

不同厂家小柴胡汤丸的溶出度研究^Δ

唐富山^{1*}, 张晓慧¹, 兰 雪¹, 孟 翠¹, 王玉和^{2#}(1.遵义医学院药学院临床药学教研室, 贵州 遵义 563003; 2.遵义医学院附属医院药剂科, 贵州 遵义 563003)

中图分类号 R945 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4272-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.31

摘要 目的:建立小柴胡汤丸溶出度的测定方法,并比较不同厂家制剂的差异。方法:以0.1 mol/L 盐酸为溶出介质,采用转篮法测定制剂的溶出度;采用高效液相色谱法测定制剂中黄芩苷的含量;色谱柱为TSKgel ODS C₁₈,流动相为甲醇-水-磷酸(65:35:0.7, V/V/V),流速为1 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μl。结果:黄芩苷检测质量浓度线性范围为0.488~124.8 mg/L($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率试验为100.14%~104.78%(RSD=1.58%, $n=9$)。小柴胡汤丸中黄芩苷50%溶出时间(t_{50})平均值为85.81 min。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性较好,可用于小柴胡汤丸溶出度的测定。不同厂家小柴胡汤丸溶出差异较大,制剂制备和临床用药中均需重视固体制剂的溶出状况。

关键词 小柴胡汤丸;黄芩苷;溶出度

Study on the Dissolution of Xiaocaihu Pill from Different Manufacturers

TANG Fushan¹, ZHANG Xiaohui¹, LAN Xue¹, MENG Cui¹, WANG Yuhe²(1.Dept. of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563003, China; 2.Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of dissolution of Xiaocaihu pill, and compare the difference of preparation from different manufacturers. METHODS: Using 0.1 mol/L HCl as dissolution medium, rotating basket method was used to determine the dissolution of preparations. HPLC was adopted to determine the content of baicalin: column was TSKgel ODS C₁₈ with mobile phase of methanol-water-phosphoric acid (65:35:0.7, V/V/V) at a flow rate of 1 ml/min, detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 5 μl. RESULTS: The linear range of baicalin was 0.488-124.8 mg/L ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 100.14%-104.78% (RSD=1.58%, $n=9$). The average t_{50} (50% dissolution time) of baicalin was 85.81 min. CONCLUSIONS: The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and can be used for the dissolution determination of Xiaocaihu pill. Xiaocaihu pill from different manufacturers shows great differences, both preparation formulation and clinical use should attach importance to the dissolution of solid preparations.

KEYWORDS Xiaocaihu pill; Baicalin; Dissolution

小柴胡汤始载于《伤寒杂病论》中,常为治疗少阳病的主方^[1-2]。现代药理研究表明,小柴胡汤对细胞免疫有一定的调节机制,具有解热、保肝、抗病毒等作用^[3]。在现有的文献报道中,对小柴胡汤^[4-5]和颗粒^[6-7]中黄芩苷等成分的分析研究较多,但只有少数学者对小柴胡汤丸中黄芩苷的含量进行研究^[8],而小柴胡汤丸的体外溶出度研究和不同厂家制剂间溶出度的比较尚未见文献报道。

溶出度系指药物从片剂、胶囊或颗粒等固体制剂在规定条件下溶出的速率和程度^[9]。目前,溶出度测定已被作为评价制剂质量、生产工艺及生物利用度的参考依据。对市售小柴

胡汤固体剂型的溶出度进行测定不仅可以反映其在体内的吸收和药效情况,还可以为不同厂家相同剂型之间或不同剂型之间的体内生物利用度评价提供参考。

2015年版《中国药典》(一部)规定,小柴胡片、小柴胡泡腾片、小柴胡胶囊和小柴胡颗粒均以黄芩苷含量为质控指标^[10],而对汤丸尚无含量测定的质量控制项目。本试验拟对市售不同厂家间小柴胡汤丸的体外溶出度进行研究,用Excel程序分析比较溶出参数,即50%溶出时间(t_{50})、63.2%溶出时间(t_d)、斜率或形状参数(m)^[11-13],以期小柴胡汤丸的质量控制和内在质量评价提供一定借鉴,并可为小柴胡汤固体制剂临床合理使用及基础研究提供一定参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1329B进样器、G1311C四元泵、G1315C二极管阵列检测器(美国Agilent公司);ERS-8GD型智能溶出仪(天津市天大天发科技有限公

Δ 基金项目:贵州省科学技术基金项目(No.黔科合J字[2013]2323号);贵州省科技合作专项资金项目(No.省市科合[2015]53号);遵义医学院临床药学新兴扶持学科

* 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:临床药学与药剂学。电话:0851-28642337。E-mail: fushantang@qq.com

通信作者:主任药师,教授,硕士生导师。研究方向:医院药学、临床药学和药物经济学。E-mail: wangyuhe11@163.com

司);FA2004N型电子分析天平(上海菁海仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

小柴胡汤丸(兰州太宝制药有限公司,批号:61150304;兰州佛慈制药股份有限公司,批号:12M18;甘肃天水岐黄药业有限责任公司,批号:140506;甘肃省众友药业制药有限责任公司,批号:142701;河南省宛西制药有限公司,批号:150101,规格均为每8丸相当于原药材3g);黄芩苷对照品(贵州迪大生物科技有限责任公司,批号:GZDD-0037,纯度:98.17%);甲醇、盐酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:TSKgel ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(65:35:0.7,V/V/V),流速:1 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取黄芩苷对照品12 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取中段滤液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品2粒溶解于500 ml 0.1 mol/L盐酸中,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取中段滤液,即得。

2.3 专属性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。在黄芩苷对照品色谱峰相应的位置上,供试品色谱图中显示相同保留时间的色谱峰,色谱峰形状几乎一致;理论板数按黄芩苷峰计约为4 000。结果表明,供试品溶液中其他成分不干扰黄芩苷测定,方法专属性良好。

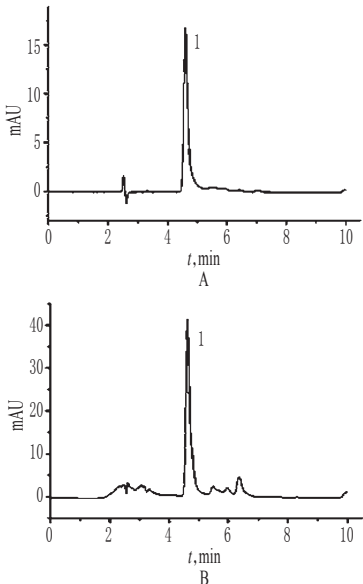


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; 1.baicalin

2.4 线性关系考察

分别量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,分别置于10 ml量

瓶中,加流动相定容,制成质量浓度分别为0.488、0.975、1.95、31.2、62.4、124.8 mg/L的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以黄芩苷质量浓度(x,mg/L)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得黄芩苷回归方程为y=13 593x-23.922 (r=0.999 9)。结果表明,黄芩苷检测质量浓度线性范围为0.488~124.8 mg/L。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,黄芩苷峰面积的RSD=0.65%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:140506)适量,分别于室温下放置0、1、3、5、7、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芩苷峰面积的RSD=1.98%(n=7),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:140506)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芩苷峰面积的RSD=0.80%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:140506)适量,共6份,每份1.0 g,分别加入低、中、高质量的黄芩苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.068 8	0.055 5	0.126 7	101.93		
0.068 8	0.055 5	0.129 2	103.94		
0.068 8	0.055 5	0.130 1	104.67		
0.068 8	0.069 4	0.138 4	100.14		
0.068 8	0.069 4	0.140 4	101.59	103.06	1.58
0.068 8	0.069 4	0.144 8	104.78		
0.068 8	0.082 6	0.155 5	102.71		
0.068 8	0.082 6	0.156 9	103.63		
0.068 8	0.082 6	0.157 7	104.16		

2.9 溶出度试验

2.9.1 溶出介质的制备 精密量取8.6 ml盐酸,用已烧至沸腾并冷却后的蒸馏水定容至1 000 ml,摇匀,即得浓度为0.1 mol/L的盐酸溶液。

2.9.2 小柴胡汤丸的溶出度测定 取本品12粒,每2丸精密称定质量后分别置于智能溶出仪的6个转篮内,按2015年版《中国药典》(四部)溶出度测定法(转篮法)^[9]项下操作。以500 ml 0.1 mol/L盐酸为溶出介质,温度为(37.0±0.5)℃,转速为100 r/min。分别于20、40、60、90、120、150 min时用注射器抽出3 ml溶出液,并补充等量的溶出介质,若150 min内本品未溶解完全,延长取样时间,直至溶解完全。

2.9.3 样品溶出度计算 将不同时刻抽取的溶出液用0.22 μm的微孔滤膜滤过后,进样检测。以不同时间黄芩苷溶出量除以溶出样品中黄芩苷含量得该时刻小柴胡汤丸中黄芩苷的累积溶出度。将溶出液的取样时间(*t*)和溶出度*F(t)*(用小数表示)分别置于 Excel 表格中,分别用公式求出 ln(*t*), ln[1/1-*F(t)*], lnln[1/1-*F(t)*], 以 lnln[1/1-*F(t)*]对 ln(*t*)进行 correl、slope、intercept 函数计算,分别求出相关系数、*m*、截距,得出线性方程;反对数计算出不同厂家制剂相应 *t*₅₀、*t*_d。结果表明,样品 *t*₅₀ 平均为 85.81 min,不同产家生产的小柴胡汤丸中黄芩苷的溶出时间差异明显,详见表 2。

表 2 样品中黄芩苷溶出度检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of dissolution detection of baicalin in samples ($\bar{x} \pm s, n=6$)

样品批号	<i>t</i> ₅₀ , min	<i>t</i> _d , min	<i>m</i>
61150304	35.28 ± 13.53	50.26 ± 12.62	1.47 ± 0.80
12M18	65.24 ± 7.99	97.43 ± 30.41	1.42 ± 0.55
140506	197.51 ± 30.21	291.42 ± 53.47	0.97 ± 0.13
142701	102.65 ± 60.94	154.17 ± 106.54	1.05 ± 0.29
150101	28.37 ± 23.38	38.66 ± 32.66	1.41 ± 0.84

3 讨论

溶出过程可以反映药物的体内吸收状况,由于剂型不同,药物在体内的吸收速度与程度也会存在差异。一般情况下,药物的溶出越快,其在人体的吸收速度也相对较快,体内的起效时间也相对较快;相同的溶出时间,药物的溶出量越大,其作用强度也相对较大。因此,溶出度研究可为相同药物的不同产品之间的临床生物等效性评价提供参考^[14]。

丸剂是粉体浓缩成丸后的剂型,口服后在胃肠道内要经历崩解-溶解-吸收的过程,其中崩解过程与制剂过程加入的辅料类型和生产工艺有很大的关系,因而丸剂中药效成分溶出相对其他固体剂型较慢。不同厂家生产的小柴胡汤丸中黄芩苷的溶出情况差异较大,这可能与处方、制备工艺差异有关。在药物制备成型过程中,应充分考虑赋形剂与主药的关系,优化处方设计及制备工艺,保证药物效应成分在人体中最大限度的吸收和利用^[15-17]。源自不同厂家的相同药品,药物吸收并作用于机体的时间可能各异,因而其作用可能出现差异。临床用药中,若给患者更换不同产家的药品时,应注意药物效应和不良反应的变化,防止疗效的强烈波动或不良反应发生率的增加。

本试验参照 2015 年版《中国药典》(一部)中小柴胡汤相关制剂含量测定方法^[10],以及黄芩苷含量测定的相关文献^[4,6,8],对测定黄芩苷的色谱条件进行了改进,所建立的分析方法具有出峰时间较短的特点,测定简便易行,不仅可用于小柴胡汤丸及类似制剂的溶出度研究,对其含量测定也是有益的参考。

参考文献

[1] 姚洁琼,李宜放.《伤寒杂病论》大小成对命名方剂探析[J].中医药导报,2016,22(7):11.

[2] 徐睿瑶,李宏远.小柴胡汤在日本的应用与发展概况[J].世界中西医结合杂志,2016,11(7):1 021.

[3] 王金叶,巴艳东.小柴胡汤临床应用进展[J].卫生职业教育,2015,33(10):155.

[4] 兰雪,唐富山,陈曾妮,等.HPLC 法测定小柴胡汤剂中黄芩苷的含量[J].遵义医学院学报,2015,38(4):78.

[5] 王德强,常凤鸣,王宇辉,等.小柴胡颗粒的多波长 HPLC 图谱及药材-制剂谱峰匹配分析[J].中药材,2016,39(4):810.

