

茵陈注射液的质量标准研究

曲毅^{1,2}, 刘太华¹, 王伽伯¹, 金城¹, 何永志², 肖小河^{*}

(1. 中国人民解放军第302医院 全军中药研究所, 北京 100039; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 对茵陈注射液的质量标准进行研究。方法 采用薄层色谱法定性萹属香豆素, 展开剂为石油醚(60~90)-醋酸乙酯-丙酮(6:3:0.5), 检测波长为365 nm。采用高效液相色谱法定量萹属香豆素, 色谱柱: μ -Bondapak C₁₈柱(300 mm × 3.9 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水(40:60); 检测波长: 344 nm; 柱温: 室温。采用紫外分光光度法定量总黄酮, 检测波长为518 nm。采用酸碱滴定法定量总有机酸。结果 薄层色谱鉴别中, 在供试品与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。HPLC法测定萹属香豆素的量分别为0.178、0.173、0.180 mg/mL; 紫外分光光度法测定总黄酮的量分别为0.633、0.634、0.653 mg/mL; 酸碱滴定法定量总有机酸的量分别为0.146、0.147、0.142 mg/mL。建立各指标的检测下限, 其中萹属香豆素的量不得低于0.17 mg/mL, 总黄酮的量不得低于0.63 mg/mL, 总有机酸的量不得低于0.14 mg/mL。结论 所建立的质量标准可以作为茵陈注射液的内在质量控制标准。

关键词: 茵陈注射液; 质量控制; 薄层色谱; HPLC; 酸碱滴定; 分光光度法

中图分类号: R286.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)03-0383-03

茵陈蒿汤源自张仲景《伤寒论》, 主要是由茵陈、栀子、大黄3味中药组成, 该方及其加减方具有清热、除湿、利胆、退黄的功效, 在临床上用于治疗病毒性肝炎、胆石症、胆囊炎、高血脂症及恶性肿瘤等。在茵陈蒿汤的基础上开发研制而成的复方茵陈蒿注射液、茵栀黄注射液对于治疗急性黄疸型、病毒性肝炎等急危重肝病发挥了重要作用。但据目前文献分析和实验研究表明: 方中大黄有一定的遗传毒性风险^[1], 全方研发成注射剂的安全性难以保证; 栀子苷口服利胆作用好, 但注射给药效果较差; 全方药味偏多, 制备工艺复杂, 制剂稳定性和安全性难以保证, 不适合开发成现代中药注射剂等。笔者初步研究发现, 无论口服还是注射给药, 单味茵陈利胆退黄效果显著, 可与茵陈蒿汤疗效相媲美。因此, 从利胆退黄的角度考虑, 可以将茵陈蒿汤3味药精简优化为单味茵陈, 提取精制茵陈的主要有效部位, 从而开发成单味茵陈注射液^[2]。该注射液含有多种利胆成分, 包括萹属香豆素、总黄酮和总有机酸等, 可明显增加胆酸、胆固醇等脂类成分的分泌量, 使胆汁流量增加^[3,4]。本实验对茵陈注射液质量标准进行了研究。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(包括484型检测器、U6k型进样阀); HP8452A型紫外分光光度计; 试剂均为分析纯; 甲醇(色谱纯, 美国Fisher公司); 萹属

香豆素(自制, 经UV、R、MS、¹H-NMR确定其结构, 采用高效液相分离, 面积归一化法计算萹属香豆素的质量分数为99.9%, 可做定量之用); 芦丁(批号0080-9705)、绿原酸(批号0753-200111)对照品均购自中国药品生物制品检定所; 茵陈注射液规格为(10 mL, 解放军第302医院全军中药研究所制备)。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别: 吸取茵陈注射液1 mL, 挥干, 加甲醇10 mL, 作为供试品溶液。另取萹属香豆素对照品, 加甲醇制成0.05 mg/mL溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法^[5]试验, 吸取上述两种溶液各2 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上, 以石油醚(60~90)-醋酸乙酯-丙酮(6:3:0.5)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, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 见图1。

2.2 茵陈注射液中萹属香豆素的测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱: μ -Bondapak C₁₈柱(300 mm × 3.9 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水(40:60); 检测波长: 344 nm; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 室温。色谱图见图2。理论塔板数按萹属香豆素峰计算, 应不低于2 000。

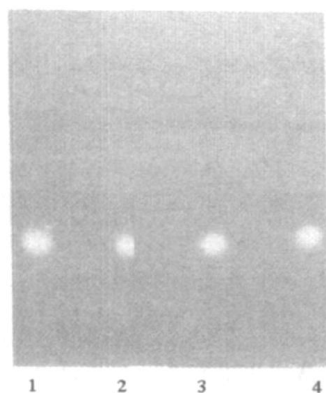
2.2.2 对照品溶液的制备: 精密称取萹属香豆素对照品13.6 mg, 置100 mL量瓶中, 加甲醇50 mL超

* 收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 全军“十五”杰出人才基金项目(01J019); 军队“九五”科技基金项目(98M125)

作者简介: 曲毅(1981—), 男, 辽宁省丹东市人, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型的研究。E-mail: yiforever2000@hotmail.com

