

★药典标准研讨★

消核片质量控制研究

孟淑智,田金苗,侯峰

(辽宁省食品药品检验所,沈阳 110023)

摘要 目的:研究消核片的质量控制。方法:采用显微鉴别法对浙贝母和金果榄进行鉴别;采用薄层色谱法对制剂中的夏枯草、半枝莲进行定性鉴别;用高效液相色谱法对浙贝母中贝母素甲和贝母素乙进行了含量测定。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (200 mm×4.6 mm 5 μm) 柱,流动相为乙腈-水-二乙胺(70:30:0.03),流速 1.0 mL·min⁻¹,蒸发光散射检测器。结果:显微鉴别可以快速鉴别浙贝母和金果榄;薄层色谱能明显检出夏枯草、半枝莲。贝母素甲在 1.7664~5.5200 μg 范围内线性关系良好(r=0.9995 n=5),平均回收率 98.22%(n=6)。贝母素乙在 1.2800~4.0000 μg 范围内线性关系良好(r=0.9998 n=5),平均回收率 93.45%(n=6)。结论:新建立的质量控制方法能有效地控制消核片的质量,可作为本品质量标准。

关键词:消核片;质量控制;显微鉴别;薄层色谱法;高效液相色谱法;贝母素甲;贝母素乙;含量测定

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)03-0592-04

Study on quality control of Xiaohe Tablets

MENG Shu-zhi TIAN Jin-miao HOU feng

(Liaoning provincial Institute for control of Food and Drug,Shenyang 110023,China)

Abstract Objective: To study on Quality Control of Xiaohe Tablets. Method: Bulbus Fritillariae Thunbergii and radix tinosporae were identified by microscopical identification; Common Selfheal and Sculellaria barbata were determined by TLC; The content of peimine and peiminine were determined by HPLC. Column is Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm 5 μm) column and a mixture of methanol-water-diethylaminer(70:30:0.03) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹,ELSD. Result: Bulbus Fritillariae Thunbergii and radix tinosporae were quickly identified by microscopical identification; Prunella vulgaris and Sculellaria barbata were determined by TLC. A linear relationship of Peimine was good from 1.7664-5.5200 μg(r=0.9995,n=5). The average recovery was 98.22%(n=6). A linear relationship of Peiminine was good from 1.2800-4.0000 μg(r=0.9998,n=5). The average recovery was 93.45%(n=6). Conclusion: The method can be used for the quality control of Xiaohe tablets.

Key words: Xiaohe tablets; study on quality control; microscopical identification; TLC; HPLC; peimine; peiminine; content determination.

消核片由浙贝母、丹参、金果榄等十四味药组成,主要工艺为浙贝母、金果榄粉碎成细粉,其余十二味加水煎煮浓缩,加入浙贝母、金果榄细粉及糊精适量,制粒等步骤制成。临床上具有软坚散结,行气活血,化痰通络的功效。多用于治疗女性乳腺增生症,尤其适用于中青年妇女的乳痛症,乳腺小叶增生症。其现行标准为国家药品标准 WS_{3-B-3089-98-2003^[1],检验项目有性状、浙贝母及金果榄}

鉴别、丹参中丹参素钠的含量测定。该品种为2009年国家评价性抽验品种,因标准中测定指标单一,难以反映该制剂的整体质量。本文采用显微鉴别法鉴别浙贝母和金果榄,采用薄层色谱法对制剂中的夏枯草、半枝莲进行定性鉴别,同时采用高效液相色谱法对浙贝母中贝母素甲和贝母素乙进行了含量测定^[2]。本方法可作为该制剂的质量控制方法。

第一作者 Tel: 13840079285 (024) 25425645; E-mail: mengshuzhi@yahoo.com.cn

1 仪器与试剂

1.1 仪器 OLYMPUS 显微成像系统; Waters 高效液相色谱仪 蒸发光散射检测器。

1.2 试剂 对照品野黄芩苷 (110842 - 200403)、贝母素甲 (110750 - 200608)、贝母素乙 (110751 - 200504)、夏枯草 (120993 - 200604) 由中国药品生物制品检定所提供。水为重蒸水; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其它试剂为分析纯。