[6] 栗建明,莫结丽,隆颖.小柴胡颗粒中黄芩苷含量测定的不确定度评定[J].中国民族民间医药,2015(11):11.

[7] 徐辰琛.HPLC 法测定小柴胡汤中各有效成分含量[J].亚太传统医药,2015,11(24):39.

[8] 石莹.HPLC 测定小柴胡汤丸中黄芩苷的含量[J].中成药,2007,29(7):23.

[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:122.

[10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:574.

[11] 于香安,蔡怀友.用电子计算器求算片剂溶出度溶出参数的运算程序[J].中国药房,1995,6(4):21.

[12] 苗爱东,王彦宗,鬲秀燕,等.Excel 2010 在药物溶出曲线相似性比较中的应用[J].中国医药科学,2011,1(10):11.

[13] 刘红,张关敏,张艳华.不同厂家枸橼酸他莫昔芬片的体外溶出度考察[J].中国医院药学杂志,2012,32(6):436.

[14] 刘维,杨丽,Benet LZ,等.基于药物体内处置的生物药剂学分类系统(BDDCS)简介[J].中国新药与临床杂志,2013,32(4):265.

[15] 刘卫红.小柴胡汤不同制法对黄芩苷含量的影响[J].中国药房,2008,19(12):921.

[16] 蒋苏贞,黄小兵,陈春丽,等.HPLC 测定生姜对小柴胡汤中柴胡皂苷 a 和黄芩苷溶出的影响[J].中华中医药学刊,2014,32(7):1 652.

[17] 刘俊红,张淑坤,李棣华,等.HPLC 法同时测定加减小柴胡方中 8 种成分的含量[J].中华中医药杂志,2016,31(3):979.

(收稿日期:2016-07-01 修回日期:2016-08-11)
(编辑:张 静)

HPLC法同时测定参芪扶正注射液中6种成分的含量

舒娟^{1*},杨胜斌²(1.铜仁市食品药品检验所,贵州 铜仁 554300;2.铜仁市人民医院,贵州 铜仁 554300)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4275-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.32

摘要 目的:建立同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV和党参炔苷、芒柄花素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈,检测器为蒸发光散射检测器,流动相为乙腈-0.5% 甲酸(梯度洗脱),流速为 1.2 ml/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:黄芪皂苷 I、II、III、IV、党参炔苷和芒柄花素检测进样量线性范围分别为 0.62~5.67 μg($r=0.999\ 6$)、0.78~6.31 μg($r=0.999\ 6$)、0.36~3.48 μg($r=0.999\ 7$)、0.81~6.72 μg($r=0.999\ 5$)、0.82~7.03 μg($r=0.999\ 8$)、0.58~6.62 μg($r=0.999\ 7$);定量限分别为 1.21、0.15、0.12、0.03、0.12、0.17 μg/ml;检测限分别为 0.35、0.35、0.04、0.01、0.03、0.04 μg/ml;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;加样回收率分别为 95.1%~101.1% (RSD=2.0%, $n=9$)、95.2%~100.7% (RSD=1.9%, $n=9$)、95.8%~100.2% (RSD=1.4%, $n=9$)、96.2%~100.6% (RSD=1.7%, $n=9$)、96.6%~101.2% (RSD=1.4%, $n=9$)、95.9%~99.5% (RSD=1.2%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确,可用于同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV、党参炔苷和芒柄花素的含量。

关键词 参芪扶正注射液;高效液相色谱法;黄芪皂苷 I;黄芪皂苷 II;黄芪皂苷 III;黄芪皂苷 IV;党参炔苷;芒柄花素

Simultaneous Determination of Six Components in Shenqi Fuzheng Injection by HPLC

SHU Juan¹, YANG Shengbin² (1.Tongren Institute for Food and Drug Control, Guizhou Tongren 554300; 2.Tongren People's Hospital, Guizhou Tongren 554300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of astragalosides I, II, III, IV, lobetyolin and formononetin in Shenqi fuzheng injection. METHODS: HPLC was performed. The detector was evaporative light scattering detector, column was Ultimate XB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.5% formic acid (gradient elution) at a flow rate of 1.2 ml/min, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.62-5.67 μg for astragalosides I ($r=0.999\ 6$), 0.78-6.31 μg for astragalosides II ($r=0.999\ 6$), 0.36-3.48 μg for astragalosides III ($r=0.999\ 7$), 0.81-6.72 μg for astragalosides IV ($r=0.999\ 5$), 0.82-7.03 μg for lobetyolin ($r=0.999\ 8$) and 0.58-6.62 μg ($r=0.999\ 7$) formononetin; limit of quantitation was 1.21, 0.15, 0.12, 0.03, 0.12, 0.17 μg/ml; limit of detection was 0.35, 0.35, 0.04, 0.01, 0.03, 0.04 μg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 95.1%-101.1% (RSD=2.0%, $n=9$), 95.2%-100.7% (RSD=1.9%, $n=9$), 95.8%-100.2% (RSD=1.4%, $n=9$), 96.2%-100.6% (RSD=1.7%, $n=9$), 96.6%-101.2% (RSD=1.4%, $n=9$) and 95.9%-99.5% (RSD=1.2%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the simultaneous determination of astragalosides I, II, III, IV, lobetyolin and formononetin in Shenqi fuzheng injection.

KEYWORDS Shenqi fuzheng injection; HPLC; Astragaloside I; Astragaloside II; Astragaloside III; Astragaloside IV; Lobetyolin; Formononetin

参芪扶正注射液主要由党参和黄芪两味中药材组成,具有益气扶正的功效,主要用于提高气虚患者的免疫力,改善其气虚症状和生存质量^[1-3]。方中黄芪主要成分包括皂苷、氨基酸类、多糖以及黄酮等成分,其中黄芪皂苷 I、II、III、IV和芒柄花素是该药材的主要活性成分,具有较好的免疫调节作用,在抗氧化、抗肿瘤和抗疲劳等方面亦具有较好的药理作用^[4-5]。党参炔苷则是党参的主要活性成分,其在提高免疫方面均具有较好的疗效^[6-7]。目前,尚未有对黄芪皂苷 I、II、III、IV和党参炔苷、芒柄花素这 6 种主要活性成分进行同时测定的报道^[7-10]。因此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)、蒸发光散射检测器(ELSD)建立了同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV和党参炔苷、芒柄花素含量的方法,以期为该制剂的质量控制提供参考。

* 主管中药师。研究方向:中药及中成药的检验方法及质量控制。E-mail:563965969@qq.com

1 材料

1.1 仪器

1220 型 HPLC 仪,自动进样器、柱温箱、四元泵、LE-780 型 ELSD(美国 Agilent 公司);EO243S 型万分之一电子天平(德国 Eppendorf 公司);SQ-4200 型超声波清洗器(上海精密仪器仪表有限公司,功率:250 W,频率:50 kHz)。

1.2 药品与试剂

参芪扶正注射液(丽珠医药集团股份有限公司,批号:2014050179、2014060132、2014070121、2014080131、2014090133,规格:250 ml/瓶);黄芪皂苷 I 对照品(批号:98087110)、黄芪皂苷 II 对照品(批号:98086745)、黄芪皂苷 III 对照品(批号:98082873)和黄芪皂苷 IV 对照品(批号:98086721)均购自美国 Sigma 公司,纯度均≥98%;党参炔苷对照品(批号:111712-201401)、芒柄花素(批号:111712-201412)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;乙腈为色谱纯,其余试

剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);检测器:ELSD;流动相:乙腈-0.5%甲酸,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.2 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0~13	21→33	79→67
13~21	33→42	67→58
21~36	42→46	58→54
36~43	46→21	54→79

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素对照品适量,精密称定,置于同一 25 ml 量瓶中,加甲醇制成 1 ml 含黄芪皂苷 I 1.12 mg、黄芪皂苷 II 1.24 mg、黄芪皂苷 III 0.78 mg、黄芪皂苷 IV 1.82 mg、党参炔苷 2.18 mg、芒柄花素 1.23 mg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品 20 ml,减压蒸馏后得到浸膏并制备冻干粉末,备用。取上述冻干粉末 0.1 g,精密称定,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇 30 ml,超声处理 30 min,放冷至室温,加甲醇定容,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和配方比例分别制备缺黄芩和缺党参的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法分别制备阴性对照溶液(A 和 B),即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液(A 和 B)各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以黄芪皂苷 II 峰计为 2 000,保留时间为 25.5 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

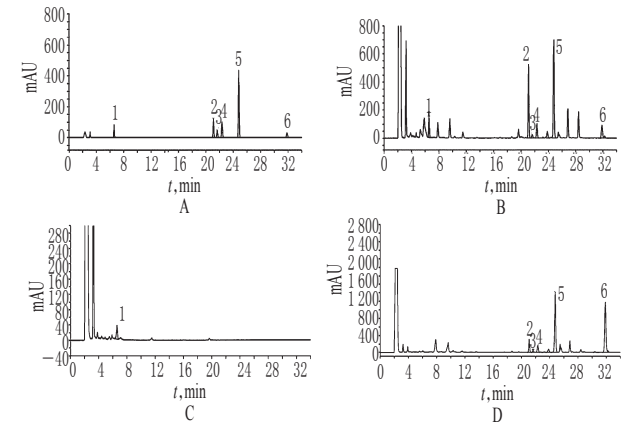


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照A;D.阴性对照B;1.党参炔苷;2.黄芪皂苷IV;3.黄芪皂苷III;4.芒柄花素;5.黄芪皂苷II;6.黄芪皂苷I

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference substance; B. test sample; C. negative control A; D. negative control B; 1.lobetolol; 2.astragaloside IV; 3.astragaloside III; 4. formononetin; 5.astragaloside II; 6.astragaloside I

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,分别置于 5 ml 量瓶中,加甲醇定容,超声处理 5

min,即得系列线性溶液;取上述溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表 2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围,μg
黄芪皂苷 I	y=1.192 1x+5.424 1	0.999 6	0.62~5.67
黄芪皂苷 II	y=1.326 7x+6.168 1	0.999 6	0.78~6.31
黄芪皂苷 III	y=1.269 1x+5.672 1	0.999 7	0.36~3.48
黄芪皂苷 IV	y=1.338 9x+6.119 2	0.999 5	0.81~6.72
党参炔苷	y=1.489 0x+4.821 0	0.999 8	0.82~7.03
芒柄花素	y=1.339 1x+6.602 1	0.999 7	0.58~6.62

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得定量限(LOQ);当信噪比为 3:1 时,得检测限(LOD),结果见表 3。

表3 定量限与检测限测定结果

Tab 3 Determination results of quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ, μg/ml	LOD, μg/ml
黄芪皂苷 I	1.21	0.35
黄芪皂苷 II	0.15	0.35
黄芪皂苷 III	0.12	0.04
黄芪皂苷 IV	0.03	0.01
党参炔苷	0.12	0.03
芒柄花素	0.17	0.04

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.0%、1.3%、0.7%、0.8%、1.2%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0、1、2、4、8、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.2%、1.3%、0.9%、1.1%、1.6%(n=6),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:2014050179)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分含量。结果,黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素的平均含量分别为 0.082 0、0.007 9、0.017 1、0.049 0、0.003 9、0.052 8 mg/g, RSD 分别为 1.2%、1.1%、1.9%、1.7%、1.8%、1.8%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:2014050179)适量,按“2.2.2”项下方法制备冻干粉末,称取 9 份,每份约 2 g,精密称定,置于 10 ml 量瓶中,分别加入低、中、高质量的黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 4。

