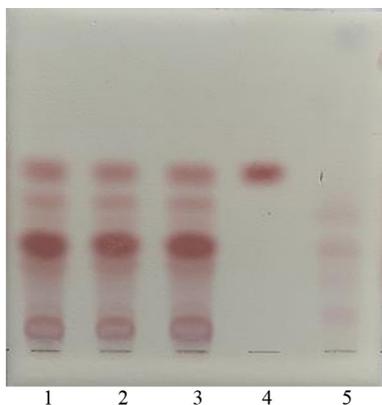
2.1.2 石菖蒲 取本品的胶囊内容物 2 g,加石油醚(60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 50 ml,超声处理(600 W, 40 kHz) 20 min,取出,放冷至室温,滤过,滤液挥干,残渣加石油醚(60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。取石菖蒲对照药材 0.5 g,加石油醚(60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 20 ml,同法制成对照药材溶液。取处方缺石菖蒲的其余药材,按处方相同制备工艺制得的阴性样品 2 g,照供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各 8 μ l,对照药材溶液 4 μ l,依次点样在同一硅胶 G 薄层板上,使成条带状,以石油醚(60 ~ 90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(3 : 1, V/V) 为展开剂,上行展开,取出,晾干,放置约 1 h 后,置于紫外光(365 nm)灯下进行检视。在供试品溶液色谱中,与对照药材溶液色谱相对应的位置上,有相同颜色的荧光斑点显现,斑点比移值适中,阴性对照品溶液色谱中无干扰斑点显现。结果见图 1。

2.1.3 地龙 取本品的胶囊内容物 2 g,加水 30 ml,超声处理(600 W, 40 kHz) 20 min,取出,放冷至室温,滤过,滤液蒸干,残渣加水 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。取亮氨酸对照品,加甲醇制成浓度为 0.5 mg \cdot ml⁻¹ 的溶液,作为对照品溶液。取处方缺地龙的其余药材,按处方相同制备工艺制得的阴性样品 2 g,照供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各 8 μ l,对照品溶液 2 μ l,依次点样在同一硅胶 G 薄层板上,使成条带状,以正丁醇-冰醋酸-水(4 : 1 : 1, V/V/V) 为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,在



1~3.供试品溶液(批号:20210816、20210818、20210820)
4.对照药材溶液 5.阴性对照品溶液

图1 石菖蒲 TLC图(T:32.9℃,RH:61%,展距:8 cm)
105℃下加热,直至斑点慢慢清晰显色,置于日光下进行检视。在供试品溶液色谱中,与对照品溶液色谱相对应的位置上,有相同颜色的斑点显现,斑点比移值适中,阴性对照品溶液色谱中无干扰斑点显现。结果见图2。

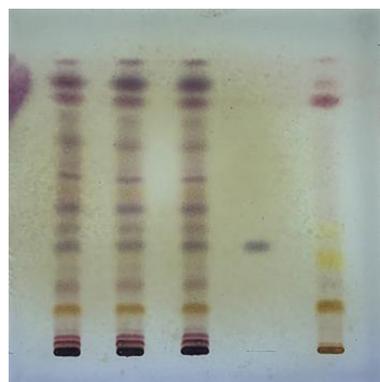


1~3.供试品溶液(批号:20210816、20210818、20210820)
4.对照品溶液 5.阴性对照品溶液

图2 地龙 TLC图(T:31.9℃,RH:69%,展距:8 cm)

2.1.4 胆南星^[3] 取本品的胶囊内容物4 g,加无水乙醇40 ml,超声处理(600 W,40 kHz)10 min,取出,放冷至室温,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。取猪去氧胆酸对照品,加甲醇制成浓度为0.5 mg·ml⁻¹的溶液,作为对照品溶液。取处方缺胆南星的其余药材,按处方相同制备工艺制得的阴性样品4 g,照供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。吸取供试品溶液、阴性对照品溶液各8 μl,对照品溶液1 μl,依次点样在同一硅胶G薄层板上,使成条带状,以环己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(11:3:2,V/V/V)为展开剂,上行展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃下加热,直至斑点慢慢清晰显色,置于日光下进行检视。在供试品溶液色谱中,与对照品溶液色谱相对应的位置上,有相同颜色的斑点显现,斑点比移值适中,阴性对照