本次实验共收集了 33 批消核片 (生产企业: 四川光大制药有限公司)。

2 定性鉴别

2.1 显微鉴别 淀粉粒甚多, 单粒卵形、广卵形或椭圆形, 脐点多在小端, 直径 6 ~ 56 μm, 层纹较明显; 螺旋导管, 直径至 18 μm (浙贝母)^[3]。网纹导管, 壁木化或微木化; 石细胞较大, 单个或数个成群, 呈类圆形、椭圆形, 壁厚, 淡黄色, 包腔内含有方晶; 木栓细胞呈类方形、多角形, 淡黄色 (金果榄)。见图 1。

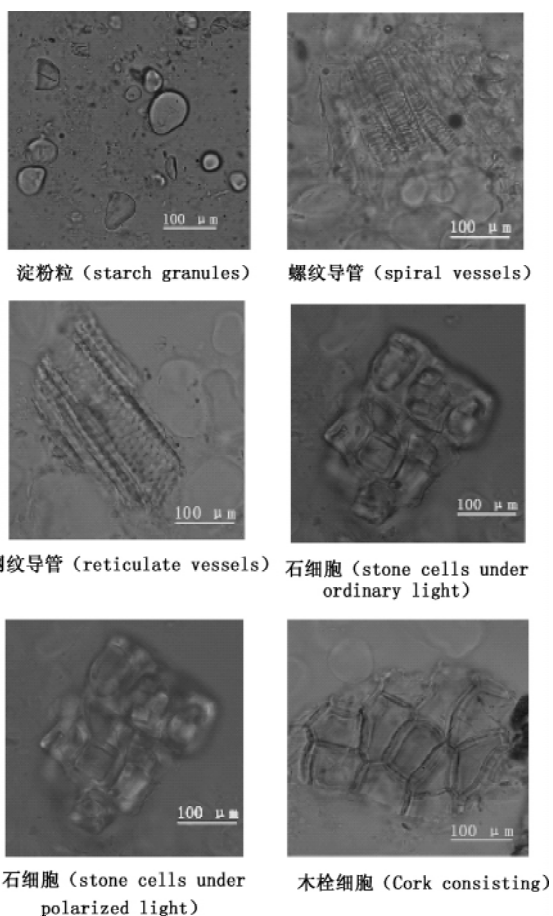


图 1 消核片显微特征图

Fig 1 Microscopical identification in Xiaohe Tablets

2.2 薄层色谱法鉴别

2.2.1 夏枯草

2.2.1.1 供试品溶液和阴性样品溶液的制备 取本品, 研细, 取粉末 2.5 g, 加乙酸乙酯 30 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 弃去乙酸乙酯液, 残渣挥去乙酸乙酯, 加甲醇 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液浓缩至 0.5 mL, 作为供试品溶液。同法制成阴性样品溶液。

2.2.1.2 对照药材溶液的制备 取夏枯草对照药材 1 g, 加水 100 mL, 煎煮 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 加甲醇 20 mL, 同法制成对照药材溶液。

2.2.1.3 薄层色谱分析 吸取上述 3 种溶液各 2 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯 - 三氯甲烷 - 乙酸乙酯 - 甲醇 - 甲酸 (2:3:4:0.5:2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰, 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, 阴性样品在相应的位置上无干扰。结果见图 2。