2.10 样品含量测定

取“1.2”项下 5 批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供

试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素的含量,结果见表5。

表4 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 4 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
黄芪皂苷 I	2.091 20	0.035 97	0.560 00	0.583 09	97.7	97.7	2.0
	2.080 10	0.035 78	0.560 00	0.574 50	96.2		
	2.098 70	0.036 10	0.560 00	0.586 02	98.2		
	2.103 50	0.036 18	1.120 00	1.120 34	96.8		
	2.089 70	0.035 94	1.120 00	1.110 02	95.9		
	2.100 60	0.036 13	1.120 00	1.168 45	101.1		
	2.121 80	0.036 49	1.680 00	1.726 57	100.6		
	2.109 80	0.036 29	1.680 00	1.675 97	97.6		
	2.062 50	0.035 48	1.680 00	1.633 16	95.1		
	2.091 20	0.090 34	0.620 00	0.714 68	100.7	98.1	1.9
黄芪皂苷 II	2.080 10	0.089 86	0.620 00	0.710 48	100.1		
	2.098 70	0.090 87	0.620 00	0.699 50	98.2		
	2.103 50	0.090 66	1.240 00	1.317 23	98.9		
	2.089 70	0.090 28	1.240 00	1.279 44	95.9		
	2.100 60	0.090 75	1.240 00	1.289 83	96.7		
	2.121 80	0.091 66	1.860 00	1.910 74	97.8		
	2.109 80	0.091 14	1.860 00	1.861 86	95.2		
	2.062 50	0.089 10	1.860 00	1.936 08	99.3		
	2.091 20	0.044 33	0.390 00	0.427 31	98.2	98.3	1.4
	2.080 10	0.044 10	0.390 00	0.430 59	99.1		
黄芪皂苷 III	2.098 70	0.044 49	0.390 00	0.434 10	99.9		
	2.103 50	0.044 59	0.780 00	0.812 89	98.5		
	2.089 70	0.044 30	0.780 00	0.805 58	97.6		
	2.100 60	0.044 53	0.780 00	0.813 61	98.6		
	2.121 80	0.044 98	1.170 00	1.165 84	95.8		
	2.109 80	0.044 73	1.170 00	1.176 12	96.7		
	2.062 50	0.043 73	1.170 00	1.216 07	100.2		
	2.091 20	0.117 32	0.910 00	0.997 29	96.7	98.2	1.7
	2.080 10	0.116 69	0.910 00	1.032 15	100.6		
	2.098 70	0.117 74	0.910 00	1.004 99	97.5		
黄芪皂苷 IV	2.103 50	0.118 01	1.820 00	1.868 85	96.2		
	2.089 70	0.117 23	1.820 00	1.899 01	97.9		
	2.100 60	0.117 84	1.820 00	1.912 36	98.6		
	2.12180	0.119 03	2.730 00	2.827 19	99.2		
	2.109 80	0.118 36	2.730 00	2.752 81	96.5		
	2.062 50	0.115 71	2.730 00	2.853 90	100.3		
	2.091 20	0.234 42	1.090 00	1.337 50	101.2	98.3	1.4
	2.080 10	0.233 18	1.090 00	1.315 55	99.3		
	2.098 70	0.235 26	1.090 00	1.310 00	98.6		
	2.103 50	0.235 80	2.180 00	2.376 56	98.2		
党参炔苷	2.089 70	0.234 26	2.180 00	2.346 68	96.9		
	2.100 60	0.235 48	2.180 00	2.360 98	97.5		
	2.121 80	0.237 85	3.270 00	3.396 67	96.6		
	2.109 80	0.236 51	3.270 00	3.434 57	97.8		
	2.062 50	0.231 21	3.270 00	3.455 43	98.6		
	2.091 20	0.020 08	0.615 00	0.617 25	97.1	97.7	1.2
	2.080 10	0.019 97	0.615 00	0.621 44	97.8		
	2.098 70	0.020 15	0.615 00	0.632 01	99.5		
	2.103 50	0.020 19	1.230 00	1.228 05	98.2		
	2.089 70	0.020 06	1.230 00	1.207 14	96.5		
芒柄花素	2.100 60	0.020 17	1.230 00	1.234 18	98.7		
	2.121 80	0.020 37	1.845 00	1.789 73	95.9		
	2.109 80	0.020 25	1.845 00	1.839 42	98.6		
	2.062 50	0.019 80	1.845 00	1.809 45	97.0		

表5 样品含量测定结果(n=3,mg/g)
Tab 5 Results of contents determination of samples (n=3, mg/g)

样品批号	黄芪皂苷 I	黄芪皂苷 II	黄芪皂苷 III	黄芪皂苷 IV	党参炔苷	芒柄花素
2014050179	0.017 2	0.043 2	0.021 2	0.056 1	0.112 1	0.009 6
2014060132	0.017 0	0.043 9	0.021 0	0.055 6	0.122 3	0.009 2
2014070121	0.016 7	0.042 8	0.020 9	0.056 7	0.121 8	0.009 1
2014080131	0.016 9	0.042 2	0.022 1	0.056 9	0.124 2	0.009 4
2014090133	0.017 0	0.044 1	0.022 0	0.056 0	0.112 3	0.009 1

3 讨论

笔者分别考察了甲醇-水、乙腈-0.2% 甲酸、乙腈-水、乙腈-0.5% 甲酸作为本试验的流动相对待测成分分离度的影响。结果,采用甲醇-水、乙腈-0.2% 甲酸、乙腈-水作为流动相时,各成分的分离度不好、均有拖尾现象,而采用乙腈-0.5% 甲酸作为流动相时各成分分离效果均较好,因此选择乙腈-0.5% 甲酸为本试验的流动相。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,可用于同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV、党参炔苷和芒柄花素的含量。

参考文献

[1] Cai YM, Zhang Y, Zhang PB, *et al.* Neuroprotective effect of Shenqi Fuzheng injection pretreatment in aged rats with cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(1): 94.

[2] Li J, Wang JC, Ma B, *et al.* Shenqi Fuzheng injection for advanced gastric cancer: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(1): 71.

[3] 古洪艳,张声源,黄文华,等.参芪扶正注射液的化学成分研究: II [J]. *中成药*, 2013, 35(7): 1 494.

[4] 冯佩佩,李忠祥,原忠.党参属药用植物化学成分和药理研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2012, 29(4): 307.

[5] 周超,何轶,林瑞超,等.黄芪 4 种皂苷提取物的制备及其在黄芪总皂苷含量测定中的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(22): 56.

[6] 吴忠民,贾忠,李喜香,等.黄芪党参颗粒中黄芪甲苷含量的 HPLC 测定方法[J]. *西部中医药*, 2012, 25(10): 23.

[7] 梁瑾,刘小花,任远,等.HPLC-DAD-ELSD 法同时测定黄芪中 5 个成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(2): 210.

[8] Luisa P, Alessandra B, Elena L. Antimicrobial and anti-fungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus* [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73: 336.

[9] Krasteva IN, Toshkova RA, Nikolov SD. Protective effect of *Astragalus corniculatus* saponins against myeloid graffi tumour in hamsters[J]. *Phytother Res*, 2004, 18(3): 255.

[10] 梁丽娟,赵奎君,屠鹏飞,等.HPLC 法同时测定黄芪中 4 种黄酮类成分的含量[J]. *中国药房*, 2010, 21(15): 1 385.

(收稿日期:2016-05-18 修回日期:2016-08-07)
(编辑:刘 柳)

盐酸决奈达隆片仿制药与原研药的溶出度一致性评价

赵欣^{1*}, 陈国华^{1#}, 吴琼珠¹, 滕海堂², 郁婷婷¹(1.中国药科大学药学院, 南京 210009; 2.淮安市食品药品检验所, 江苏淮安 223001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4278-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.33

摘要 目的:建立盐酸决奈达隆片的溶出度测定方法,并评价仿制药与原研药的质量一致性。方法:采用紫外-可见分光光度法,检测波长为288 nm。以磷酸盐缓冲液(pH4.5)、0.1 mol/L 盐酸溶液[加入0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)]、磷酸盐缓冲液(pH6.8, 加入0.5% SDS)、水为溶出介质,溶出介质体积为1 000 ml,转速为75 r/min,分别考察盐酸决奈达隆片仿制药与原研药的溶出度,并通过计算相似因子(f_2)来评价其溶出曲线的相似性。结果:盐酸决奈达隆检测质量浓度线性范围为2.147~25.764 $\mu\text{g/ml}$;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;4种溶出介质中的回收率分别为99.53%~101.05%(RSD=0.48%, $n=9$)、98.95%~100.05%(RSD=0.39%, $n=9$)、99.54%~100.20%(RSD=0.24%, $n=9$)、98.54%~100.06%(RSD=0.44%, $n=9$)。在4种溶出介质中,3批盐酸决奈达隆片仿制药与原研药溶出曲线的 f_2 分别为56、60、63、68、68、52、59、67、65、68、76、62。结论:该方法适用于盐酸决奈达隆片的溶出度测定;盐酸决奈达隆片仿制药与原研药的体外溶出曲线具有相似性,故其质量一致性较好。

关键词 盐酸决奈达隆片;原研药;仿制药;溶出曲线;相似因子;多介质;一致性评价

Consistency Evaluation of the Dissolution of Generic and Original Preparations of Dronedaron Hydrochloride Tablet

ZHAO Xin¹, CHEN Guohua¹, WU Qiongzhu¹, TENG Haitang², YU Tingting¹(1.School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2.Huaian Institute for Food and Drug Control, Jiangsu Huaian 223001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the dissolution determination of Dronedaron hydrochloride tablet, and evaluate the quality consistency of its generic and original preparations. METHODS: UV spectrometry was performed on the column of 288 nm, dissolution media of Phosphate buffer solution (pH4.5), 0.1 mol/L Hydrochloric acid solution [adding into 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)], Phosphate buffer solution [pH6.8, adding into 0.5% SDS] and water, volume of dissolution medium was 1 000 ml, rotation speed was 75 r/min, the dissolution of generic and original preparations of Dronedaron hydrochloride tablet was detected, and the similarity of dissolution curve was evaluated by calculating the similarity factor (f_2). RESULTS: The linear range of dronedaron hydrochloride was 2.147-25.764 $\mu\text{g/ml}$; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries 4 dissolution media were 99.53%-101.05% (RSD=0.48%, $n=9$), 98.95%-100.05% (RSD=0.39%, $n=9$), 99.54%-100.20% (RSD=0.24%, $n=9$) and 98.54%-100.06% (RSD=0.44%, $n=9$). In the 4 dissolution media, f_2 of the dissolution curve of 3 batches of generic and original preparations of Dronedaron hydrochloride tablet was 56, 60, 63, 68, 68, 52, 59, 67, 65, 68, 76, 62, respectively. CONCLUSIONS: The method is suitable for the dissolution determination of Dronedaron hydrochloride tablet; meanwhile, the *in vitro* dissolution curves of generic and original preparations of Dronedaron hydrochloride tablet show similarity, so the quality consistency is good.

KEYWORDS Dronedaron hydrochloride tablet; Original preparation; Generic preparation; Dissolution curve; Similarity factor; Various media; Consistency evaluation

盐酸决奈达隆(Dronedaron hydrochloride)是一种新型的抗心律失常药物,主要用于心房颤动、心房扑动、窦性心律、室性心律的治疗^[1-2],由法国赛诺菲-安万特公司研制,并分别于2009年7月和12月获得美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药品评价局(EMA)批准上市。其化学结构是苯并呋喃衍生物,与治疗房颤的胺碘酮药物相似,为钾离子通道阻滞药,但降低了其亲脂性还减小了碘源性的器官毒性^[3-4]。

溶出度系指药物从片剂或胶囊剂等固体制剂在规定溶剂

中溶出的速度和程度^[5],不仅是控制药物质量的体外指标,也是评价药物在体内释放和吸收的有效手段^[6]。仿制药与原研药质量的差异主要体现在体外溶出度和体内生物等效性上,这两方面都直接关系药品的等效性^[7]。目前国内发表的文献中,大多都是关于盐酸决奈达隆片在1种溶出介质中溶出曲线的测定及溶出方法的研究,美国药典(USP 39-NF 34)也只规定了其在磷酸盐缓冲液(pH4.5)中的溶出方法,而我国食品药品监督管理局(CFDA)评价口服固体制剂内在质量需要考察多种pH溶出介质中的溶出曲线。因此,本文参照盐酸决奈达隆片 USP 标准,建立其溶出度测定方法,考察盐酸决奈达隆片在4种不同溶出介质中的溶出行为,并与原研药进行溶出曲线的对比,采用FDA推荐的相似因子(f_2)对其进行相似性评价,

