

正交试验优选复方红藤颗粒的制备工艺及质量标准研究^Δ

任 荣*,金 津,王 彦,孟 冲,李正翔[#](天津医科大学总医院,天津 300052)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4444-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.09

摘要 目的:优选复方红藤颗粒的制备工艺,并建立其质量标准。方法:以总固体量、绿原酸含量、大黄素含量、综合评分为评价指标,加水量、提取时间、提取次数为考察因素,通过正交试验优选复方红藤颗粒的制备工艺。采用薄层色谱法鉴别绿原酸,高效液相色谱法同时测定绿原酸和大黄素的含量。结果:筛选的最优提取方案为加8倍量水,提取3次,每次提取2 h;薄层色谱鉴别特征明显,专属性强;绿原酸、大黄素的进样量分别在0.103~4.120、0.040~0.520 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 均为0.999 9);精密度、稳定性、重复性平均加样回收率试验的RSD均小于2%。结论:该试验科学地筛选了复方红藤颗粒提取工艺,所建立的质控方法操作简便、结果准确,可以作为复方红藤颗粒的质量控制标准。

关键词 复方红藤颗粒;绿原酸;大黄素;质量标准;制备工艺

Optimization of Preparation Technology of Compound Hongteng Granules and Study on the Method for Quality Standard

REN Rong, JIN Jin, WANG Yan, MENG Chong, LI Zheng-xiang (General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of Compound hongteng granules, and to establish the method for quality standard. METHODS: The preparation technology of Compound hongteng granules was optimized by orthogonal test with the volume of water, extracting time and times as factors using total amount of solid, the content of chlorogenic acid and emodin and comprehensive score as index. TLC method was used to identify *Lonicera japonica*. The contents of chlorogenic acid and emodin were determined by HPLC. RESULTS: The optimized technology was as follows: 8-fold water, extracting for 3 times, lasting for 2 h each time. TLC had a strong specificity. The linear range was 0.103-4.120 μg for chlorogenic acid ($r=0.999\ 9$) and 0.040-0.520 μg for emodin($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and recovery tests were lower than 2%. CONCLUSIONS: The extraction technology is screened scientifically in this trial. The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quality standard of Compound hongteng granules.

KEYWORDS Compound hongteng granules; Chlorogenic acid; Emodin; Quality standard; Preparation technology

复方红藤水煎剂由红藤、大黄、金银花、紫花地丁、连翘、乳香、没药、元胡、大黄、牡丹皮、甘草等多味中药煎制而来,是天津医科大学总医院应用了几十年的传统验方,在治疗急、慢性阑尾炎等疾病方面取得了良好的效果。但是,传统的煎剂存在着制备费时、服用携带不便、成分复杂、杂质含量较多、内在质量控制困难等问题。为此,本课题组主要对复方红藤颗粒的剂型、质量控制方法以及药效机制进行了系统的研究,并建立了较科学的质量控制方法,以为复方红藤颗粒更好地应用于临床提供参考。

1 材料

1.1 仪器

DIONEX UltiMate 3000型高效液相色谱仪[戴安(中国)有限公司];UV-260型紫外分光光度计(日本岛津公司);CP225D型电子分析天平(德国Sartorius公司);KQ218型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BS60型电热三用水箱(北京市医

疗设备厂);DW-2型调温电热套(天津静海民屯津龙电器厂);UV-1型三用紫外分析仪(上海顾村光电仪器厂);电热鼓风干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司通州分公司)。

1.2 药材

本研究使用的所有中药材均由安徽省亳州市药材总公司提供,经天津医科大学总医院胡建平副主任药师鉴定为真品。

1.3 试剂

大黄素对照品(批号:110756-200110)、绿原酸对照品(批号:110753-200413)均购自中国食品药品检定研究院;糖粉、糊精(美国Fisher试剂公司);甲醇为色谱纯,甲酸、乙酸丁酯、磷酸均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 颗粒剂的制备^[1-5]

2.1.1 浸渍试验 称取1/4付量的群药,浸渍于15倍量的水中,1 h后称取湿药质量,以后每隔0.5 h称取湿药质量,直至质量不再变化。记录药材质量,并计算吸收率和吸水饱和度。用各时间点的药材质量除以初始质量,即为吸水率;将药材质量的最大值定为100%,其他各值除以此最大值即为吸水饱和度。结果显示,药材浸渍2 h可基本达到饱和,从经济角度考