品溶液色谱中无干扰斑点显现。结果见图3。



1~3.供试品溶液(批号:20210816、20210818、20210820)
4.对照品溶液 5.阴性对照品溶液

图3 胆南星 TLC图(T:28.7℃,RH:49%,展距:8 cm)

2.2 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}含量测定^[4]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Shim-pack GIS C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相A:乙腈,流动相B:水,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml·min⁻¹;柱温:25℃;进样量:10 μl;检测波长:203 nm;理论板数按人参皂苷 R_{g1}峰计算应不低于6 000。

表1 梯度洗脱程序表

时间(min)	乙腈(%)	水(%)
0~20	20	80
20~45	20→46	80→54
45~55	46→55	54→45
55~60	55	45
60~65	55→46	45→54
65~70	46→20	54→80
70~75	20	80

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品的胶囊内容物约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇30 ml,称定质量,超声处理(600 W,40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,滤过,滤液蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}对照品适量,加甲醇制成浓度分别为390.69,1 608.99,808.59 μg·ml⁻¹的混合对照品溶液,备用。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 取处方缺三七的其余药材,按处方相同制备工艺制得的阴性样品约1g,照供试品溶液制备方法制备,即得。

2.2.5 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图见图4。对照品溶液和供试品溶液

色谱图中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 色谱峰峰形对称,理论板数按人参皂苷 R_{g_1} 峰计均大于 6 000,阴性样品溶液对该成分的测定无干扰,表明方法专属性较强。

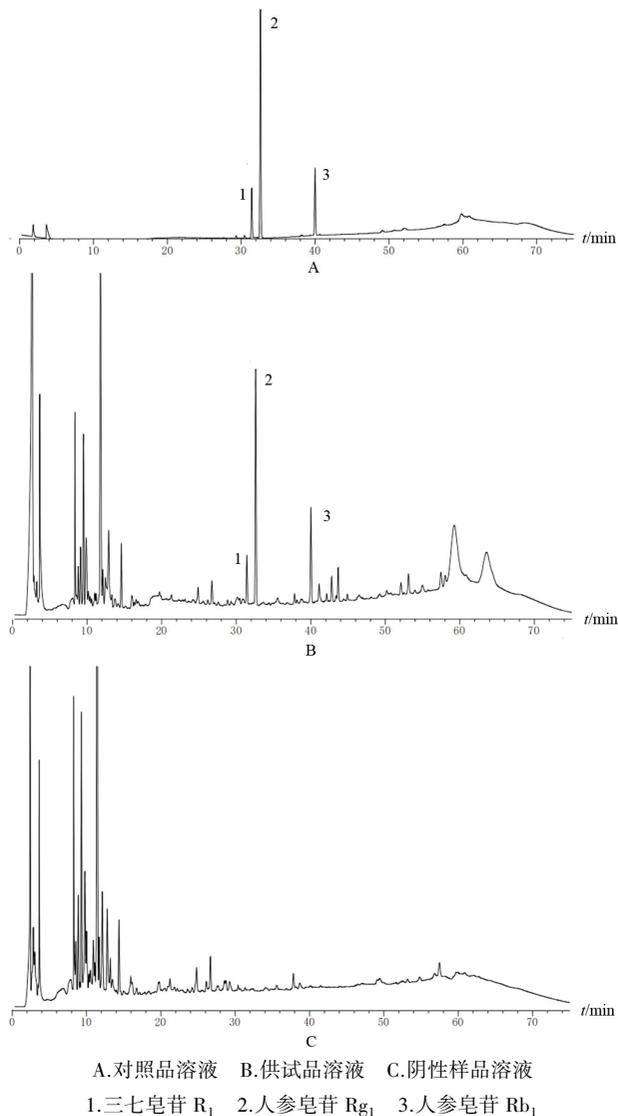


图4 HPLC 色谱图

2.3 ESM 法

2.3.1 线性关系考察 取“2.2.3”项下混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得 5 个梯度对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 溶液浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 为横坐标进行线性回归, 得各成分的回归方程、相关系数及线性范围见表 2。结果表明, 该色谱条件下, 所测成分线性关系良好。