* 硕士研究生。研究方向:工业药学。E-mail: 814998462@qq.com

通信作者:副研究员,博士,硕士生导师。研究方向:新药开发。E-mail: cgh63@163.com

为盐酸决奈达隆仿制药的质量一致性评价工作提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-1800型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司); 8453型紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司); RC8MD 型溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司); BT-1250D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸决奈达隆片(中国药科大学药物制剂教研室自制, 编号: S1、S2、S3, 规格: 400 mg/片); 盐酸决奈达隆片原研药(法国 Sanofi-Aventis 公司, 批号: GJ092, 规格: 400 mg/片); 盐酸决奈达隆对照品(美国药典委员会, 批号: F029Q0, 纯度: 99.4%); 盐酸决奈达隆原料药(中国药科大学药物化学教研室自制, 编号: 150401, 纯度: 99.0%); 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取盐酸决奈达隆对照品约 21.3 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 加入 1 ml 甲醇使其溶解, 分别用 0.1 mol/L 盐酸溶液(加入 0.5% SDS)、磷酸盐缓冲液(pH4.5)、磷酸盐缓冲液(pH6.8, 加入 0.5% SDS)、水这 4 种溶出介质定容, 摇匀, 精密量取 1 ml, 置于 20 ml 量瓶中, 用相应的溶出介质定容, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取样品原研药(批号: GJ092)12 片, 取 0.1 mol/L 盐酸溶液(加入 0.5% SDS)、磷酸盐缓冲液(pH4.5)、磷酸盐缓冲液(pH6.8, 加入 0.5% SDS)、水 4 种溶出介质各 1 000 ml, 按溶出度测定法[2015 年版《中国药典》(四部)0931 通则第二法(浆法)]进行溶出度试验, 转速为 75 r/min, 温度为 37.0 ℃, 分别于 10、15、20、30、45、60、90、120 min 时取溶出液 10 ml, 并即时在溶出杯中补充 37 ℃溶出介质 10 ml, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 精密量取续滤液适量, 用甲醇稀释 20 倍, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2 4 种溶出介质的选择

目前, 盐酸决奈达隆已被收入 USP 标准, 其在 USP 标准中溶出度测定方法为浆法, 75 r/min, 标准溶出介质为 1 000 ml 的磷酸盐缓冲液(pH4.5)。本品规格为 400 mg/片且为异形片, 参考盐酸决奈达隆片 USP 标准和相关文献^[6], 故拟采用浆法和溶出体积 1 000 ml 进行溶出度试验。

由于盐酸决奈达隆为低溶解高渗透药物, 属于 BCS II 类, 其解离常数(pKa)为 9.8, 为弱碱性药物, 因此根据相关文献报道^[6-8], 推荐溶出介质为: 0.1 mol/L 盐酸溶液、磷酸盐缓冲液(pH6.8)、磷酸盐缓冲液(pH4.5)和水。在(37.0 ± 0.5)℃下, 用以上 4 种介质作为溶剂, 制备盐酸决奈达隆饱和溶液, 经适当稀释后, 用紫外-可见分光光度法在 288 nm 波长处测定其吸光度, 计算盐酸决奈达隆在 4 种介质中的溶解度, 进而考察是否达到漏槽条件, 结果见表 1。取样品原研药(批号: GJ092)适量, 分别采用上述 4 种溶出介质, 依法测定, 计算各时间点的累积溶出度并绘制溶出曲线, 详见图 1。

结合表 1 和图 1 可知, 样品原研药在磷酸盐缓冲液(pH4.5)和水中具有较好的溶解度, 均达到漏槽条件, 可以直接作为与仿制药进行溶出比较的溶出介质, 但在 0.1 mol/L 盐酸溶液和磷酸盐缓冲液(pH6.8)中溶出率很低, 无法区分各制剂的质量, 故需加入表面活性剂来提高溶出度。因此, 首先筛选吐温 80 和十二烷基硫酸钠(SDS)来确定表面活性剂的种

类, 然后再进行表面活性剂用量的筛选。

表 1 盐酸决奈达隆溶解度

溶出介质	溶解度, mg/ml	是否满足漏槽条件
0.1 mol/L 盐酸溶液(加入 0.5% SDS)	0.015	否
磷酸盐缓冲液(pH4.5)	1.935	是
水	1.226	是
磷酸盐缓冲液(pH6.8, 加入 0.5% SDS)	0.012	否

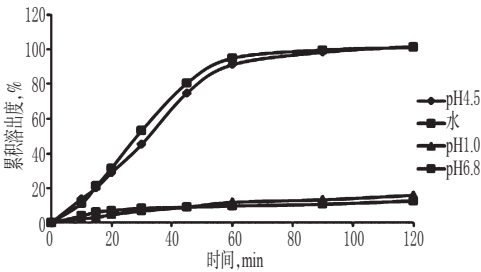


图 1 样品原研药在不同溶出介质中的溶出曲线

Fig 1 Dissolution curves of original preparation samples in different dissolution media

《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》中规定表面活性剂浓度推荐在 0.01%~1.0% (W/V) 范围, 故本试验选择中间浓度 0.5% 来筛选表面活性剂的种类。取样品原研药(批号: GJ092)适量, 分别采用加入 0.5% SDS 和 0.5% 吐温 80 的 0.1 mol/L 盐酸溶液作为溶出介质, 依法测定, 计算各时间点的累积溶出度并绘制溶出曲线。另取加入 0.5% SDS 和 0.5% 吐温 80 的磷酸盐缓冲液(pH6.8)同法进行测定, 详见图 2。

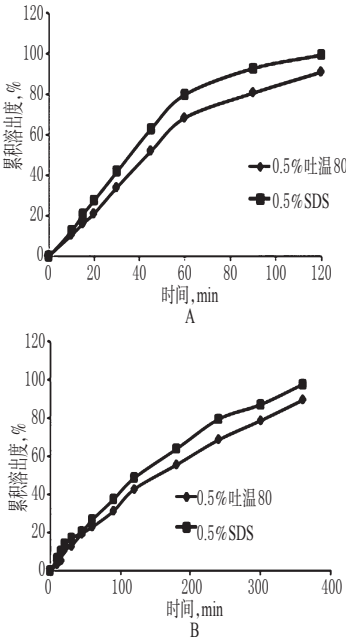


图 2 不同种类表面活性剂的溶出曲线

A. 0.1 mol/L 盐酸溶液; B. 磷酸盐缓冲液(pH6.8)

Fig 2 Dissolution curves of different kinds of surfactants
A. 0.1 mol/L Hydrochloric acid solution; B. Phosphate buffer solution (pH6.8)

由图 2 可知, 样品原研药在加入表面活性剂 SDS 介质中的溶出速率明显高于加入吐温 80 的介质, 而且吐温 80 为黏稠液体, 不宜操作, 加之易造成各样品间质量差异较大, 故选择加入表面活性剂 SDS。

表面活性剂 SDS 常规用量范围为 0.01%~1.0% (W/V), 故

用量筛选从低浓度到高浓度依次递增。取样品(编号:S1)适量,分别采用0.01%、0.05%、0.1%、0.3%、0.5%、1.0% SDS的0.1 mol/L 盐酸溶液和磷酸盐缓冲液(pH6.8)作为溶剂,进行溶解度测定,结果见表2。

表2 盐酸决奈达隆在不同浓度SDS介质中的溶解度(mg/ml)
Tab 2 The solubility of dronedarone hydrochloride in the different concentration of SDS(mg/ml)

溶出介质	0.01%SDS	0.05%SDS	0.1%SDS	0.3%SDS	0.5%SDS	1.0%SDS
0.1 mol/L 盐酸溶液	0.008 4	0.009 4	0.090 1	0.579 8	1.437 1	3.257 8
磷酸盐缓冲液(pH6.8)	0.002 1	0.004 2	0.083 1	0.346 1	1.326 2	2.995 3

由表2可知,加入0.5% SDS和1.0% SDS的2种介质均达到了漏槽条件,但1.0% SDS比0.5% SDS溶液的黏度大,且由于表面活性剂用量越少越好,故最终选择加入0.5% SDS。

综上所述,样品的4种溶出介质为:0.1 mol/L 盐酸溶液(加入0.5% SDS)、磷酸盐缓冲液(pH4.5)、磷酸盐缓冲液(pH6.8,加入0.5% SDS)和水。

2.3 线性关系考察

精密称取盐酸决奈达隆对照品(批号:F029Q0)适量,共4份,先用1 ml 甲醇溶解,再分别用0.1 mol/L 盐酸溶液(加入0.5% SDS)、磷酸盐缓冲液(pH4.5)、磷酸盐缓冲液(pH6.8,加入0.5% SDS)、水定容于50 ml 量瓶中,制备质量浓度为0.426 mg/ml 的对照品贮备液,然后精密移取上述贮备液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml,分别置于20 ml 量瓶中,并用相应的溶出介质定容,摇匀,按紫外-可见分光光度法在288 nm 波长处测定吸光度。以盐酸决奈达隆质量浓度(x,μg/ml)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表3。

表3 回归方程与线性范围

Tab 3 Regression equations and linear ranges

溶出介质	回归方程	r	线性范围,μg/ml
0.1 mol/L 盐酸溶液(加入0.5% SDS)	y=29.465x-0.023 0	0.999 0	2.147~25.764
磷酸盐缓冲液(pH4.5)	y=29.603x-0.010 7	0.999 3	
水	y=29.477x-0.019 8	0.999 2	
磷酸盐缓冲液(pH6.8,加入0.5% SDS)	y=29.121x-0.027 9	0.999 1	

2.4 精密度试验

取“2.1.1”项下对照品溶液适量,按紫外-可见分光光度法在288 nm 波长处重复测定6次。结果,盐酸决奈达隆吸光度的RSD分别为0.84%、0.36%、0.21%、0.62%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.1.2”项下4种介质中120 min时的供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时在288 nm 波长处测定其吸光度。结果,盐酸决奈达隆吸光度的RSD分别为0.78%、0.82%、0.70%、0.91%(n=5),表明供试品溶液在4种介质中室温下8 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取样品原研药(批号:GJ092)适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按紫外-可见分光光度法在288 nm 波长处测定其吸光度。结果,盐酸决奈达隆吸光度的RSD分别为0.98%、0.59%、0.71%、0.81%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.7 回收率试验

取样品原料药(编号:150401)约3.41、4.26、5.11 g(分别约为处方量的8、10、12倍),精密称定,分别置于3个研钵中,再分别加入空白辅料2.24 g(约为处方量的10倍),混匀;分别从3个研钵中精密称取细粉各3份,再分别置于50 ml 量瓶中,按

“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,取上述供试品溶液适量,按紫外-可见分光光度法在288 nm 波长处测定吸光度并计算回收率,结果见表4。

表4 回收率试验结果(n=9)

Tab 4 Results of recovery tests(n=9)

溶出介质	相当于处方量	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
磷酸盐缓冲液(pH4.5)	80%	17.08	17.00	99.53	100.04	0.48
		17.11	17.13	100.12		
		17.04	17.00	99.77		
		100%	21.22	21.30		
		21.31	21.29	99.91		
		21.87	22.10	101.05		
	120%	25.56	25.45	99.57		
		25.67	25.61	99.77		
		25.32	25.40	100.32		
0.1 mol/L 盐酸溶液(加入0.5% SDS)	80%	17.01	16.93	99.53	99.59	0.39
		17.21	17.03	98.95		
		17.00	16.89	99.35		
		100%	21.12	21.03		
		21.21	21.19	99.91		
		21.67	21.68	100.05		
	120%	25.45	25.23	99.14		
		25.59	25.60	100.04		
		25.41	25.35	99.76		
磷酸盐缓冲液(pH6.8,加入0.5% SDS)	80%	17.11	17.05	99.65	99.79	0.24
		17.24	17.22	99.88		
		17.16	17.09	99.59		
		100%	21.32	21.34		
		21.21	21.19	99.91		
		21.97	21.87	99.54		
	120%	25.86	25.75	99.57		
		25.57	25.62	100.20		
		25.42	25.33	99.65		
水	80%	17.34	17.27	99.60	99.44	0.44
		17.23	17.09	99.19		
		17.19	17.20	100.06		
		100%	22.09	21.90		
		21.91	21.59	98.54		
		21.77	21.66	99.49		
	120%	25.44	25.34	99.61		
		25.57	25.51	99.77		
		25.42	25.31	99.57		

2.8 溶出曲线的绘制

取3批样品(编号:S1、S2、S3)和1批原研药(批号:GJ092)各12片,取“2.2”项下4种溶出介质适量,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液[磷酸盐缓冲液(pH6.8,加入0.5% SDS)中,取样时间点延长至360 min];取上述供试品溶液和“2.1.1”项下对照品溶液各适量,按紫外-可见分光光度法在288 nm 波长下分别测定吸光度并计算各时间点的累积溶出度,绘制溶出曲线,详见图3。