* 通讯作者 肖小河 Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy302@126.com



1-蒿属香豆素对照品 2~4-茵陈注射液

1-scoparone reference substance 2-4-Yincheng Injection

图1 茵陈注射液的TLC鉴别

Fig. 1 TLC Identification of Yincheng Injection

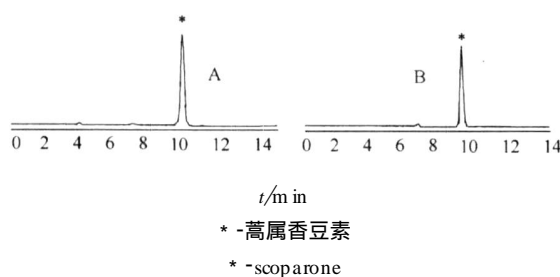


图2 蒿属香豆素对照品(A)和茵陈注射液(B)的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of scoparone reference substance (A) and Yincheng Injection (B)

声溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密量取5 mL,转移至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(含蒿属香豆素0.068 mg/mL)。

2.2.3 供试品溶液的制备:精密吸取注射液2 mL,置100 mL量瓶中,加甲醇稀释到刻度,摇匀,0.45 μm滤膜滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察:精密吸取68 μg/mL蒿属香豆素对照品溶液1、2、6、10、14、16 μL,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y = 4.557041.8X - 3.569.855.5$, $r = 0.999.9$,结果表明,蒿属香豆素在0.068~1.088 μg具有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验:精密吸取68 μg/mL蒿属香豆素对照品溶液10 μL,依上述色谱条件,重复进样6次,测定峰面积,结果其RSD为0.51%。

2.2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于配制后0、2、4、8、24 h进样10 μL,记录峰面积,结果蒿属香豆素峰面积的RSD为0.60%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.7 重现性试验:同一注射液按供试品溶液制备方法平行制备6份,测定蒿属香豆素峰面积,计算蒿属香豆素质量浓度,结果蒿属香豆素质量浓度的RSD为2.01%。

2.2.8 回收率试验:采用加样回收法。精密称取蒿属香豆素对照品54 mg,置于100 mL量瓶中,加甲醇超声溶解,放冷后,加甲醇稀释至刻度,摇匀。取同一供试品溶液5份,分别精密加入蒿属香豆素对照品溶液10 mL,制成加样回收率供试液,按上述色谱条件测定,计算回收率。结果蒿属香豆素平均加样回收率为99.48%,RSD为1.84%。

2.2.9 样品测定:分别取3批不同批号的茵陈注射液(批号:021017、021027、021121),按上述方法制备供试品溶液,直接进样10 μL测定蒿属香豆素峰面积,每批样品测定3份,以3次测定结果的平均值作为测定值,计算蒿属香豆素质量浓度,结果蒿属香豆素质量浓度分别为0.178、0.173、0.180 mg/mL。

2.3 茵陈注射液中总黄酮的测定

2.3.1 对照品溶液的制备:精密称取在120℃减压干燥至恒重得芦丁对照品22.2 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇70 mL,置水浴上微热使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(含芦丁0.222 mg/mL)。

2.3.2 供试品溶液的制备:精密吸取注射液2 mL,置100 mL量瓶中,加甲醇稀释到刻度,摇匀,即得。

2.3.3 线性关系考察:精密量取0.222 mg/mL芦丁对照品溶液0.1、2、4、8、10 mL,分别置25 mL量瓶中,各加水至6 mL,加5%亚硝酸钠溶液1 mL,使混匀,放置6 min,加10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min,加氢氧化钠试液10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置15 min,参照分光光度法在518 nm波长处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。计算回归方程为 $Y = 0.012.878.8 + 0.440.846 X$, $r = 0.999.6$,结果表明,芦丁在0.222~1.332 mg/mL具有良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验:精密吸取0.222 mg/mL芦丁对照品溶液3 mL,按上述的测定方法,重复操作5次,计算,结果吸光度RSD为0.73%。

2.3.5 稳定性试验:取同一供试品溶液5 mL,按上述的比色方法操作,比色后分别于10、20、30、40、50 min测定吸光度,结果吸光度的RSD为0.28%,表明供试品溶液在50 min内稳定。

2.3.6 重现性试验:取同一供试品溶液5 mL,测定吸光度,结果总黄酮质量浓度的RSD为0.86%。

2.3.7 回收率试验:采用加样回收法。精密称取芦丁

对照品 16.4 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇 50 mL 超声溶解, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得芦丁对照品溶液。取同一供试品溶液 5 份, 分别精密吸取 5 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 再加入对照品溶液 5 mL, 制成加样回收率供试液。按上述的测定方法操作, 测定吸光度, 计算回收率。结果总黄酮质量浓度的平均加样回收率为 99.71%, RSD 为 0.70% ($n=5$)。

2.3.8 样品测定: 分别取 3 批不同批号的茵陈注射液(批号 021017、021027、021121), 制备成供试品溶液, 吸取 5 mL, 测定吸光度。每批样品测定 3 份, 以 3 次测定结果的平均值作为测定值。结果总黄酮质量浓度分别为 0.633、0.634、0.653 mg/mL ($n=3$)。