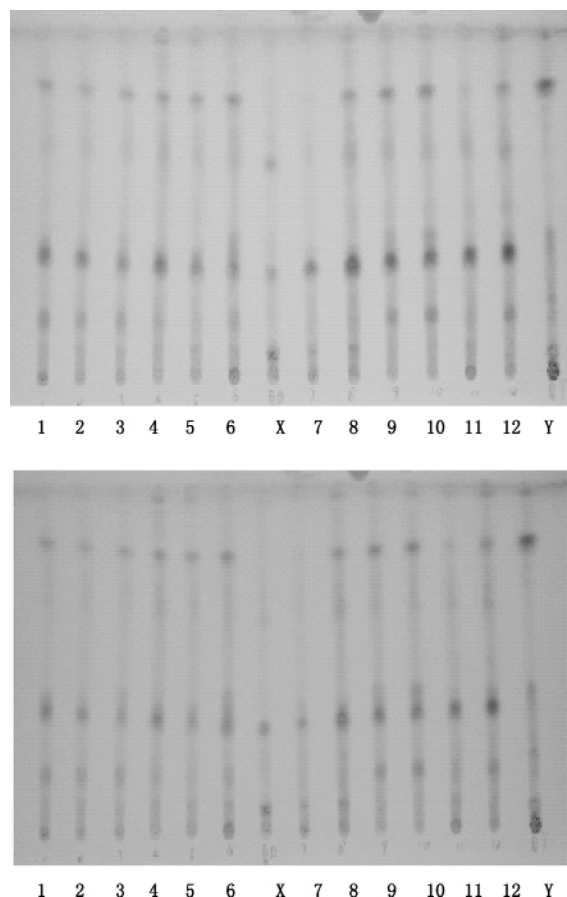


图 2 消核片中夏枯草 TLC 图

Fig 2 TLC chromatograms of prunella vulgaris in Xiaohe Tablets

X. 夏枯草 (prunella vulgaris) 1 ~ 12. 样品 (samples) Y. 阴性样品 (negative samples)

2.2.2 半枝莲

2.2.2.1 供试品溶液和阴性样品溶液的制备 取本品 2.5 g, 加甲醇 50 mL, 超声处理 20 min, 滤过,

蒸干 残渣加水 30 mL 使溶解 滤液用醋酸乙酯提取 2 次 每次 20 mL 弃去醋酸乙酯液 水层用盐酸调节 pH 至 1~2 用醋酸乙酯提取 2 次 每次 20 mL 合并醋酸乙酯液 蒸干 残渣加甲醇 0.5 mL 使溶解 作为供试品溶液。同法制成阴性样品溶液。

2.2.2.2 对照品溶液的制备 取野黄芩苷对照品 加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液 作为对照品溶液。

2.2.2.3 薄层色谱分析 吸取上述 3 种溶液各 2 μL 分别点于同一以含 4% 醋酸钠的硅胶 G 薄层板上 以醋酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1)为展开剂 展开 取出 晾干 喷 10% 硫酸乙醇溶液 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中 在与对照品色谱相应的位置上 显相同的荧光斑点 阴性样品在相应的位置上无干扰。见图 3。

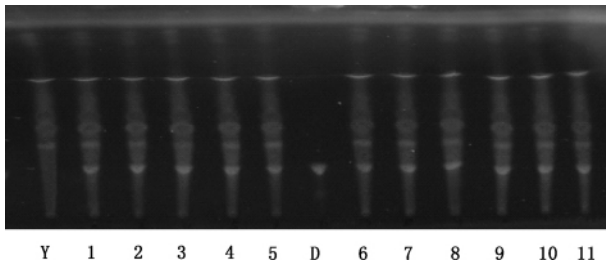


图 3 消核片中半枝莲 TLC 图
Fig 3 TLC chromatogram of *Scutellaria barbata* in Xiaohe Tablets
D. 野黄芩苷(scutellarin) 1~12. 样品(samples) Y. 阴性样品(negative samples)

3 浙贝母含量测定

3.1 溶液制备

3.1.1 对照品溶液 精密称取贝母素甲对照品、贝母素乙对照品适量 加甲醇制成每 1 mL 含贝母素甲 0.2 mg、贝母素乙 0.15 mg 的混合溶液 即得。

3.1.2 供试品溶液 取本品 20 片 除去包衣 精密称定 研细 取粉末约 5 g 精密称定 置具塞锥形瓶中 加浓氨试液 4 mL 浸润 1 h 精密加入三氯甲烷-甲醇(4:1)的混合溶液 50 mL 称定重量 混匀 置 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流 2 h 放冷 再称定重量 加上述混合溶液补足减失的重量 滤过。精密量取续滤液 25 mL 置蒸发皿中蒸干 残渣加甲醇 2 mL 使溶解 置中性氧化铝柱(100~200 目 5 g 内径 1.5 cm)上 以三氯甲烷-甲醇(4:1)的混合溶液 50 mL 洗脱 收集洗脱液 蒸干 残渣加甲醇使溶解 并转移至 2 mL 量瓶中 加甲醇至刻度 摇匀 即得。同法制成阴性样品溶液。