2.9 溶出曲线相似性评价

以美国和日本规定采用的 f_2 法来评价仿制药与原研药体外溶出曲线的相似性,以考察制剂其内在质量的差异。 f_2 计算公式如下:

$$\sqrt{\frac{100}{n \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2}}$$

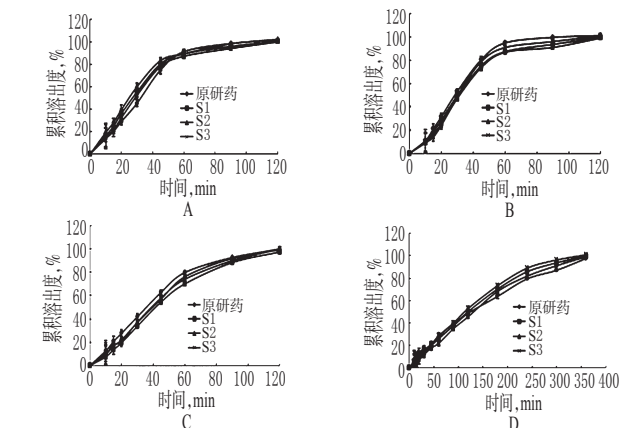


图3 盐酸决奈达隆仿制药与原研药在4种溶出介质中的溶出曲线

A.磷酸盐缓冲液(pH4.5);B.水;C.0.1 mol/L 盐酸溶液(加入0.5% SDS);D.磷酸盐缓冲液(pH6.8,加入0.5% SDS)

Fig 3 Dissolution curves of generic and original preparations of Dronedarone hydrochloride tablet in 4 dissolution media

A.Phosphate buffer solution (pH4.5);B.water; C.0.1 mol/L Hydrochloric acid solution (adding into 0.5% SDS); D.Phosphate buffer solution (pH6.8, adding into 0.5% SDS)

其中, n 为取样时间点个数; R_t 为原研药在 t 时刻的溶出度值; T_t 为仿制药在 t 时刻的溶出度值; f_2 取值在1~100之间。 f_2 值计算规定,原研药和仿制药在15 min内溶出达到85%时,不用再计算 f_2 值,可直接认为两种制剂溶出行为相似。一般情况下, $f_2 \geq 50$ 时,可认为两条曲线具有相似性,仿制药与原研药具有等效性^[9]。仿制药与原研药在不同溶出介质中的溶出曲线 f_2 测定结果见表5。由表5可知,样品仿制药与原研药在4种溶出介质中的溶出行为相似。

表5 4种溶出介质下的 f_2 相似因子

Tab 5 The f_2 factors in 4 dissolution media

溶出介质	S1	S2	S3
0.1 mol/L 盐酸溶液(加入0.5% SDS)	56	68	65
磷酸盐缓冲液(pH4.5)	60	52	68
水	63	59	76
磷酸盐缓冲液(pH6.8,加入0.5% SDS)	68	67	62

3 讨论

3.1 波长的选择

盐酸决奈达隆在溶出介质中的最大紫外吸收分别为210 nm和288 nm波长,由于在288 nm波长处辅料无吸收,干扰小,因此本试验选择288 nm作为溶出度检测波长。

3.2 转速的选择

浆法常用的转速为50、75 r/min^[10]。为了确定最佳转速,本试验需对比盐酸决奈达隆片在这两种转速条件下的溶出曲线。结果表明,在两种转速条件下盐酸决奈达隆片的溶出行为基本一致,而在75 r/min条件下,样品的溶出速率高于50 r/min条件下的溶出速率;且同时参考盐酸决奈达隆片 USP 标准中溶出度测定方法,故本试验溶出度试验的转速选择75 r/min。

3.3 仿制药与原研药的质量一致性

在多种pH溶出介质中溶出曲线的测定是先进国家药物审评机构评价口服固体制剂内在质量的一种重要手段^[9],我国也于2012年开始实施“仿制药质量一致性评价”工程^[11]。考察

多种溶出介质条件下溶出行为,可以更全面、真实反映药物的体外释药情况和内在质量^[12]。本试验以3个编号的盐酸决奈达隆片仿制药与1个批号的原研药分别在4种溶出介质中进行溶出度试验并绘制溶出曲线。结果发现,两种制剂在4种溶出介质中的溶出曲线均具有相似性,说明盐酸决奈达隆片仿制药与原研药质量一致性较好。

3.4 表面活性剂的筛选

通过溶解度试验和盐酸决奈达隆原研药在4种溶出介质中溶出曲线的测定,可知盐酸决奈达隆在0.1 mol/L 盐酸溶液、磷酸盐缓冲液(pH6.8)的溶解性不好,需通过加入表面活性剂改善其溶解性。本试验先筛选表面活性剂的种类,确定使用SDS;再筛选SDS的用量,最终确定分别在0.1 mol/L 盐酸溶液、磷酸盐缓冲液(pH6.8)中加入0.5% SDS,由此可提高盐酸决奈达隆在这两种介质中的溶解度,使之溶出曲线具有可比性。另外,在pH6.8的磷酸盐介质中,加入0.5% SDS后,2 h的溶出率仍低于50%,溶出曲线无区分度,结合现有文献报道^[13],故本试验将取样时间点延长至360 min,使溶出曲线能更好的区分。因此,本试验选择0.5% SDS为表面活性剂。

综上所述,本方法适用于盐酸决奈达隆片的溶出度测定;盐酸决奈达隆片仿制药与原研药的体外溶出曲线具有相似性,故其质量一致性较好。

参考文献

- [1] 李峰,田拴红,宋晓峰,等.盐酸决奈达隆合成新工艺[J]. 高等学校化学学报,2013,34(4):858.
- [2] 邓万俊.治疗心房颤动新药决奈达隆[J].中国新药与临床杂志,2010,29(1):5.
- [3] 贺鹏康,周菁.抗心律失常新药决奈达隆[J].临床药物治疗杂志,2010,8(2):58.
- [4] 孟祥业,金仲品.决奈达隆的药动力学及临床研究概况[J].当代医学,2010,16(33):32.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:121.
- [6] 张启明,谢沐风,宁保明,等.采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J].中国医药工业杂志,2009,40(12):946.
- [7] 夏锦辉,刘昌孝.固体药物制剂的体外溶出度的统计学评价分析[J].中国药学杂志,2000,35(2):130.
- [8] 谢沐风.如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J].中国医药工业杂志,2012,43(3):243.
- [9] 张艳侠,袁转梅,陈育育.阿利苯多片溶出度方法的建立及溶出曲线的比较[J].西北药学杂志,2014(5):508.
- [10] 王亚敏.浅谈溶出度检查方法的研究[J].药物分析杂志,2007(10):1667.
- [11] 孙婷,姜建国,宋更申,等.国内外不同厂家马来酸依那普利片在4种溶出介质中溶出曲线的比较[J].中国药房,2014,25(32):3053.
- [12] 陈加飞,王平,赵昕,等.国产与原研洛索洛芬钠片的体外溶出曲线一致性的比较[J].国际检验医学杂志,2015,36(2):198.
- [13] 谢沐风.溶出曲线相似性的评价方法[J].中国医药工业杂志,2009,40(4):308.

(收稿日期:2016-03-09 修回日期:2016-07-16)

(编辑:刘 柳)

UPLC法同时测定清喉利咽颗粒中5种成分的含量

牛小花*,陈洪源#,段玉平,黄 娇(重庆三峡医药高等专科学校药学系,重庆 404100)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4282-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.34

摘要 目的:建立同时测定清喉利咽颗粒中没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为0.40 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为1 μl。结果:没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷检测进样量线性范围分别为0.048~0.480 μg($r=0.999\ 3$)、0.012~0.120 μg($r=0.999\ 9$)、0.016~0.160 μg($r=0.999\ 8$)、0.022~0.220 μg($r=0.999\ 9$)、0.072~0.720 μg($r=0.999\ 2$);定量限分别2.4、1.6、1.8、1.8、1.6 ng,检测限分别为7.5、5.0、5.6、5.6、5.0 ng;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为96.64%~102.02%(RSD=2.00%, $n=6$)、95.86%~102.56%(RSD=2.86%, $n=6$)、97.24%~102.54%(RSD=2.10%, $n=6$)、97.44%~102.60%(RSD=2.40%, $n=6$)、96.91%~103.13%(RSD=2.62%, $n=6$)。结论:该方法快速、准确,可用于同时测定清喉利咽颗粒中没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷的含量。

关键词 超高效液相色谱法;清喉利咽颗粒;没食子酸;橙皮苷;新橙皮苷;柚皮苷;黄芩苷

Contents Determination of Five Components in Qinghou Liyan Granule by UPLC

NIU Xiaohua, CHEN Hongyuan, DUAN Yuping, HUANG Jiao (Dept. of Pharmacy, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of gallic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin and baicalin in Qinghou liyan granule. METHODS: UPLC was performed on the column of ACQUITY UPLC BEH C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 0.40 ml/min, detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 1 μl. RESULTS: The linear range was 0.048-0.480 μg for gallic acid ($r=0.999\ 3$), 0.012-0.120 μg for naringin ($r=0.999\ 9$), 0.016-0.160 μg for hesperidin ($r=0.999\ 8$), 0.022-0.220 μg for neohesperidin ($r=0.999\ 9$) and 0.072-0.720 μg for baicalin ($r=0.999\ 2$); limit of quantitation was 2.4, 1.6, 1.8, 1.8, 1.6 ng, limit of detection was 7.5, 5.0, 5.6, 5.6, 5.0 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no lower than 3.0%; recoveries were 96.64%-102.02% (RSD=2.00%, $n=6$), 95.86%-102.56% (RSD=2.86%, $n=6$), 97.24%-102.54% (RSD=2.10%, $n=6$), 97.44%-102.60% (RSD=2.40%, $n=6$) and 96.91%-103.13% (RSD=2.62%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is rapid and accurate, and can be used for the simultaneous determination of gallic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin and baicalin in Qinghou liyan granule.

KEYWORDS UPLC; Qinghou liyan granule; Gallic acid; Naringin; Hesperidin; Neohesperidin; Baicalin

清喉利咽颗粒是由黄芩、西青果、桔梗、竹茹、胖大海、橘红、枳壳等13味中药材组成,具有清热利咽、宽胸润喉的功效;常用于治疗外感风热所致的咽喉发干、声音嘶哑、急慢性咽喉炎、扁桃体炎等症,常用有保护声带的作用。清喉利咽颗粒收载于2015年版《中国药典》(一部)^[1]以及《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》(第17册)^[2]中,均仅将黄芩苷作为其质量控制指标,不能有效控制清喉利咽颗粒的质量;同时,超高效液相色谱法(UPLC)相比传统高效液相色谱法(HPLC)具有柱效高、分析时间短等优点^[3-4]。为更好地控制该制剂的质量,笔者采用UPLC法建立了同时测定清喉利咽颗粒中黄芩苷、没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-CLASS 型UPLC仪,包括QSM四元溶剂管理器、PDA eλ二极管阵列检测器、SM-FTN样品管理器、

CH-A型柱温箱、Empower3色谱工作站(美国Waters公司);BP211D型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ-100DE型超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz);DISCOVER-III/IV型实验室专用超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

清喉利咽颗粒(桂龙药业有限公司,批号:141206、141218、150124、150128、150425、150508、150515、150810,规格:5 g/袋);没食子酸对照品(上海金穗生物科技有限公司,批号:20140412,纯度≥98.0%);柚皮苷对照品(批号: MUST-12030914,纯度≥98.0%);橙皮苷对照品(批号: MUST-11030701,纯度>98.0%);新橙皮苷对照品(批号: MUST-12040812,纯度≥98.0%);黄芩苷对照品(批号: MUST-12040812,纯度≥98.0%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈、磷酸均为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0 min, 10%

* 讲师,硕士。研究方向:中药提取纯化。电话:023-58567305。
E-mail: Xiaohua_206@163.com

通信作者:讲师,硕士。研究方向:中药化学成分分析。电话:023-58556066。E-mail: Chyuan123@163.com

A;8 min,40% A);流速:0.40 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:1 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷对照品适量,置于同一50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成每1 ml含没食子酸240 μg、柚皮苷60 μg、橙皮苷80 μg、新橙皮苷110 μg、黄芩苷360 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品约0.5 g,精密称定,置于25 ml量瓶中,加甲醇20 ml,超声处理30 min,放冷后加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例制备缺西青果、黄芩、橘红、枳壳的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以黄芩苷峰计≥20 000,保留时间为7.154 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

