

疏肝脂片质量标准研究

李燕¹, 晁愚², 吴威巍², 杨方¹, 庄昌龙¹, 吴彤^{1*}

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200040; 2. 上海方心健康科技发展有限公司, 上海 200032)

摘要:目的 建立疏肝脂片的质量标准。方法 采用 TLC 法鉴别方中柴胡和三七,并用 HPLC 法鉴别方中白术;采用 HPLC 法测定枳实中柚皮苷。结果 在 TLC 色谱中可检出柴胡、三七的特征斑点, HPLC 图谱中可检出白术的特征色谱峰;柚皮苷在 0.067 4~6.74 μg 范围内呈线性关系 $r=0.999$ ($n=5$), 平均加样回收率为 98.6%, RSD 为 2.2%。结论 所建方法专属性强,重现性好,能有效控制该制剂的质量。

关键词:疏肝脂片;质量标准;TLC;HPLC;柚皮苷

中图分类号:R927.2

文献标志码:B

文章编号:1001-1528(2011)10-1819-03

疏肝脂片源于临床经验方舒肝祛脂胶囊,由柴胡、三七、枳实、白术等九味中药组成,具有疏肝消脂、清热化积、行气活血的功效,用于治疗非酒精性单纯性脂肪肝。为有效控制该制剂的质量,本实验按照中药六类新药的注册要求对该制剂进行质量研究。柚皮苷为枳实中的主要有效成分,具有降血脂、抗动脉粥样硬化的生物学活性,能降低胆固醇、减少血栓的形成^[1-3],并且在该制剂中含有量较高,因此采用高效液相色谱法测定其质量分数,同时对柴胡、三七、白术进行定性鉴别。实验方法简单可靠,为该制剂质量标准的制定提供了依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HP1100 高效液相色谱仪(G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1316A 柱温箱, G1314AVWD 检测器, 美国 HP 公司); KQ2200 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); HHS 电热恒温水浴锅(上海医疗器械二厂); BP211D 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 疏肝脂片(批号 080625-1, 080625-2, 080625-3, 上海医药工业研究院自制); 柚皮苷对照品(批号 110722-200610, 供定量测定用); 人参皂苷 Rg_1 (批号 110703-200424, 供定量测定用); 柴胡对照药材(批号 120992-200504); 白术对照药材(批号 120925-200407), 上述对照品及对照药材均购自中国药品生物制品检定所; 柴胡皂苷 C 对照品(批号 080314, 上海医药工业研究院自制, 纯度 > 98%); 乙腈为色谱纯, 水为双蒸水, 其它试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 柴胡 取本品 10 片, 研细, 过 75 目筛, 称取粉末 0.35 g, 加甲醇 10 mL, 超声提取 10 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL, 超声使成悬浊液, 转移至分液漏斗中, 以水饱和的正丁醇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取柴胡对照药材

0.1 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 10 min, 滤过, 滤液浓缩至约 1 mL, 作为对照药材溶液; 取柴胡皂苷 C 对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取缺柴胡的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法(2010 版中国药典一部附录 VI B) 试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-乙醇-水(10:2:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无斑点。结果见图 1。

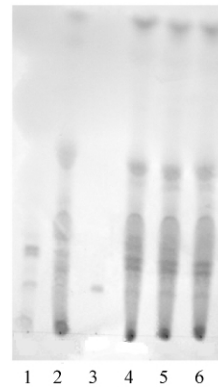


图 1 疏肝脂片中柴胡薄层色谱图

1. 柴胡对照药材 2. 阴性对照 3. 柴胡皂苷 C 4~6. 样品

2.2 三七 取本品 10 片, 研细, 过 75 目筛, 称取粉末 0.35 g, 加甲醇 10 mL, 超声提取 10 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL, 超声使成悬浊液, 转移至分液漏斗中, 以水饱和的正丁醇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取人参皂苷 Rg_1 对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取缺三七的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴

收稿日期: 2011-01-06

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项基金项目(2009ZX09301-007)

作者简介: 李燕(1977—)女, 助理研究员, 硕士, 从事中药新药研发。Tel: (021) 62479808-726, E-mail: yanceylee@yahoo.cn

* 通信作者: 吴彤(1967—)男, 研究员, 从事中药新药研发及药效物质基础研究。E-mail: tongwu88@163.com

性对照品溶液。照薄层色谱法(2010版中国药典一部附录VI B)试验,吸取上述3种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2) 10 $^{\circ}$ C以下放置的下层溶液为展开剂,展开,晾干,喷以10%硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无斑点。结果见图2。