2.3.2 精密性、重复性、稳定性试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 用甲醇稀释 2 倍, 作为混合对照品溶液 II。取混合对照品溶液 II 适量, 以“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定, 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 3 种成分峰面积的 RSD

表 2 各成分线性关系

成分	回归方程	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	r
三七皂苷 R_1	$Y = 4.18 \times 10^3 X - 3.94 \times 10^4$	39.069~ 312.552	0.9994
人参皂苷 R_{g_1}	$Y = 4.57 \times 10^3 X - 1.66 \times 10^5$	160.899~ 1287.192	0.9997
人参皂苷 R_{b_1}	$Y = 2.80 \times 10^3 X - 3.95 \times 10^4$	80.859~ 646.872	0.9993

值分别为 0.32%, 0.18%, 0.27% ($n = 6$), 表明仪器精密性良好。取同一批醒脑通脉胶囊 (批号: 20210816), 按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定, 得三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 三种成分的平均含量分别为 1.728 5, 7.253 2, 5.167 3 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.74%, 0.51%, 0.33% ($n = 6$), 表明本方法的重复性良好。取同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 得三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 三种成分峰面积的 RSD 分别为 0.69%, 0.45%, 0.34% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 加样回收率试验 取已知三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 三种成分含量的醒脑通脉胶囊 (批号: 20210816) 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入“2.2.3”项下配制的混合对照品溶液 2 ml, 再精密加入甲醇 28 ml, 按“2.2.2”项下“称定质量, 超声处理 (600 W, 40 kHz) 30 min”起制备加样供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定, 计算回收率。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的平均回收率分别为 103.55%, 102.69%, 102.45%, RSD 分别为 1.12%, 1.25%, 1.54%。

2.3.4 样品含量测定 取 6 批 (批号: 20210816、20210818、20210820、20210922、20210923、20210924) 样品, 每个批次各 3 份, 制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定并计算含量, 结果见表 3。三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的总平均含量分别为 1.721 7, 7.289 2, 5.113 1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 0.83%, 0.99%, 1.42%。

表 3 样品含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

批号	三七皂苷 R_1	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_{b_1}
20210816	1.7264	7.3182	5.1738
20210818	1.7342	7.3515	5.1786
20210820	1.7400	7.3825	5.1788
20210922	1.7166	7.2569	5.0833
20210923	1.7033	7.2107	5.0297
20210924	1.7096	7.2154	5.0341

2.4 QAMS^[5,6]

2.4.1 相对校正因子的计算 采用校准曲线相对斜率法及浓度法,以三七皂苷 R₁为内标参照物,测定其他2种指标成分相对于三七皂苷 R₁的校正因子。

2.4.1.1 斜率法相对校正因子的计算 使用各成分标准曲线的斜率,以三七皂苷 R₁斜率/待测成分斜率计算各成分校正因子,结果见表4。

表4 斜率法相对校正因子结果

成分	线性斜率	校正因子
三七皂苷 R ₁	4181.4	1.0000
人参皂苷 R _{g₁}	4570.2	0.9149
人参皂苷 R _{b₁}	2801.8	1.4924