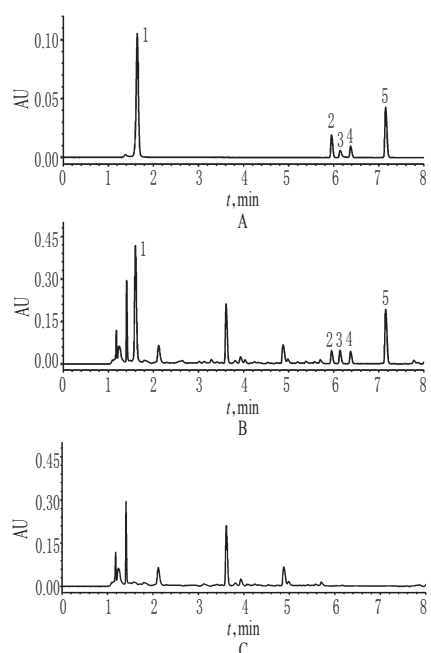


图1 超高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.没食子酸;2.柚皮苷;3.橙皮苷;4.新橙皮苷;5.黄芩苷

Fig 1 UPLC chromatograms

A.mixed reference substance;B.test sample;C. negative control;1.gallic acid; 2.naringin; 3.hesperidin; 4.neohesperidin; 5.baicalin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得系列线性溶液,取上述溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x,μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按

“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD),结果见表2。

表1 回归方程与线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
没食子酸	y=6 133.71x-101 239.54	0.999 3	0.048~0.480
柚皮苷	y=5 225.90x+1 755.64	0.999 9	0.012~0.120
橙皮苷	y=2 644.86x+46.25	0.999 8	0.016~0.160
新橙皮苷	y=2 615.13x-718.92	0.999 9	0.022~0.220
黄芩苷	y=4 255.60x+4 977.36	0.999 2	0.072~0.720

表2 定量限与检测限测定结果

Tab 2 Determination results of quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ,ng	LOD,ng
没食子酸	2.4	7.5
柚皮苷	1.6	5.0
橙皮苷	1.8	5.6
新橙皮苷	1.8	5.6
黄芩苷	1.6	5.0

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为1.81%、1.16%、1.34%、1.08%、1.50%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为2.05%、1.54%、2.07%、1.80%、1.66%(n=6),表明供试品溶液在室温下24 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

取样品(批号:141206)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果,没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的平均含量分别为11.22、2.89、2.93、2.88、7.39 mg/g,RSD分别为2.01%、1.68%、1.94%、2.08%、2.20%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:141206)适量,共6份,每份约0.25 g,精密称定,分别置于25 ml量瓶中,加入一定质量的没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.10 样品含量测定

取8批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷的含量,结果见表4。

3 讨论

3.1 流动相的选择

本试验考察了甲醇-水、乙腈-水以及不同浓度乙腈-磷酸作为流动相对5种成分分离度的影响。结果,乙腈-0.1%磷

酸作为流动相时,5种成分分离效果最佳,峰型较好。因此,本试验选择乙腈-0.1%磷酸作为流动相。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Result of the recovery tests(n=6)							
待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
没食子酸	0.250 3	2.808 4	2.456 0	5.204 6	97.87	98.29	2.00
	0.250 8	2.814 0	2.456 0	5.326 8	102.02		
	0.250 0	2.805 0	2.456 0	5.220 4	98.55		
	0.249 8	2.802 8	2.456 0	5.164 5	96.64		
	0.250 8	2.814 0	2.456 0	5.181 2	96.84		
	0.250 1	2.806 1	2.456 0	5.200 1	97.79		
柚皮苷	0.250 3	0.723 4	0.702 0	1.421 5	99.46	99.70	2.86
	0.250 8	0.724 8	0.702 0	1.396 8	95.86		
	0.250 0	0.722 5	0.702 0	1.443 0	102.56		
	0.249 8	0.721 9	0.702 0	1.441 2	102.40		
	0.250 8	0.724 8	0.702 0	1.403 6	96.80		
	0.250 1	0.722 8	0.702 0	1.432 8	101.11		
橙皮苷	0.250 3	0.733 4	0.730 2	1.482 2	102.54	99.59	2.10
	0.250 8	0.734 8	0.730 2	1.445 1	97.29		
	0.250 0	0.732 5	0.730 2	1.442 5	97.24		
	0.249 8	0.731 9	0.730 2	1.459 7	99.67		
	0.250 8	0.734 8	0.730 2	1.462 4	99.65		
	0.250 1	0.732 8	0.730 2	1.471 2	101.12		
新橙皮苷	0.250 3	0.720 9	0.705 4	1.442 6	102.26	99.97	2.40
	0.250 8	0.722 3	0.705 4	1.416 4	98.44		
	0.250 0	0.720 0	0.705 4	1.436 2	101.50		
	0.249 8	0.719 4	0.705 4	1.443 5	102.60		
	0.250 8	0.722 3	0.705 4	1.409 2	97.44		
	0.250 1	0.720 3	0.705 4	1.408 4	97.60		
黄芩苷	0.250 3	1.849 7	1.886 4	3.678 9	96.91	98.82	2.62
	0.250 8	1.853 4	1.886 4	3.692 1	97.43		
	0.250 0	1.847 5	1.886 4	3.751 0	100.93		
	0.249 8	1.846 0	1.886 4	3.680 4	97.18		
	0.250 8	1.853 4	1.886 4	3.690 1	97.32		
	0.250 1	1.848 2	1.886 4	3.792 5	103.13		

表4 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 4 Results of contents determination of sample (n=3, mg/g)					
样品批号	没食子酸	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	黄芩苷
141206	11.54	2.70	2.80	2.58	7.08
141218	10.54	2.56	2.68	2.80	6.84
150124	11.22	2.89	2.93	2.88	7.39
150128	11.40	2.75	2.76	2.50	7.45
150425	10.81	2.62	2.71	2.64	7.16
150508	10.06	3.08	2.83	2.76	6.72
150515	10.42	2.80	2.78	2.65	7.08
150810	10.85	2.95	2.68	2.71	6.85

3.2 检测波长的选择

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,在210~400 nm波长范围内进行全波长扫描。结果显示,没食子酸的最大吸收峰为271 nm,柚皮苷的最大吸收峰为283 nm,橙皮苷的最大吸收峰为284 nm,新橙皮苷的最大吸收峰为284 nm,黄芩苷的最大吸收峰为277 nm,这5种待测成分在280 nm附近均有最大吸收,故本试验选择280 nm为检测波长。

3.3 阴性样品的制备

清喉利咽颗粒中黄芩含黄芩苷^[5-6],西青果含没食子酸^[7],橘红含柚皮苷^[8-9],枳壳含橙皮苷和新橙皮苷^[10-11],故阴性样品

为缺此四者的样品。

3.4 待测成分的选择

查阅相关文献^[12-13],已有关于清喉利咽颗粒中黄芩苷、橙皮苷等含量测定的报道,但尚未见没食子酸含量测定的报道。没食子酸是西青果的主要质量控制指标,西青果作为清喉利咽颗粒中的主要药材,有必要将其列为考察指标;亦未见同时测定橘红主成分(即柚皮苷)、枳壳主成分(即橙皮苷和新橙皮苷)、黄芩主成分(即黄芩苷)含量的报道。因此本试验将没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、黄芩苷列为待测成分。

综上所述,本方法快速、准确,可用于同时测定清喉利咽颗粒中没食子酸、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和黄芩苷的含量。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1 562.

[2] 卫生部药典委员会.卫生部药品标准中药成方制剂:17册[S].北京:人民卫生出版社,1998:245.

[3] 单玲玲,靳光乾,刘善新.UPLC、RRLC及UFLC在中药质量控制中的研究进展[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2 340.

[4] 赵明霞,胡基埂,吴方千,等.超高压液相色谱系统的研究进展[J].分析试验室,2009,28(S2):137.

[5] 薛黎明,秦雪梅,张丽增.不同产地黄芩药材的黄芩苷含量测定及指纹图谱研究[J].中成药,2008,30(1):10.

[6] 刘金欣,孟繁蕴,张胜海,等.UPLC同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A[J].中草药,2014,45(10):1 477.

[7] 赵建平.西青果中没食子酸的含量测定[J].广西中医学院学报,2003,6(4):53.

[8] 蔡晔芬.HPLC法测定橘红枇杷颗粒中柚皮苷的含量[J].中国药房,2011,22(19):1 798.

[9] 刘晓涵,陈永刚,林励,等.化橘红中柚皮苷和野漆树苷含量同时测定方法的建立[J].中药新药与临床药理,2010,21(6):640.

[10] 张宏武,封宇飞,邹忠梅.高效液相色谱法同时测定枳壳饮片中4种黄酮类化合物的含量[J].中国新药杂志,2008,17(18):1 600.

[11] 林宗涛,陈世忠,王弘.HPLC法测定枳壳中6个二氢黄酮类成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(2):201.

[12] 林冬杰.HPLC法测定清喉利咽颗粒中柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷的含量[J].亚太传统医药,2010,6(7):25.

[13] 陈江涛,林冬杰.HPLC法测定清喉利咽颗粒中柚皮苷、橙皮苷的含量[J].中国药师,2010,13(9):1 275.

(收稿日期:2015-11-01 修回日期:2016-07-29)

(编辑:刘 柳)

复方宁神颗粒的质量标准研究

黄 阳^{1*},臧文怡²,毛春芹^{2#},陆兔林²,周亚萍²(1.昆山市中医医院,江苏 昆山 215300;2.南京中医药大学药学院,南京 210023)

中图分类号 R917;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4285-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.35

摘 要 目的:建立复方宁神颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中当归和白芍进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中斯皮诺素和毛蕊花糖苷的含量:色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为乙腈-0.1%乙酸溶液(16:84, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为330 nm,柱温为30 ℃。结果:当归和白芍的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。斯皮诺素和毛蕊花糖苷检测进样量线性范围分别为0.055 44~0.277 2 μg($r=0.999\ 4$)、0.055 98~0.279 9 μg($r=0.999\ 5$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为95.62%~100.53%(RSD=1.77%, $n=9$)、95.63%~102.57%(RSD=2.74%, $n=9$)。结论:该研究所建标准可用于复方宁神颗粒的质量控制。
关键词 复方宁神颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;斯皮诺素;毛蕊花糖苷;质量标准

Study on the Quality Standard for Fufang Ningshen Granule

HUANG Yang¹, ZANG Wenyi², MAO Chunqin², LU Tulin², ZHOU Yaping²(1.Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Jiangsu Kunshan 215300, China; 2.College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standards for Fufang ningshen granule. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of *Radix angelicae* and *White paenoy*; HPLC was adopted for the contents determination of spinosin and verbascoside: the column was Kromasil C₁₈ with the mobile phase of acetonitrile-0.1% acetic acid (16:84, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 330 nm, column temperature was 30 ℃. RESULTS: The TLC spots of *R. angelicae* and *W. paenoy* were clear with good separation, negative control without interference. The linear range was 0.055 44-0.277 2 μg for spinosin ($r=0.999\ 4$) and 0.055 98-0.279 9 μg for verbascoside ($r=0.999\ 5$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.0%; recoveries were 95.62%-100.53% (RSD=1.77%, $n=9$) and 95.63%-102.57% (RSD=2.74%, $n=9$). CONCLUSIONS: The standard can be used for the quality control of Fufang ningshen granule.
KEYWORDS Fufang ningshen granule; TLC; HPLC; Spinosin; Verbascoside; Quality standard

复方宁神颗粒系根据临床有效经验方研制而成的中药新制剂,处方由酸枣仁、熟地黄、当归、白芍4味中药材组成,具有安神补血、滋阴补肾的功效,临床主要用于肝肾阴虚所致的头昏、耳鸣、心悸、失眠等症的治疗。方中酸枣仁具有镇静催眠、抗焦虑等药理作用,现代研究表明,酸枣仁中的黄酮类化合物斯皮诺素是酸枣仁镇静催眠的主要有效成分^[1-2]。熟地黄具有促进红细胞新生的作用,可以改善血虚所致的机体功能低下,而毛蕊花糖苷是熟地黄的主要有效成分,对造血干细胞具有促进增殖、分化作用,可显著改善造血功能^[3]。芍药苷是白芍的主要有效成分,相关研究显示,芍药苷具有抗血小板聚集、降低血液黏度、扩张血管等多种药理作用,可改善血液循环。当归可补血活血、调经止痛,其含有的挥发油、有机酸等成分主要通过刺激与造血相关的细胞、分子等来改善造血系统。为有效控制复方宁神颗粒的质量,本研究采用薄层色谱(TLC)对方中当归、白芍进行TLC鉴别,采用高效液相色谱法(HPLC)同时对方中有效成分斯皮诺素和毛蕊花糖苷进行定量分析,以期建立复方宁神颗粒质量标准提供依据。