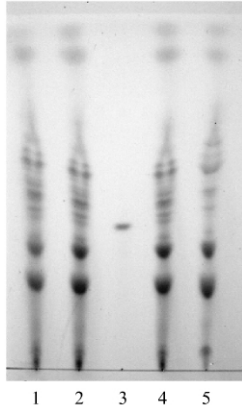


图2 疏肝脂片中三七的薄层色谱图
1、2、4. 样品 3. 人参皂苷 R_{g1} 5. 阴性对照

2.3 白术 取本品10片,研细,过75目筛,称取粉末1g,加甲醇10mL,超声提取20min,滤过,滤液蒸干,残渣加水10mL,超声使成悬浊液,转移至分液漏斗中,以三氯甲烷提取2次,每次20mL,合并三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加0.5mL甲醇溶解,作为供试品溶液。另取白术对照药材0.1g,加甲醇10mL,80 $^{\circ}$ C水浴回流1h,滤过,滤液蒸干,残渣加1mL甲醇溶解,作为对照药材溶液。再取缺白术的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照高效液相色谱法(2010版中国药典一部附录VI D)试验,以十八烷基键合硅胶为填充剂;乙腈-水(45:55)为流动相;检测波长为210nm,体积流量1mL/min,柱温25 $^{\circ}$ C。吸取上述3种溶液各20 μ L,注入液相色谱仪,测定,供试品色谱中,应呈现与对照品色谱峰保留时间相同的色谱峰,阴性对照无该色谱峰。结果见图3。

3 定量测定

3.1 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283nm^[4-7],体积流量1mL/min,柱温25 $^{\circ}$ C。理论板数按柚皮苷峰计算应不低于5000。结果见图4。

3.2 供试品溶液的制备 取本品10片,研细,过75目筛,取粉末约35mg,精密称定,置于10mL量瓶中,加50%甲醇约9mL,超声提取20min,放冷至室温,再加50%甲醇至刻度,滤过,取续滤液,即得。

3.2 供试品溶液的制备 取本品10片,研细,过75目筛,取粉末约35mg,精密称定,置于10mL量瓶中,加50%甲醇约9mL,超声提取20min,放冷至室温,再加50%甲醇至刻度,滤过,取续滤液,即得。

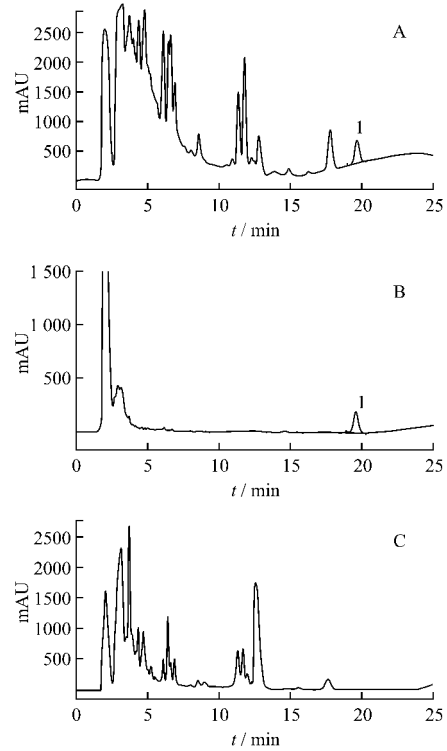


图3 白术定性鉴别的HPLC图谱
A. 供试品溶液 B. 白术药材对照品溶液 C. 阴性对照溶液
1. 白术特征峰

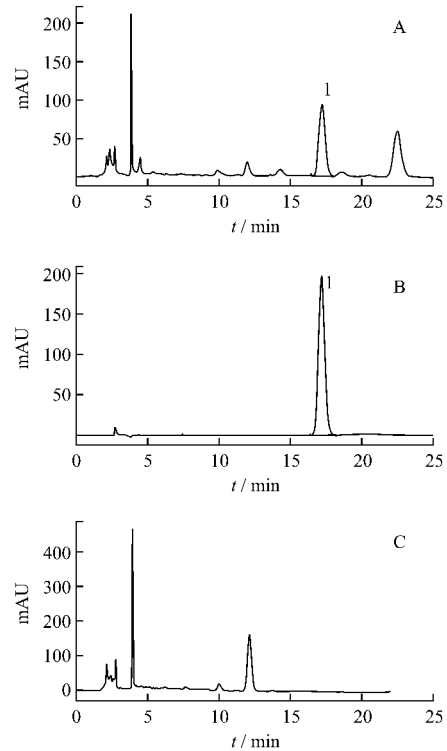


图4 柚皮苷定量测定的HPLC图谱
A. 供试品溶液 B. 柚皮苷对照品溶液 C. 阴性对照溶液 1. 柚皮苷

3.5 标准曲线的制备 精密吸取柚皮苷对照品溶液(0.337mg/mL)适量,以50%甲醇分别稀释至0.168、0.084 2、

0.042 1、0.003 37 mg/mL,分别精密吸取上述溶液 20 μ L 注入液相色谱仪测定,以质量浓度对峰面积进行回归,得回归方程为 $Y=3.72 \times 10^4 X-43.6$ $r=0.999$ ($n=5$),表明柚皮苷进样量在 0.067 4 μ g ~ 6.74 μ g 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