Δ 基金项目:天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(No.11105)

* 主管中药师。研究方向:中药制剂。E-mail:6432737@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:药事管理。电话:022-60363702

虑,选择2 h为提取时间的上限。浸渍试验结果见表1。

表1 浸渍试验结果

Tab 1 Results of dipping test

时间,h	药材质量,g	吸水率,%	吸水饱和度,%
0	49.0	0	0
1.0	132.0	269.4	86.27
1.5	140.5	285.7	91.83
2.0	146.0	298.0	95.42
2.5	148.0	302.0	96.73
3.0	153.0	312.2	100.0
3.5	153.0	312.2	100.0
4.0	153.0	312.2	100.0

2.1.2 正交试验优选工艺 以总固体量、绿原酸含量、大黄素含量、综合评分为考察指标,加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交因素表进行正交试验。因素与水平见表2;正交试验结果见表3;方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A,倍	B,h	C
1	10	1	1
2	8	1.5	2
3	6	2	3

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test

试验号	因素				试验结果			
	A	B	C	D	总固体量,%	绿原酸含量,mg/100 g生药	大黄素含量,mg/100g生药	综合评分
1	1	1	1	1	20.45	21.25	0.53	27.58
2	1	2	2	2	27.92	64.86	1.34	53.78
3	1	3	3	3	37.66	117.2	2.93	92.39
4	2	1	2	3	22.73	23.36	0.59	30.62
5	2	2	3	1	33.77	131.3	3.29	96.90
6	2	3	1	2	21.75	87.63	3.16	74.32
7	3	1	3	2	31.82	48.70	1.20	51.10
8	3	2	1	3	17.21	32.53	0.80	30.88
9	3	3	2	1	30.52	60.23	1.49	56.23
K_1	173.75	109.30	132.78	180.71				
K_2	201.84	181.56	140.63	179.20				
K_3	138.21	222.94	240.39	153.89				
R	21.21	37.88	35.87	8.94				

注:评分=(总固体得率/最大总固体得率)×100×0.3+[(绿原酸含量/最大绿原酸含量)+(大黄素含量/最大大黄素含量)]/2×100×0.7

note: score=(total yield of solid/maximum yield of solid)×100×0.3+[(chlorogenic acid content)/(maximum chlorogenic acid content)+(emodin content/maximum emodin content)]/2×100×0.7

表4 方差分析结果

Tab 4 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	n	均方	F	P
A	677.88	2	338.94	4.48	
B	2205.32	2	1102.66	14.57	
C(误差)	2399.29	2	1199.64	15.85	
D	151.35	2	75.68		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表3、表4可知,方差分析因素的主次关系为 $C>B>A$,较佳方案为 $A_2B_3C_3$ 。即提取的最佳工艺为加8倍量水,提取3

次,每次提取2 h。

2.1.3 颗粒剂的制备 取1付量的群药,根据上述优选方案加8倍量水,提取3次,每次2 h。水提液浓缩至稠膏,比重为1.35。按照稠膏、糖粉、糊精的比例为1:3:1(m/m/m)制备软材,加适量乙醇调节黏度,过筛(14目),低温干燥,整粒。依照此法制备3批复方红藤颗粒,待测。

2.2 质量标准的建立

2.2.1 绿原酸的薄层色谱(TLC)鉴别 取本品颗粒2 g,研细,加甲醇20 ml,超声处理20 min,滤过,蒸干甲醇,用少量甲醇溶解残渣,作为供试品。取绿原酸对照品适量,加甲醇制成1 mg/ml的对照品溶液。取除金银花、红藤以外的其他处方饮片,按制备工艺制成阴性颗粒,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。吸取上述溶液各5 μ l,点于同一硅H薄层胶板,以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点。绿原酸的TLC图见图1。