* 副主任中药师。研究方向:中药制剂。E-mail: 15962512022@163.com
通信作者:高级实验师。研究方向:中药制剂。电话:025-85811835。E-mail: mcq63@163.com

1 材料

1.1 仪器

DGU-20A型HPLC仪,包括SPD-M20A检测器(日本Shimadzu公司);Milli-Q Integral型水纯化系统(美国Millipore公司);JY02S型紫外分析仪(武汉爱斯佩科学仪器有限公司);TYHD-60W型超声波清洗器(北京天佑恒达科技有限公司,功率:250 W,频率:33 kHz)。

1.2 药品与试剂

复方凝神颗粒(南京市中医院自制,批号:140901、140902、140903,规格:6 g/袋);斯皮诺素对照品(批号:111869-201203,纯度:98%)、毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-201310,纯度:93.3%)、当归对照药材(批号:120927-201516)、白芍对照药材(批号:120905-201109)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 当归 取本品5 g,加乙醚30 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇1 ml溶解,作为供试品溶液^[4-5]。另精密称取当归对照药材0.5 g,按供试品溶液制备方法制备对

照药材溶液。按复方凝神颗粒处方和制备工艺制备缺当归的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图1。

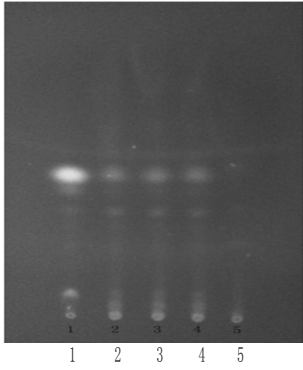


图1 当归的薄层色谱图

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Angelica sinensis*

1.control medicinal herb; 2-4.test samples; 5.negative control

2.1.2 白芍 取本品5 g,加乙醇50 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml溶解,加入20 ml水饱和正丁醇充分萃取,分层后收集正丁醇液,备用;再次加入20 ml水饱和正丁醇充分萃取,合并2次正丁醇液,加入50 ml氨试液振摇洗涤,分层后将氨液弃去,正丁醇液减压回收近干,加入乙醇1 ml复溶,作为供试品溶液^[7-8]。另精密称取白芍对照药材0.5 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按复方凝神颗粒的处方和制备工艺制备缺白芍的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[6]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,于105℃加热显色至斑点清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图2。

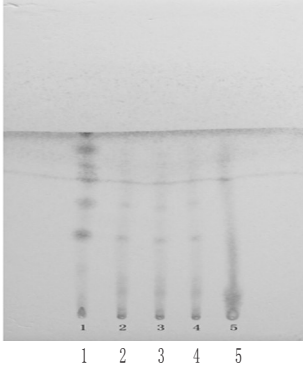


图2 白芍的薄层色谱图

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 2 TLC chromatograms of *Paeonia lactiflora*

1.control medicinal herb; 2-4.test samples; 5.negative control

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%乙酸溶液(16:84,

V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:330 nm;柱温:30℃。在上述色谱条件下,理论板数以斯皮诺素和毛蕊花糖苷计≥3 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图3。

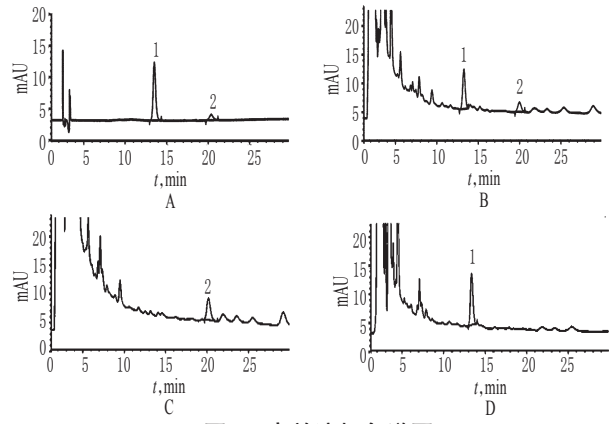


图3 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺酸枣仁的阴性对照;D.缺熟地黄的阴性对照;1.斯皮诺素;2.毛蕊花糖苷

Fig 3 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C. negative control without *Ziziphus jujube*; D. negative control without *Rehmanniae Radix Praeparata*; 1.spinosin; 2.verbascoside

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取斯皮诺素对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,得斯皮诺素质量浓度为0.98 mg/ml的对照品贮备液。取毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加流动相溶解,得毛蕊花糖苷质量浓度为1.04 mg/ml的对照品贮备液。分别取上述斯皮诺素、毛蕊花糖苷对照品贮备液适量,置于同一5 ml量瓶中,加80%甲醇定容,得到斯皮诺素和毛蕊花糖苷质量浓度分别为27.72、27.99 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,称取5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加80%甲醇80 ml,密塞,称定质量,超声处理40 min,取出放冷,再次称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按复方凝神颗粒处方和制备工艺分别制备缺酸枣仁、熟地黄的单一阴性样品,并按“2.2.3”项下方法分别制成缺酸枣仁、熟地黄的单一阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以斯皮诺素和毛蕊花糖苷进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得斯皮诺素和毛蕊花糖苷回归方程分别为 $y=2\,352\,704.25x-2\,801.30$ ($r=0.999\,4$)、 $y=1\,416\,279.37x-6\,117.00$ ($r=0.999\,5$)。结果表明,斯皮诺素和毛蕊花糖苷检测进样量线性范围分别为0.055 44~0.277 2、0.055 98~0.279 9 μg。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,斯皮诺素和毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为1.04%、1.26% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:140902)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,斯皮诺素和毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为2.31%、1.49% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:140902)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,斯皮诺素和毛蕊花糖苷的含量平均值分别为0.066 98、0.042 37 mg/g,RSD分别为2.65%、2.11%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:140902)适量,共6份,每份2.5 g,分别加入低、中、高质量的斯皮诺素和毛蕊花糖苷对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
斯皮诺素	0.167 1	0.133 3	0.298 5	98.57	97.92	1.77
	0.167 6	0.133 3	0.301 6	100.53		
	0.167 9	0.133 3	0.299 8	98.95		
	0.167 8	0.166 6	0.334 2	99.88		
	0.167 6	0.166 6	0.326 9	95.62		
	0.168 0	0.166 6	0.329 3	96.82		
	0.167 3	0.200 0	0.358 6	95.65		
	0.167 6	0.200 0	0.363 1	97.75		
	0.167 3	0.200 0	0.362 4	97.55		
毛蕊花糖苷	0.105 7	0.084 2	0.188 9	98.81	98.81	2.74
	0.106 0	0.084 2	0.190 6	100.47		
	0.106 2	0.084 2	0.187 2	96.20		
	0.106 1	0.105 3	0.214 1	102.57		
	0.106 0	0.105 3	0.206 7	95.63		
	0.106 3	0.105 3	0.208 9	97.44		
	0.105 8	0.126 3	0.234 8	102.13		
	0.106 0	0.126 3	0.226 9	95.72		
	0.105 8	0.126 3	0.232 5	100.32		

2.2.10 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)
Tab 2 Results of contents determination of samples(n=3)

样品批号	斯皮诺素		毛蕊花糖苷	
	含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%
140901	0.068 42	1.89	0.039 51	2.03
140902	0.066 98	2.65	0.042 37	2.11
140903	0.063 26	2.54	0.041 48	1.73

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

根据方中活性成分的极性,试验中首先考察以甲醇和水作为提取溶剂,超声提取40 min。结果发现,水提取时杂质较多,干扰较为严重;再对比采用60%、80%、100%甲醇分别作为提取溶剂,发现80%甲醇对各成分的提取率相对高于其他体积分数的甲醇,且在该条件下各成分均能达到有效分离。因此,本试验最终采用80%甲醇作为提取溶剂。

3.2 检测波长的选择

斯皮诺素和毛蕊花糖苷的最大吸收波长分别为334、335 nm,本试验中设定检测波长为334 nm,即可满足斯皮诺素和毛

蕊花糖苷含量测定的要求,保证测定结果的准确性。

3.3 流动相的选择

参考文献[9-10],本试验考察了乙腈-乙酸溶液、乙腈-磷酸溶液、乙腈-水以不同比例作为流动相的结果。结果显示,当用乙腈-水为流动相时,待测成分峰形较差;采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相时,在334 nm波长处对基线干扰较大;采用乙腈-0.1%乙酸溶液作为流动相时各成分峰形良好,分离度均>1.5,故最终确定以乙腈-0.1%乙酸溶液为本试验的流动相。

中药复方成分复杂,作用广泛^[11-14]。本试验采用TLC法对方中当归和白芍进行了定性鉴别,分离效果良好;采用HPLC法同时对复方宁神颗粒中斯皮诺素和毛蕊花糖苷进行了定量分析。

综上所述,本文所建质量标准可用于复方宁神颗粒的质量控制。

(感谢南京市中医院提供复方宁神颗粒!)

参考文献

[1] 谭云龙,孙晖,孙文军,等.酸枣仁化学成分及其药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2014,25(1):186.
[2] 闫艳,杜晨晖,李小菊,等.HPLC-DAD-ELSD法同时测定酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷A和B的含量[J].药物分析杂志,2011,31(1):30.
[3] 朱妍,徐畅.熟地黄活性成分药理作用研究进展[J].亚太传统药,2011,7(11):173.
[4] 谢仲德,方应权,李文烈,等.当归调经胶囊的薄层鉴别与阿魏酸、芍药苷的测定[J].中成药,2013,35(2):427.
[5] 张晓杭,袁乐,李媛媛,等.真元颗粒质量标准研究[J].中药材,2014,37(8):1478.
[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57.
[7] 何锦钧,黄健,陈淑映,等.固宝片质量标准研究[J].中药材,2013,36(4):668.
[8] 谭建宁,杜成智,黄秋洁,等.复方龙胆胶囊质量控制[J].中国医院药学杂志,2014,34(1):18.
[9] 解军波,刘艳,张彦青,等.HPLC法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素[J].中草药,2010,41(10):1653.
[10] 林林,刘广桢,尹宁宁.HPLC法测定金匱肾气丸中马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷和丹皮酚[J].中成药,2012,34(11):2137.
[11] 巩伟,孙旭,赵庆华,等.板蓝根配方颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2015,26(18):2541.
[12] 潘莹.HPLC法同时测定通脉颗粒中丹参素、阿魏酸和葛根素的含量[J].中国药房,2011,22(4):376.
[13] 何慧,尹宁宁,郭东晓.复方阿胶颗粒质量标准研究[J].中成药,2013,35(10):2182.
[14] 张彦东,卢莹莹,郑晓英,等.罗汉果配方颗粒质量标准研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(5):695.