3.2 色谱条件与系统适用性试验 采用 Diamonsil

C_{18} 色谱柱(200 mm \times 4.6 mm 5 μm) 流动相为乙腈-水-二乙胺(70:30:0.03) 流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$ 蒸发光散射检测器 漂移管温度 100 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流速 2.8 L \cdot min $^{-1}$ 对照品溶液进样 10 μL 、20 μL 供试品溶液进样 10~20 μL 理论板数按贝母素甲峰计算应不低于 2000 在上述色谱条件下色谱图见图 4。

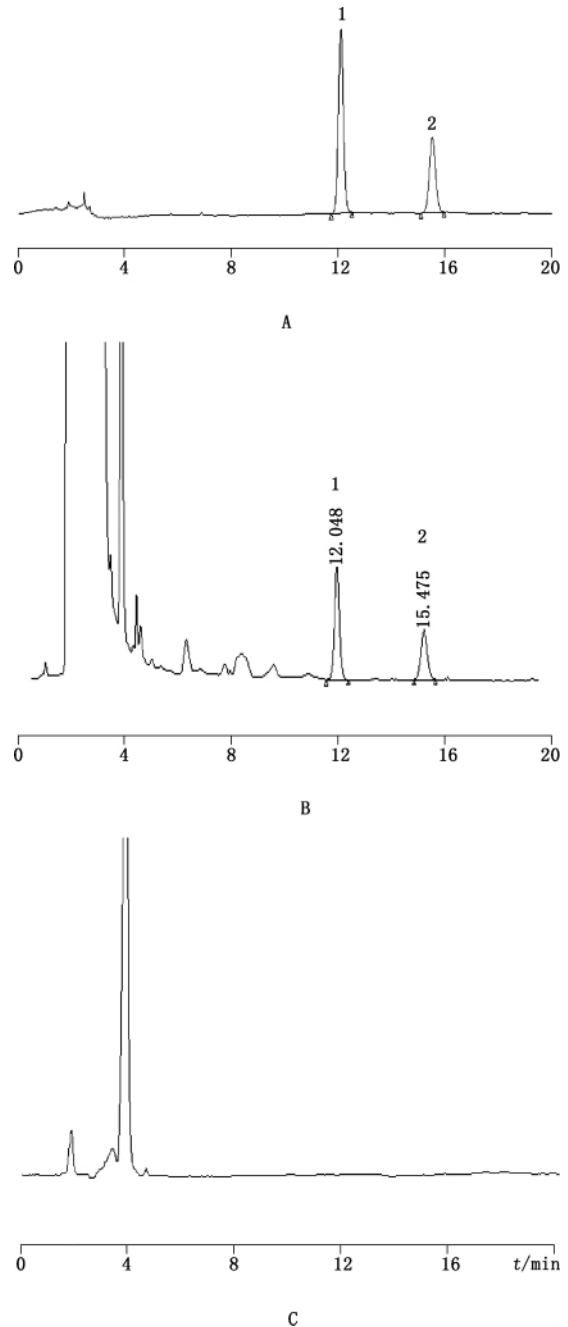


图 4 对照品(A)、样品(B)、阴性样品(C)的 HPLC 图
Fig 4 HPLC chromatograms of reference substance(A), sample(B) and negative sample(C)
1. 贝母素甲(peimine) 2. 贝母素乙(peiminine)

3.3 线性关系考察 按上述色谱条件,分别精密吸取“3.1.1”项下对照品混合溶液 8,10,15,20,25 μL 注入液相色谱仪中,测定峰面积。以对照品进样量 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,得贝母素甲和贝母素乙回归方程分别为:

$$Y = 1.4038X + 4.7341 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 1.2958X + 4.6902 \quad r = 0.9998$$

结果表明,贝母素甲进样量在 1.7664 ~ 5.5200 μg 范围内、贝母素乙进样量在 1.2800 ~ 4.0000 μg 范围内线性关系良好。

3.4 精密度的试验 精密量取按“3.1.2”项下方法制备的 1 号样品溶液 15 μL,按“3.2”项下的色谱条件连续进样 6 次,测定贝母素甲、贝母素乙峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.45% 和 0.3%。

3.5 稳定性试验 取 1 号样品的供试品溶液 15 μL,按“3.2”项下的色谱条件分别于 0,2,7,11,17,23 h 进样测定。结果贝母素甲、贝母素乙峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.48% 和 0.4%。