2.4 注射液中总有机酸的测定

2.4.1 氢氧化钠滴定液的配制: 取氢氧化钠适量, 加水振摇使溶解成饱和溶液, 冷却后, 置聚乙烯塑料瓶中, 静置数日, 澄清后备用。取澄清的氢氧化钠饱和溶液 5.6 mL, 加新沸过的冷水使成 1000 mL, 即得 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液。

2.4.2 氢氧化钠滴定液的标定: 精密称取在 105 干燥至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.1028 g, 加新沸过的冷水 50 mL, 振摇, 使其尽量溶解, 加酚酞指示液 2 滴, 用本液滴定, 滴定至溶液显粉红色。每 1 mL 氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 20.42 mg 邻苯二甲酸氢钾。消耗氢氧化钠滴定液体积 4.44 mL, 计算得氢氧化钠滴定液的浓度为 0.113 mol/L。

2.4.3 供试品溶液的制备: 精密吸取茵陈注射液 2 mL, 挥干, 加水溶解, 上预处理好的 D-101 大孔树脂柱, 收集过柱液、水洗液 50 mL, 即得到供试品溶液。

2.4.4 样品测定: 在供试品溶液中, 加入酚酞指示液 2 滴, 用标定好的氢氧化钠滴定液(0.113 mol/L)滴定, 滴定至溶液显粉红色。每 1 mL 氢氧化钠滴定液(0.113 mol/L)相当于 40.04 mg 绿原酸, 总有机酸以绿原酸计, 结果总有机酸质量浓度分别为 0.146、0.147、0.142 mg/mL。

3 讨论

本实验建立了茵陈注射液内在质量控制方法, 以高效液相色谱法测定萹蒿属香豆素的量, 紫外分光光度法测定总黄酮的量, 酸碱滴定法测定总有机酸的量, 质量标准符合《中药新药制备工艺研究的要求》, 为茵陈注射液的内在质量控制提供了方法。

参考文献

- [1] Mueller S O, Schmitt M, Dekant W, et al. Occurrence of emodin, chrysophanol, and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(5): 481.
- [2] 刘太华. 茵陈蒿汤抗肝炎药效物质及其注射剂的研制 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2003.
- [3] 张启伟. 滨蒿中利胆成分的含量测定 [J]. *药学学报*, 1986, 21(12): 922-927.
- [4] 曾美怡. 茵陈的化学成分和质量评价研究 [J]. *国外医学: 中医中药分册*, 1987, 9(6): 1-7.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2005.

欢迎订阅《中草藥》杂志 1997- 2007 年增刊

为了扩大学术交流, 提高新药研究水平, 经国家科技部同意, 我部从 1996 年起, 每年出版增刊一册。

1997 年第 28 卷增刊 包括紫杉醇的化学成分、提取工艺及组织培养等方面的科研论文, 并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家撰写综述文章, 充分反映了紫杉醇研究方面的新成果、新进展和新动态。共收载论文 92 篇。

1998 年第 29 卷增刊 以当今国际研究的热点银杏叶为专论重点, 包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面, 充分反映了国内银杏叶开发研究方面的新成果、新进展和新动态。共收载论文 80 篇。

1999 年第 30 卷增刊 为“庆祝《中草藥》杂志创刊 30 周年”会议论文集, 特邀中国工程院院士、国家药品监督管理局药品评审中心及知名专家就中药新药研究热点问题撰写了综述文章。共收载论文 160 篇。

2000 年第 31 卷增刊 以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容, 共收载论文 112 篇。

2001 年第 32 卷增刊 特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程, 我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。共收载论文 140 多篇。

2002 年第 33 卷增刊 以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容, 收载论文 107 篇。

2003 年第 34 卷增刊 包括中药创新药物开发的思路和方法; 中药现代化研究; 有关中药知识产权保护和中药专利的申请等内容, 共收载论文 176 篇。

2004 年第 35 卷增刊 以“新技术在中药现代化中的应用”为主要内容, 共收载论文 120 篇。

2005 年第 36 卷增刊 以中药现代化和中药走向国际等热点为主要内容, 共收载论文 150 余篇。

2006 年第 37 卷增刊 以药理会议专栏及中药现代化和国际化, 包括药材资源种植和可持续利用、提取工艺技术、质量控制、疗效评价、中药理论和中药产业管理现代化等方面内容, 共收载论文 135 篇, 摘要 88 篇。

2007 年第 38 卷增刊 以推动中药行业实现自主创新, 促进中药新药研发理论为主题, 共载文 170 篇。

以上各卷增刊选题广泛, 内容新颖, 学术水平高, 科学性强, 欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行, 邮局订阅《中草藥》不含增刊, 但能提供订阅凭证者, 购买增刊 7 折优惠, 款到寄刊。

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编: 300193 网 址: www.tjpr.com

电话: (022) 27474913 23006821 传真: (022) 23006821 E-mail: zcyzzbjb@sina.com