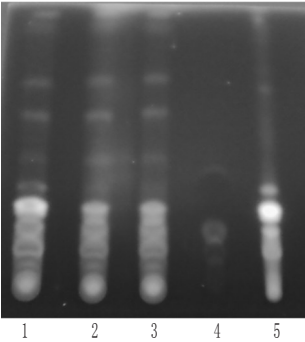


图1 绿原酸的TLC图

1~3.供试品;4.绿原酸对照品;5.阴性对照

Fig 1 TLC of chlorogenic acid

1-3. test samples; 4. chlorogenic acid; 5. negative control

2.2.2 含量测定 (1) 色谱条件。色谱柱: Irregular-HC₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~12 min, 13% B; 12~15 min, 13%~85% B; 15~40 min, 85% B); 检测波长: 327 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ l。

(2) 溶液的制备。1) 对照品贮备液的制备 精密称取大黄素对照品10.0 mg, 绿原酸对照品10.3 mg, 分别置50 ml量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 分别制成含大黄素200 μ g/ml与绿原酸206 μ g/ml的对照品贮备液。2) 供试品溶液的制备 分别取3批次的颗粒适量, 研细, 各取约5 g, 精密称定, 精密加入甲醇50 ml, 称定质量, 加热回流1 h, 放冷, 再次精密称定, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液15 ml, 置圆底烧瓶中, 减压回收溶剂至干, 加盐酸溶液(22→100)20 ml, 超声处理2 min, 再加三氯甲烷20 ml, 加热回流1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取3次, 每次20 ml, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至10 ml量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。3) 阴性对照溶液的制备 取按处方比例并以相同工艺制备的不含红藤、大黄、金银花的颗粒适量, 按“2.2.2(2)”项下方法制备阴性样品溶液。

(3)系统适用性试验 分别取“2.2.2(2)”项下的对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1 ml含大黄素20 μg、绿原酸20.6 μg的混合对照品溶液。取上述混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。绿原酸峰的保留时间约为9 min,大黄素峰的保留时间约为22 min,阴性对照无干扰。色谱见图2。

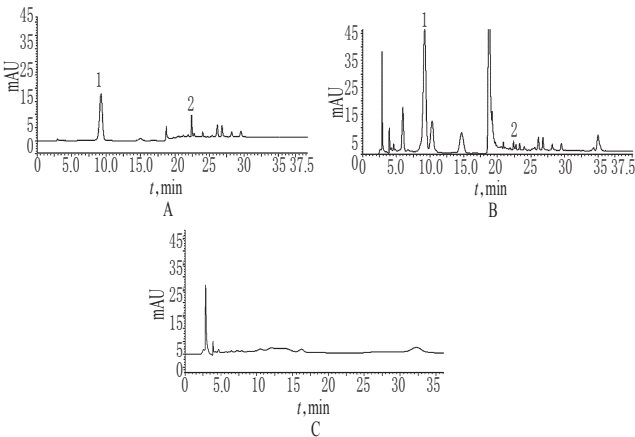


图2 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.绿原酸;2.大黄素

Fig 2 HPLC chromatograms

A.substance control; B.test sample; C.negative control; 1.chlorogenic acid;2.emodin

(4)标准曲线的制备 取“2.2.2(2)”项下对照品贮备液各适量,混合,分别加甲醇制成不同质量浓度的混合对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以峰面积积分值(x)为横坐标,对照品溶液的质量浓度(y, μg/ml)为纵坐标,进行线性回归,分别得到大黄素、绿原酸的回归方程,结果见表5。

表5 回归方程及线性范围

Tab 5 Regression equation and linear range

成分	回归方程	r	线性范围, μg
大黄素	$y=0.6628x-0.5325$	0.9999	0.040~0.520
绿原酸	$y=0.00014x+0.9081$	0.9999	0.103~4.120

(5)精密度试验 吸取同一供试品溶液各适量,按上述色谱条件重复进样6次,记录色谱图。结果,大黄素、绿原酸峰面积的RSD分别为1.2%、1.1%(n均为6),表明仪器精密度良好。

(6)稳定性试验 吸取同一供试品溶液适量,分别于0、2、4、6、24 h,按上述色谱条件进样6次,记录色谱图。结果,大黄素、绿原酸峰面积的RSD分别为1.3%、1.2%(n均为6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