2.4.1.2 浓度法相对校正因子的计算 将混合对照溶液进样 10 μl (n=3),分析测定,峰面积以平均值计,以 $(C_x/A_x)/(C_{R1}/A_{R1})$ 计算各成分的浓度校正因子,式中 C_x为待测成分的浓度, A_x为待测成分色谱峰面积, C_{R1}为三七皂苷 R₁的浓度, A_{R1}为三七皂苷 R₁的色谱峰面积,结果见表5。

表5 浓度法相对校正因子结果

成分	浓度(μg·ml ⁻¹)	校正因子
三七皂苷 R ₁	390.69	1.0000
人参皂苷 R _{g₁}	1608.99	0.9102
人参皂苷 R _{b₁}	808.59	1.4509

2.4.2 相对校正因子的耐用性考察

2.4.2.1 检测波长 固定其他色谱条件不变,本试验考察了检测波长 201, 202, 203, 204, 205 nm 对相对校正因子的影响,采用斜率法和浓度法分别计算,结果见表6,可知均无明显影响(RSD<5%)。

表6 不同波长对相对校正因子的影响结果(n=3)

波长(nm)	方法	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _{b₁}
201	斜率法	1.0000	0.9122	1.4853
	浓度法	1.0000	0.9057	1.4633
202	斜率法	1.0000	0.9182	1.4878
	浓度法	1.0000	0.9101	1.4502
203	斜率法	1.0000	0.9149	1.4924
	浓度法	1.0000	0.9102	1.4509
204	斜率法	1.0000	0.9195	1.4982
	浓度法	1.0000	0.9133	1.4681
205	斜率法	1.0000	0.9234	1.5011
	浓度法	1.0000	0.9072	1.4682
平均相对校正因子		1.0000	0.9135	1.4766
RSD (%)		0	0.61	1.28

2.4.2.2 体积流量^[7] 固定其他色谱条件不变,本试验考察了体积流量0.6, 0.8, 1.0, 1.3, 1.5 ml·min⁻¹对相对校正因子的影响,采用斜率法和浓度法分别计算,结果见表7,可知均无明显影响(RSD<5%)。

2.4.2.3 柱温 固定其他色谱条件不变,本试验考察了柱温 20, 25, 30, 35℃对相对校正因子的影响,采用斜率法和浓度法分别计算,结果见表8,可知均无明显影响(RSD<5%)。

表7 不同体积流量对相对校正因子的影响结果(n=3)

体积流量(ml·min ⁻¹)	方法	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _{b₁}
0.6	斜率法	1.0000	0.9102	1.4803
	浓度法	1.0000	0.9005	1.4439
0.8	斜率法	1.0000	0.9133	1.4955
	浓度法	1.0000	0.9064	1.4628
1.0	斜率法	1.0000	0.9149	1.4924
	浓度法	1.0000	0.9102	1.4509
1.3	斜率法	1.0000	0.9218	1.4895
	浓度法	1.0000	0.9177	1.4681
1.5	斜率法	1.0000	0.9285	1.4998
	浓度法	1.0000	0.9243	1.4748
平均相对校正因子		1.0000	0.9148	1.4758
RSD (%)		0	0.93	1.30

表8 不同柱温对相对校正因子的影响结果(n=3)

柱温(℃)	方法	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _{b₁}
20	斜率法	1.0000	0.9121	1.4805
	浓度法	1.0000	0.9043	1.4625
25	斜率法	1.0000	0.9149	1.4924
	浓度法	1.0000	0.9102	1.4509
30	斜率法	1.0000	0.9286	1.4956
	浓度法	1.0000	0.9175	1.4551
35	斜率法	1.0000	0.9259	1.5012
	浓度法	1.0000	0.9155	1.4631
平均相对校正因子		1.0000	0.9161	1.4752
RSD (%)		0	0.87	1.34

2.4.2.4 色谱柱 固定其他色谱条件不变,本试验考察了色谱柱 Shim-pack GIS C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、VenusiL XBP C₁₈(L) (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Symmetry Shield RP₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)对相对校正因子的影响,采用斜率法和浓度法分别计算,结果见表9,可知均无明显影响(RSD<5%)。