3.6 重复性试验 取 1 号样品 6 份,按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.2”项下的色谱条件进行测定含量。结果贝母素甲、贝母素乙含量平均值 ($n=6$) 分别为 0.1676 mg · g⁻¹ 和 0.1224 mg · g⁻¹,RSD 分别为 1.8% 和 3.0%。

3.7 加样回收试验 取已知含量的 1 号样品 6 份,每份约 2.5 g,精密称定,分别精密加入对照品混合溶液 ($C_{\text{贝母素甲}} = 0.2208 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $C_{\text{贝母素乙}} = 0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2 mL,精密加入盐酸-70%乙醇(1:100)溶液 20 mL,按供试品溶液制备方法处理得供试液,按“3.2”项下的色谱条件测定,计算回收率。结果贝母素甲、贝母素乙回收率分别 98.22% (RSD = 2.8%) 和 93.45% (RSD = 3.0%)。

3.8 样品测定 取 33 批样品,按“3.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.2”项下的色谱条件进行测定(每个样品取样 2 份,每份溶液进样 2 次),测定贝母素甲、贝母素乙总量。结果见表 1。

4 讨论

4.1 处方中浙贝母、金果榄为原粉入药,其余 12 味药提取浓缩。采用显微鉴别法可以快速鉴别成药中浙贝母和金果榄,金果榄石细胞包腔内含有方晶,为进一步确证该显微特征,分别用 OLYMPUS 显微成像系统在常光和偏光下成像。

4.2 夏枯草、半枝莲为方中臣药和佐药,在处方中占比例分别为 17.3% 和 8.6%,均有必要制定其薄层鉴别方法^[3]。

表 1 33 批消核片中贝母素甲、贝母素乙总量测定结果(mg · g⁻¹)

Tab 1 Total determination result of peimine and peiminine in 33 samples

总量 (mg · g ⁻¹) (total content)	批次(批) (batch)	百分率 (percent) /%
0.1235 以下	0	—
0.1236 ~ 0.1500	3	9
0.1501 ~ 0.1800	6	16
0.1801 ~ 0.2100	8	24
0.2101 ~ 0.2400	5	15
0.2401 ~ 0.2700	4	12
0.2701 ~ 0.3000	2	6
0.3001 ~ 0.3300	2	6
0.3301 ~ 0.3600	2	6
0.3601 以上	1	3

4.3 半枝莲 TLC 鉴别 曾采用先除去溶解于三氯甲烷的杂质,再加甲醇提取,蒸干,残渣加水后,用水饱和和正丁醇提取,样品干扰大。采用本文所用方法,结果样品干扰少,斑点清晰。甲醇提取后,可先以乙酸乙酯除去一部分易溶于乙酸乙酯的杂质,经盐酸调节成酸性后再以乙酸乙酯提取酸液中的野黄芩苷^[4]。

4.4 浙贝母为方中君药,其有效成分贝母素甲和贝母素乙的总量有明确的指标^[2]。现行标准^[1]采用薄层色谱法,仅以贝母素甲对照品为对照,鉴别处方中的浙贝母,本文设计测定贝母素甲和贝母素乙的总量,以控制生产过程和产品质量。

4.5 依据浙贝母中母素甲和贝母素乙的总量限度^[2]及消核片处方^[1],含量限度定为:本品每 1 g 含浙贝母以贝母素甲($C_{27}H_{45}NO_3$)和贝母素乙($C_{27}H_{43}NO_3$)的总量计,不得少于 0.1235 mg (以浙贝母原粉收率 80% 折算)。含量测定项贝母素乙的平均回收率为 93.45%,是由于供试品溶液制备过程中上中性氧化铝柱,成分会有所损失。

参考文献

- National Drug Standards(国家药品标准) WS₃-B-3089-98-2003
- MA Shuang-cheng(马双成),ZHANG Shu-pan(张树潘),LU Jing(鲁静). HPLC-ELSD determination of peimine and peiminine in Hechan tablets (HPLC-蒸发光散射检测法测定鹤蟾片中贝母素甲和贝母素乙的含量),Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28(1):118
- ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部):205;197;77
- Traditional Chinese medicine identify subject(中药鉴定学). Shanghai(上海): Shanghai Scientificand Technology Publishers. (上海科学技术出版社) 2003

(本文于 2010 年 2 月 25 日收到)