(7)重复性试验 取同一批样品,按“2.2.2(2)”项下方法制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,大黄素、绿原酸峰面积的RSD分别为1.2%、1.0%(n均为6),表明本方法重复性良好。

(8)加样回收率试验 取已知含量的同批次样品适量,研细,共6份,每份2.5 g,精密称定,精密加入一定量的混合对照品溶液,按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,计算加样回收率,结果见表6。

2.2.3 样品含量测定 取“2.2.2(2)”项下供试品溶液20 μl,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果表明,该样品中大黄素与绿原酸含量均符合相关规定(暂定本品按大黄素计每

1 g不得少于25 μg,按绿原酸计每1 g不得少于1.2 mg)。样品含量测定结果见表7。

表6 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 6 Results of recovery test(n=6)

成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$,%	RSD,%
大黄素	0.07512	0.08	0.1559	100.9	101.6	1.40
	0.07567	0.08	0.1559	100.3		
	0.07533	0.08	0.1567	101.7		
	0.07602	0.08	0.1595	104.3		
	0.07556	0.08	0.1567	101.4		
	0.07527	0.08	0.1559	100.8		
绿原酸	3.126	3.09	6.202	99.55	99.54	1.31
	3.127	3.09	6.159	98.13		
	3.153	3.09	6.259	100.5		
	3.137	3.09	6.186	98.67		
	3.115	3.09	6.257	101.6		
	3.122	3.09	6.175	98.80		

表7 样品含量测定结果(n=3)

Tab 7 Results of content determination of samples(n=3)

批号	大黄素含量, μg/g	绿原酸含量,mg/g
20110709	30.26	1.26
20110718	28.57	1.32
20110728	31.61	1.29

3 讨论

复方红藤颗粒中君药为红藤,其抗菌消炎作用为本方的主要药效;大黄素为方中红藤与大黄的共有成分。王荣土等^[6]研究发现,大黄素可明显缩短术后早期炎性肠梗阻的病程。因此,笔者将大黄素作为指标性成分。红藤与金银花的共有成分绿原酸具有广泛的生理活性和药理活性^[6],具有利胆、抗菌、增加白细胞和兴奋中枢的作用^[7-8],本研究也将其作为含量测定指标。

按照文献报道^[9],大黄素、绿原酸在254、327 nm波长处均有紫外吸收,建议选择254 nm作为检测波长。但是笔者在本研究中发现,两种成分在327 nm波长处紫外吸收较254 nm处强,并且在327 nm波长处产生的溶剂杂峰较小,故将327 nm作为测定波长。红藤、金银花中的绿原酸具有较大的极性,在乙腈-水系统中不能被保留,在流动相中加入一定量的磷酸,可使得绿原酸被检出。本研究采用梯度洗脱的方法,可同时检测两种有效成分,提高了工作效率,降低了生产成本。

综上所述,本试验科学地筛选了复方红藤颗粒提取工艺,所建立的质控方法操作简便、结果准确,可以作为复方红藤颗粒的质量控制标准。

参考文献

[1] 马秉智,高增平.反相高效液相色谱法测定大血藤中大黄素的含量[J].北京中医药大学学报,2005,28(1):57.
[2] 单爱莲,权菊香,钱丽奇,等.对预防与治疗非典型肺炎的中药处方情况调查分析[J].中国临床药理学杂志,2003,19(30):289.
[3] 黄喜茹,刘伟娜,曹冬.金银花的化学成分药理作用研究评析[J].中医医学刊,2005,23(3):218.
[4] Ko HJ, Oh SK, Jin JH, et al. Inhibition of experimental systemic inflammation (septic inflammation) and chronic bronchitis by new phytoformula BL containing broussonetia papyrifera and Lonicera japonica[J]. Biomol Ther,

苦参碱胃内漂浮颗粒的质量标准建立及稳定性考察

韦亚洁*, 谢明全, 李平(兰州大学第二医院药学部, 兰州 730030)

中图分类号 R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4447-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.10