表9 不同色谱柱对相对校正因子的影响结果(n=3)

色谱柱	方法	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _{b₁}
Shim-pack	斜率法	1.0000	0.9149	1.4924
	浓度法	1.0000	0.9102	1.4509
VenusiL XBP	斜率法	1.0000	0.9279	1.4952
	浓度法	1.0000	0.9156	1.4634
C ₁₈ (L)	斜率法	1.0000	0.9429	1.5231
	浓度法	1.0000	0.9033	1.4630
Symmetry Shield RP ₁₈	斜率法	1.0000	0.9191	1.4813
	浓度法	1.0000	0.9191	1.4813
平均相对校正因子		1.0000	0.9191	1.4813
RSD (%)		0	1.54	1.82

2.4.3 色谱峰定位 采用相对保留时间法,分别考察内标和其他待测成分在不同波长、体积流量、柱温、色谱柱下的相对保留时间,结果均无明显差异(RSD<5%)。

2.4.4 相对校正因子的重复性考察 3个不同实验人员采用“2.4.1”项下所述斜率法和浓度法对相对校正因子进行测定,见表10。结果表明,3位实验人员相对校正因子测定值的RSD均小于2%,相对校正因子值具有较好的重现性。因此采用3位实验人员测定的平均相对校正因子作为一测多评法的校正因子。

表 10 不同实验人员的相对校正因子的测定结果 ($n=3$)

实验人	方法	三七皂苷 R_1	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_{b_1}
I	斜率法	1.0000	0.9149	1.4924
	浓度法	1.0000	0.9102	1.4509
II	斜率法	1.0000	0.9283	1.4896
	浓度法	1.0000	0.9166	1.4612
III	斜率法	1.0000	0.9096	1.4835
	浓度法	1.0000	0.9137	1.4563
平均相对校正因子		1.0000	0.9156	1.4723
RSD (%)		0	0.74	1.24

表 11 ESM 与 QAMS 测定醒脑通脉胶囊中 3 种皂苷成分的含量比较 ($n=3$)

批号	三七皂苷 R_1		人参皂苷 R_{g_1}		人参皂苷 R_{b_1}		
	ESM ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	ESM ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	QAMS ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RAD (%)	ESM ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	QAMS ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RAD (%)
20210816	1.7264	7.3182	7.3616	0.2956	5.1738	5.2505	0.6392
20210818	1.7342	7.3515	7.3952	0.2963	5.1786	5.2552	0.7342
20210820	1.7400	7.3825	7.4265	0.2971	5.1788	5.2540	0.7208
20210922	1.7166	7.2569	7.2992	0.2906	5.0833	5.1580	0.7294
20210923	1.7033	7.2107	7.2536	0.2966	5.0297	5.1047	0.7401
20210924	1.7096	7.2154	7.2570	0.2874	5.0341	5.1080	0.7286

3 讨论

3.1 指标成分筛选

醒脑通脉胶囊其方药中重用三七为君,其味甘、微苦,性温,具有益气活血之功效^[8],故本试验选用三七中 3 种主要皂苷类有效成分进行含量测定;其中三七皂苷 R_1 是三七的主要特征成分之一,质量稳定,在 HPLC 分析中峰分离度较好,故选择其作为内标参照物。

3.2 鉴别方法筛选

本试验在选择定性鉴别方法时,因冰片在药材中含量极小 ($<4\%$),薄层鉴别难以检出,故选择化学反应显色鉴别;对石菖蒲、地龙进行薄层鉴别时,均参考了中国药典 2020 年版一部^[9]中该药材项下的鉴别方法。其中在进行石菖蒲鉴别时,按照药典方法试验所得到的图谱里,供试品及对照药材色谱中主斑点的比移值较小,由于石菖蒲中主要成分为挥发油,极性较小,故调整方法中展开剂的比例,由石油醚 ($60 \sim 90^\circ\text{C}$)-乙酸乙酯 ($4:1, V/V$) 改为石油醚 ($60 \sim 90^\circ\text{C}$)-乙酸乙酯 ($3:1, V/V$),使展开剂的极性增大,调整主斑点的位置;在进行地龙鉴别时,按照药典方法试验所得到的图谱里,供试品色谱中,赖氨酸、缬氨酸对照品相对应的位置斑点不明显,故最终仅选择亮氨酸作为对照品进行鉴别。