3.6 精密度试验 精密吸取质量浓度为 0.084 2 mg/mL 的柚皮苷对照品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,重复进样 6 次,测定柚皮苷峰面积的 RSD 为 0.22% ($n=6$) 表明仪器精密度良好。

3.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,分别在 0、2、4、8 h 进样 20 μ L 测定柚皮苷面积 RSD 为 2.2%,表明供试品溶液中柚皮苷在 8 h 内稳定。

3.8 重复性试验 取同一批号的样品 6 份,制备供试品溶液并测定柚皮苷的 RSD 为 0.96%,表明该试验方法的重复性较好。

3.9 加样回收率试验 取同一批号的样品 6 份,分别加入一定量的柚皮苷对照品,制备供试品溶液,精密吸取 20 μ L 注入液相色谱仪,测定柚皮苷,计算加样回收率,柚皮苷回收率平均值为 98.6%,RSD 为 2.2%,说明该测定方法回收率较好,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

取样量	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收	RSD
/mg	/mg	/mg	/mg	%	率/%	%
17.55	0.507	0.408	0.908	98.3		
17.88	0.517	0.408	0.915	97.5		
17.67	0.511	0.506	1.027	102.0	98.6	2.2
17.85	0.516	0.506	1.012	98.0		
17.46	0.505	0.612	1.092	95.9		
17.48	0.505	0.612	1.117	100.0		

3.10 样品的测定 取 3 批片剂(批号 080625-1,080625-2,080625-3;平均片质量分别为 370.81 mg,370.67 mg,370.33 mg),每批取 2 个样品,制备供试品溶液,测定柚皮苷量,3 批样品中柚皮苷量分别为 8.64 mg/片、8.60 mg/片、9.18 mg/片。

4 讨论

4.1 柴胡的鉴别方法参考 2010 版中国药典^[8] 263,考察不同比例的展开剂,包括乙酸乙酯-乙醇-水(8:2:1),乙酸乙酯-乙醇-水(8:2:1)展开两次,乙酸乙酯-乙醇-水(10:2:1)等。实验结果证明,后两种展开方法均有较好的展开效果,但是乙酸乙酯-乙醇-水(8:2:1)需要展开两次,所用时间较长,因此,选择乙酸乙酯-乙醇-水(10:2:1)。

4.2 三七的鉴别方法使用了多种展开剂,包括正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5)、三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)下层溶液^[9]、三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液、三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)下层溶液^[8,11]等。实验结果证明,3 种展开剂均有较好的分离效果,但是由于正丁醇-乙酸乙酯-水系统背景颜色较深,三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水系统不稳定,因此选择三氯甲烷-甲醇-水系统,其中三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液展开效果更好,故最终选择三氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)下层溶液作展开剂。

4.3 实验中曾采用多种提取方法制备白术鉴别的供试品溶液,更换不同的展开系统,均未找到合适的鉴别白术的薄层析方法,因此,选择用高效液相色谱法对白术进行鉴别^[10-11]。

4.4 实验中对柚皮苷的提取时间进行考察,10 min、20 min、30 min 柚皮苷的提取率分别为 2.89%、2.91%、2.92%,确定 20 min 可将柚皮苷提取完全,因此选择超声提取 20 min。

参考文献:

- [1] 杨宏亮,田珩,李沛波,等.柚皮苷及柚皮素的生物活性研究[J].中药材,2007,30(6):752-754.
- [2] 杨晓泉,张海德,李琳.柚皮黄酮类抗氧化物质的纯化及其降血脂作用研究[J].营养学报,2004,26(5):378-381.
- [3] 蔡逸平,曹岚,范崔生.枳实、枳壳类药材的化学成分及药理研究概况[J].江西中医学院学报,1999,11(1):18-19.
- [4] 梁远园,冯彪,祝晨筱,等.HPLC 法测定枳实药材中橙皮苷和柚皮苷的含量[J].中药新药与临床药理,2006,17(5):359-361.
- [5] 吴卫中,李永庆,陈蕾.RP-HPLC 法测定金甲王颗粒中柚皮苷的含量[J].药物分析杂志,2007,27(7):1078-1080.
- [6] 刘振丽,宋志前,李林福,等.枳实炮制前后化学成分含量的变化[J].中成药,2006,28(8):1148-1150.
- [7] 曾祖平,何薇,崔立山.高效液相法测定枳实中黄酮类成分[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(7):9-10.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010 版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2000 版一部[J].北京:化学工业出版社,2000:10.
- [10] 苗明三,李振国.现代实用中药质量控制技术[M].北京:人民卫生出版社,2000:334.
- [11] 叶燕,程雪梅,俞桂新.白术药材 HPLC 指纹图谱研究[J].江苏中医药,2009,41(4):59-60.