摘要 目的:建立苦参碱胃内漂浮颗粒的质量标准,并对其稳定性进行初步考察。方法:采用高效液相色谱法测定制剂中苦参碱的含量。色谱柱为ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(70:30, V/V;用三乙胺调pH至6.0),检测波长为220 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为5 μl。通过影响因素试验考察制剂的初步稳定性。结果:苦参碱的质量浓度在0.004 95~0.316 8 mg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999\ 8$);精密密度、稳定性、加样回收率的RSD<2.0%。3批样品2 h/8 h释放量分别为标示量的27.82%/82.18%、25.27%/84.21%、26.34%/86.99%;制剂在无包装保护的情况下,于高温(60 ℃)、强光[(4 500±500)lx]、高湿度[(90±5)%]环境中放置10 d不稳定。结论:苦参碱胃内漂浮颗粒制备工艺简单,稳定易控,缓释效果和漂浮性良好,制备的样品符合制剂质量要求;初步稳定性试验结果提示本品应防潮、避光和常温贮藏。

关键词 苦参碱;漂浮颗粒;质量标准;稳定性;高效液相色谱法

Quality Criteria Establishment and Stability Evaluation of Matrine Gastric Floating Particles

WEI Ya-jie, XIE Ming-quan, LI Ping(Dept. of Pharmacy, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality criteria for Matrine gastric floating particles and preliminarily evaluate their stability. METHODS: The content of matrine was determined by HPLC. The determination was performed on ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (70:30, V/V; pH value adjusted to 6.0) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 220 nm and column temperature was 30 ℃. The sample size was 5 μl. The initial stability of the preparation was evaluated through influential factor test. RESULTS: The linear range of matrine was 0.004 95-0.316 8 mg/ml ($r=0.999\ 8$). RSD of precision, stability and recovery tests were all less than 2.0%. The release amount of 3 batches of samples within 2 h/8 h accounted for 27.82%/82.18%, 25.27%/84.21% and 26.34%/86.99% of the labeled amount, respectively. Under the circumstance of unpackaged, samples were not stable if placed for ten days under the high temperature (60 ℃), strong light [(4 500±500) lx] and high humidity [(90±5)%]. CONCLUSIONS: The preparation technology of Matrine gastric floating particles is simple, stable and easy to control. Matrine gastric floating particles are of good sustained-release effect and floatability. Prepared particles have met quality demand. Storage in dry, preferably dark places and at room temperature is recommended.

KEYWORDS Matrine; Floating particles; Quality standards; Stability; HPLC

苦参碱(matrine)是从豆科植物苦参、苦豆子、广豆根中提取分离得到的一种生物碱^[1],具有镇痛、免疫抑制、抗心律失常、抗肿瘤等药理作用^[2~4],临床上常用于急慢性肝炎与恶性肿瘤的治疗^[5]。目前,应用于临床的苦参碱剂型主要有注射剂、片剂及胶囊剂等,其普通口服制剂的药效维持时间较短,需频繁给药,且血药浓度波动较大,易引起不良反应。苦参碱胃内漂浮颗粒是根据流体动力学(HBS)原理制备的一种特殊缓释

制剂,患者口服后能漂浮于胃液之上,这对一些胃部特殊疾病如胃癌及胃溃疡的治疗具有特殊治疗意义^[6]。本研究在前期制备工艺研究的基础上,参照2010年版《中国药典》相关要求,以含量、释放度为指标,建立质量标准,并对其稳定性进行考察。

1 材料

1.1 仪器

ZRS-8G型智能溶出实验仪(天津大学无线电厂);1200型

2013,21(1):66.

- [5] Han J, Lv QY, Jin SY, *et al.* Comparison of anti-bacterial activity of three types of di-*O*-caffeoylquinic acids in *Lonicera japonica* flowers based on microcalorimetry[J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(2):108.
- [6] 王荣土, 蓝宏锦. 生大黄浸液灌肠治疗术后早期炎症性肠梗阻43例[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2013, 8(19):414.

- [7] 毛水春, 崔承彬, 顾谦群. 中药大血藤中酚类化学成分及抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(6):326.
- [8] 李丽, 杨梅. 红藤对小鼠免疫功能及同种异基因皮肤移植排斥反应的抑制作用[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 3(225):223.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:22.

(收稿日期:2014-08-28 修回日期:2014-10-28)

* 副主任药师。研究方向:新药与医务管理。电话:0931-8942627。E-mail:yajiewei@163.com