3.3 HPLC 条件筛选

在进行含量测定研究中,对供试品的提取溶剂进行了筛选(水、乙醇、甲醇),最终甲醇提取的溶液经测定皂苷成分含量最高,故选择甲醇提取;色谱条件优化中,对梯度洗脱的时间程序进行了大量摸索,

2.5 ESM 与 QAMS 测定结果比较

取 6 个批次的醒脑通脉胶囊(批号:20210816、20210818、20210820、20210922、20210923、20210924),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依法进样测定,记录峰面积,分别用外标法和一测多评法计算 3 种成分的含量并对结果进行比较,见表 11,2 种方法所得值的相对平均偏差 (RAD) $<2\%$,表明所建立的一测多评法稳定可行。

最终在文中选定的洗脱程序下进样测定时,色谱峰峰形对称,无峰形过宽及拖尾现象,待测成分峰与相邻的杂质峰分离度均符合要求 (大于 1.5)。

3.4 一测多评法考察

与外标法相比,一测多评法只需要采用一种对照,就能实现多种成分的同时测定,降低了对照品的使用成本^[10]。本试验选择三七皂苷 R_1 为内标,考察了在不同检测波长、体积流量、柱温、色谱柱下人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的相对校正因子 (采用斜率法和浓度法分别计算) 和相对保留时间,发现方法耐用性较强;通过不同操作人的试验,发现方法重复性较好;最后,将一测多评法所得结果与外标法进行比较,发现无明显差异,表明该方法可用于醒脑通脉胶囊中 3 种皂苷类成分的含量测定。

3.5 成品验证

由于制剂的生产批次有限,本试验仅选用近 1 年生产的 6 个批次样品进行含量测定,结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量范围波动较小,质量较稳定。后续将进行更多批次样品的检测,以制订该制剂含量测定的限度范围^[11]。

参 考 文 献

- 1 刘泰.自拟醒脑通脉胶囊治疗急性脑血栓的研究[J].临床荟萃, 2000,15(19):867-868
- 2 刘泰,吕玉宝,梁健芬,等.醒脑通脉胶囊治疗脑梗塞的临床疗效研究[J].辽宁中医杂志,2007,34(12):1745-1746
- 3 蔡宇忆.胆南星的质量标准提高研究[D].广州:广东药科大学, 2016
- 4 李海亮,张雯洁,金红宇,等.一测多评法同时测定血塞通片中 5 种皂苷类成分的含量[J].中国药事,2021,35(4):397-405

应用 Box-Behnken 设计优化柴胡总皂苷的超声提取工艺

黎强 孙明辉 (华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部 武汉 430030)

摘要 目的: 采用 Box-Behnken 设计方法研究柴胡中总皂苷的超声提取工艺。**方法:** 采用超声提取法,以乙醇浓度、超声时间和料液比为主要影响因子,以总皂苷提取率的综合评分为评价指标进行 Box-Behnken 试验设计,考察最佳提取工艺。**结果:** 最优工艺为:乙醇体积分数为 80%,超声时间为 127 min,料液比为 1:13。**结论:** Box-Behnken 设计可以很好地对柴胡总皂苷超声提取工艺进行优化。

关键词 柴胡;Box-Behnken 设计;总皂苷;超声提取工艺

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2022)12-2229-05

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.12.030

Ultrasonic Extraction Process of Total Saponins of *Bupleurum Chinense* Optimized by Box-Behnken Design

Li Qiang, Sun Minghui (Department of Pharmacy, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the ultrasonic extraction process of total saponins of *Bupleurum chinense* by Box-Behnken design.**Methods:** The ultrasonic extraction process was used. Using ethanol concentration, solid-liquid ratio and ultrasonic time as the main impact factors, and total saponins extraction rate as the evaluation index of Box-Behnken design, the best extraction process was explored.**Results:** The best extraction process was as follows: the volume fraction of ethanol was 80%, the ultrasonic time was 127 min, and the ratio of material to liquid was 1:13.**Conclusion:** Box-Behnken design can well optimize the extraction process of total saponins of *Bupleurum chinense*.

KEY WORDS *Bupleurum chinense*; Box-Behnken design; Total saponins; Ultrasonic extraction

柴胡 *Bupleurum chinense* 为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. (北柴胡) 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonifolium* Willd. (南柴胡) 的干燥根,性味辛、苦,微寒;归肝、胆、肺经;具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气之功,用于感冒发热、寒热往来、胸肋胀痛、子宫脱垂、脱肛等^[1]。柴胡的化学成分按结构主要包括柴胡皂苷、挥发油、黄酮类、多糖类等多种类型^[2]。其中柴胡皂苷 (saikosaponins) 已发现了 100 多种,具有抗抑郁、保护神经系统、镇静镇痛、抗菌抗病毒、护肝护肾、抗肿瘤、解热镇咳、抗肺纤维化等等作用。柴胡总皂苷具有降血脂^[3]、改善抑郁及学习障碍^[4]、抑制胃癌细胞 MGC80-3 增值^[5]等药理作用。柴胡皂苷中已经被鉴定的有柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 四种^[6],有学者

利用 RP-HPLC 法测定不同品种不同产地柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量^[7]。

查阅文献,柴胡皂苷的提取方法有利用电磁裂解水提取法、十二万基硫酸钠辅助提取法、乙醇加热回流法、正交设计的溶剂(乙醇等)提取法、闪式提取、循环超声法等方法^[8]。有学者用星点设计-响应面法 (CCD) 考察了乙醇回流提取中提取时间、提取温度和液料比对柴胡皂苷提取率的影响^[9],另外还有以提取时间、提取温度和液料比为考察对象,利用 Box-Behnken design (BBD) 优化柴胡皂苷 a 回流提取工艺的研究^[10]。但由于柴胡总皂苷具有遇热不稳定、易分解的特性^[11],回流提取相对于超声提取,温度高是最主要的弊端。而利用响应面法在柴胡总皂苷超声提取方面的研究尚且不足,故本研究采用

通信作者:孙明辉 Tel:13507181686 E-mail smh007@163.com

5 周颖,王世轩,谢明.基于 HPLC-QAMS 法同时测定清肺散结丸中阿克苷、苦参苷 IB、苦玄参苷 IA、三七皂苷 R₁、绞股蓝皂苷 XLIX、绞股蓝皂苷 A 和绞股蓝皂苷 XVII 的含量[J].中国药师,2020,23(12):2461-2466

6 游蓉丽,林珊,杨晓宁,等.一测多评法同时测定舒血宁注射液中 4 种银杏内酯[J].中成药,2021,43(7):1708-1712

7 付鹏,余晓玲,袁小淋,等.复方臭灵丹合剂提取工艺的优化及质量评价[J].中成药,2021,43(6):1393-1399

8 黄龙坚,黄建民,王凯华,等.醒脑通脉胶囊治疗气虚血瘀型脑梗死恢复期有效性的临床研究[J].陕西中医,2016,37(5):518-520

9 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:94,127

10 王丽丽,廖强,欧妮,等.一测多评法测定防风中 4 种色原酮类成分[J].中国药师,2018,12(1):96-100

11 覃翔,林忆龙,陈壮,等.安肠胶囊质量标准提升研究[J].中国药业,2021,30(24):69-73

(2022-05-10 收稿 2022-08-27 修回)