(收稿日期:2015-12-03 修回日期:2016-05-27)
(编辑:张 静)

紫肉甘薯药材的质量标准研究

王路平^{1*},王文成²,田 荣³,姜启晓²,王春波²,隋忠国^{1#}(1.青岛大学附属医院药学部,山东 青岛 266003;2.青岛大学医学部,山东 青岛 266071;3.复旦大学药学院,上海 200433)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4288-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.36

摘要 目的:建立紫肉甘薯的质量标准。方法:检测药材的显微特征;采用薄层色谱法(TLC)对药材进行定性鉴别;测定药材水分、灰分、重金属和浸出物量;采用高效液相色谱法测定药材中氯化矢车菊素的含量;色谱柱为 Alltima C₁₈,流动相为乙腈-0.1%三氟乙酸溶液(80:20,V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为538 nm,柱温为30℃。结果:药材粉末显微鉴别图谱清晰。紫肉甘薯的TLC图斑点清晰,分离良好。药材水分为8.5%~11.0%,总灰分为2.0%~2.9%,铅含量<5 ppm,浸出物为15.6%~22.3%。氯化矢车菊素检测进样量线性范围为0.043~0.215 μg($r=0.999\ 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为95.50%~99.65%(RSD=1.35%, $n=9$)。结论:该研究所建标准可用于紫肉甘薯的质量控制。
关键词 紫肉甘薯;氯化矢车菊素;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

Study on the Quality Standard of *Solanum tuberosm*

WANG Luping¹, WANG Wencheng², TIAN Rong³, JIANG Qixiao², WANG Chunbo², SUI Zhongguo¹ (1.Dept. of Pharmacy, Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China; 2.Medical College of Qingdao University, Shandong Qingdao 266071, China; 3.School of pharmacy, Fudan University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for *Solanum tuberosm*. METHODS: The microscopic characteristics were detected; TLC was used for qualitative identification; moisture, ash, heavy metals and the amount of extract were determined; HPLC was conducted for content determination of oxidized cyanidin: the column was Alltima C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid (80:20, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 538 nm, column temperature was 30℃. RESULTS: It showed clear microscopic identification map. *S. tuberosm* TLC had clear spots and well separated. The water content was 8.5%-11.0%; total ash was 2.0%-2.9%; Pb was lower than 5 ppm and alcohol-soluble extracts was 15.6%-22.3%. The linear range of oxidized cyanidin was 0.043-0.215 μg ($r=0.999\ 8$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 95.50%-99.65% (RSD=1.35%, $n=9$). CONCLUSIONS: The established method can be used for the quality control of *S. tuberosm*.
KEYWORDS *Solanum tuberosm*; Oxidized cyaniding; TLC; HPLC; Quality standard

紫肉甘薯 *Solanum tuberosm* 为栽培甘薯中一个特殊的品种类型,其块根中富含具有显著生理活性的花青素,因而呈现深紫色^[1],又名紫甘薯、紫心甘薯。甘薯 *Ipomoea batatas* (L.) Lam 为旋花科甘薯属蔓生性草本植物,性甘、平,无毒;归脾、肾经;能补中和血、益气生津。由于近年来对紫肉甘薯的药用价值不断深入研究,其在临床应用和新药研发领域获得了广阔的发展空间。为了保证药材和制剂的质量稳定和安全有效,笔者首次根据2015年版《中国药典》(四部)对紫肉甘薯药材进行了质量标准的研究。

1 材料

1.1 仪器

2695型高效液相色谱(HPLC)仪,包括2487紫外检测器、717自动进样器(美国 Waters 公司);色谱工作站(美国 Allchrom 公司);AE240型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);SB3200型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);YOKO-ZS型薄层数码成像仪(武汉药科新技术开发有限公司)。

* 主管药师,硕士研究生。研究方向:制药工程。E-mail: 2585323086@qq.com
通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:临床药学、药事管理。电话:0532-82911277。E-mail:sz_guo@tom.com

1.2 试剂

氯化矢车菊素对照品(北京谱析科技有限公司,批号:SS0610,纯度≥98%);紫肉甘薯对照药材(青岛农业技术推广站);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

笔者收集青岛各种植基地的紫肉甘薯药材样品共10批(见表1),经山东省医学科学院中药研究室孙敬勇研究员鉴定为真品。

表1 紫肉甘薯药材来源

Tab 1 Origin of *S. tuberosm*

样品编号	产地	供样单位
1	山东	青岛市即墨市农科所
2	山东	青岛市即墨色素科技有限公司
3	山东	青岛市即墨王村农业科研基地
4	山东	青岛市甘薯专业合作社1
5	山东	青岛市即墨鳌山绿色农业基地
6	山东	青岛市农技站
7	山东	青岛市平度农技站
8	山东	青岛市甘薯专业合作社2
9	山东	青岛市甘薯专业合作社3
10	山东	青岛市甘薯专业合作社4

2 方法与结果

2.1 显微特征鉴别

取样品适量,将其粉碎后过40目筛,得紫褐色粉末,再用水合氯醛制成粉末显微片在100倍光学显微镜下进行观察。结果可见,网纹导管呈粉红色,直径可达30 μm;草酸钙簇晶呈粉红色,直径为5~10 μm;淀粉粒呈透明状,单粒呈圆形、盔帽形或类三角形,直径为2~12 μm,脐点呈点状、人字状、短缝状及星状,而大粒可见层纹;淀粉粒复粒由2~3分粒组成,详见图1。

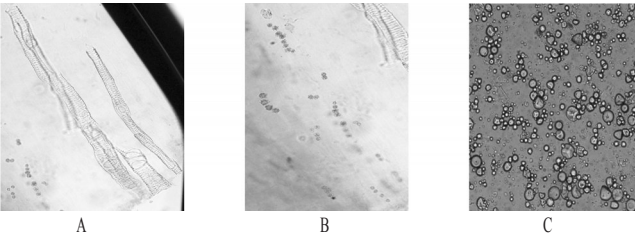


图1 显微特征鉴别结果
A.导管;B.簇晶;C.淀粉粒

Fig 1 Identification results of microscopic characteristics

A.catheter; B.crystal clusters; C.starch grains

2.2 薄层色谱(TLC)鉴别

取样品粉末1 g,加甲醇10 ml,超声处理20 min,滤过,滤液浓缩蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取紫肉甘薯对照药材1 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[2]试验,吸取上述2种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-冰乙酸-水(4:1:1, V/V/V)为展开剂,在温度为25 ℃、相对湿度为70%的条件下展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,加热到100 ℃后,斑点清晰显色,分别置于日光和紫外光灯(365 nm)下检视^[3]。结果,供试品色谱中,在与对照药材相应位置上显相同颜色的斑点,详见图2。

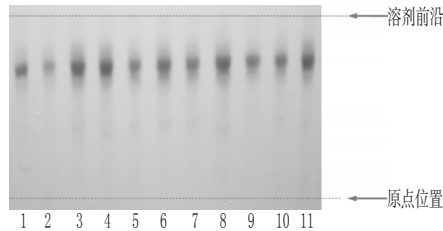


图2 薄层色谱图
1~5、7~11.供试品;6.对照药材

Fig 2 TLC chromatograms

1-5, 7-11.test samples; 6.control medicinal herb

2.3 水分和总灰分检测^[2]

参照2015年版《中国药典》(四部)水分测定法第一法烘干法和灰分测定法测定样品的水分和总灰分。根据测定结果,拟定紫肉甘薯药材中水分不得过15.0%,总灰分不得过4.0%,详见表2。

2.4 重金属检测^[2]

参照2015年版《中国药典》(四部)重金属检查法第二法检查样品中重金属。根据检测结果,拟定紫肉甘薯药材中铅的含量应低于5 ppm,详见表2。

2.5 浸出物检测^[2]

参照2015年版《中国药典》(四部)浸出物测定法热浸法进行检测。根据检测结果,拟定紫肉甘薯药材中浸出物的含量

不得少于11.0%,详见表2。

表2 样品中水分、总灰分、铅和浸出物检测结果

Tab 2 Determination results of moisture, total ash, Pb and extract

样品编号	水分, %	总灰分, %	铅, ppm	浸出物, %
1	8.9	2.4	<5	15.6
2	10.1	2.2	<5	20.8
3	10.5	2.3	<5	21.3
4	9.9	2.5	<5	20.9
5	9.6	2.3	<5	18.9
6	9.6	2.6	<5	21.3
7	9.1	2.3	<5	16.5
8	10.3	2.9	<5	17.3
9	11.0	2.4	<5	17.5
10	8.5	2.0	<5	22.3

2.6 氯化矢车菊素含量测定^[4]

2.6.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 三氟乙酸溶液(80:20, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 538 nm; 柱温: 30 ℃。在上述色谱条件下,理论板数以氯化矢车菊素峰计≥5 000^[5-7]; 各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图3。

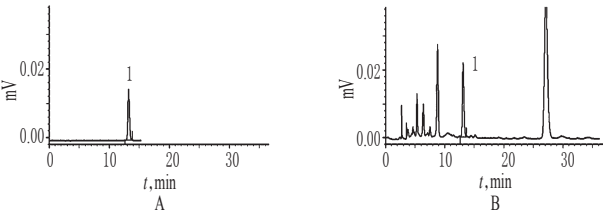


图3 高效液相色谱图

A.对照品; B.供试品; 1.氯化矢车菊素

Fig 3 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; 1.oxidized cyanidin

2.6.2 对照品溶液的制备 精密称取氯化矢车菊素对照品1.72 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液(质量浓度为0.172 mg/ml)。精密量取上述对照品贮备液5 ml,置于100 ml量瓶中,加盐酸甲醇定容,摇匀,即得质量浓度为0.008 6 mg/ml的对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液的制备 取样品粉末约1 g,精密称定,置于烧瓶中,精密加入盐酸甲醇20 ml,精确称量后90 ℃下水浴加热水解1 h,取出,冷却后再次精密称量,用盐酸甲醇补足减失的质量,摇匀后滤过,取续滤液,即得。

2.6.4 线性关系考察^[8-11] 分别精密量取“2.6.2”项下对照品溶液5、10、15、20、25 μl,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以氯化矢车菊素进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得氯化矢车菊素回归方程为y=2 879 486x+3 733(r=0.999 8)。结果表明,氯化矢车菊素检测进样量线性范围为0.043~0.215 μg。

2.6.5 精密度试验 取“2.6.2”项下对照品溶液适量,按“2.6.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,氯化矢车菊素峰面积的RSD=0.77%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6.6 稳定性试验 取“2.6.3”项下供试品溶液(编号:7)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,氯化矢车菊素峰面积的RSD=0.81%(n=5),表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.6.7 重复性试验 精密称取同一批样品(编号:7)适量,按

“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果,氯化矢车菊素的含量平均值为0.208 mg/g,RSD=1.15%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.6.8 加样回收率试验 取已知含量样品(编号:7)适量,共9份,分别加入一定质量的氯化矢车菊素对照品,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.504 2	0.104 9	0.086 0	0.187 6	96.19		
0.510 8	0.106 2	0.086 0	0.189 1	96.34		
0.510 6	0.105 3	0.086 0	0.189 9	98.24		
0.501 1	0.104 2	0.107 5	0.208 9	97.37		
0.503 8	0.105 2	0.107 5	0.207 9	95.50	97.25	1.35
0.508 7	0.105 8	0.107 5	0.209 4	96.36		
0.499 8	0.104 0	0.129 0	0.229 8	97.55		
0.507 2	0.105 8	0.129 0	0.232 2	98.01		
0.513 2	0.106 7	0.129 0	0.235 3	99.65		

2.6.9 样品含量测定 取10个编号的样品各适量,分别按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=2,mg/g)
Tab 4 Results of contents determination of samples(n=2,mg/g)

样品编号	含量		平均含量
	1	2	
1	0.192	0.195	0.194
2	0.183	0.187	0.185
3	0.286	0.294	0.290
4	0.130	0.134	0.132
5	0.145	0.148	0.147
6	0.266	0.273	0.269
7	0.205	0.212	0.208
8	0.217	0.220	0.219
9	0.265	0.262	0.263
10	0.222	0.219	0.221

3 讨论

紫肉甘薯自20世纪90年代经日本引入我国后,在山东全省都有广泛种植,本试验中的紫肉甘薯药材均来自于山东青岛的各种植基地。

进行粉末显微鉴定时笔者发现草酸钙簇晶和网纹导管均呈粉红色,这是由于紫肉甘薯中富含花青素的原因,而淀粉粒为透明状则是因为经过稀释后制备,因此不显色。为了判断紫肉甘薯药材的真伪,笔者又通过TLC法对其进行了定性鉴别。结果发现,样品1~5、7~11的显色位置与对照药材6的显色位置有相同颜色的斑点,进一步证明了供试品的真实性。

紫肉甘薯中含有大量的花青素类物质,其主要成分为矢车菊素和芍药素及极少量的天竺葵色素,以糖苷化后的酰基化衍生物形式存在,而经过酸水解后会生成花青素苷元的盐酸盐。花青素类化合物既为有效成分,又为指标成分。因此,氯化矢车菊素含量的高低就成为衡量紫肉甘薯质量的一个非

常重要的指标^[12-16]。测定氯化矢车菊素含量时,在供试品溶液的制备中,对提取的酸浓度:(1→10)、(2→10)、(3→10)、(4→10)盐酸甲醇;提取时间:0.5、1、2 h;提取温度:70、80、90、100℃进行了考察,确定最终的供试品制备方法为取1 g紫肉甘薯药材粉末,加入20 ml盐酸甲醇(3→10),在90℃的水浴中加热1 h。为了验证此质量标准的科学性和可行性,笔者又进行了方法学的考察,证明此方法操作方便、专属性强、稳定性好、重复性佳、结果准确。本研究首次制定了紫肉甘薯的质量标准,可为其质量控制的更深入研究提供参考。

参考文献

[1] Kinnosuke O, Norihiko T, Norio S. Chemical structure of two anthocyanin from purple sweet potato [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(6): 2 127.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 57.

[3] 马成, 热娜·卡斯木, 徐熠. 维药索索葡萄中齐墩果酸薄层鉴别方法研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(5): 1 778.

[4] 田荣, 隋忠国, 曹玉. 等. 牛蒡根药材的质量标准研究[J]. *中国药房*, 2014, 25(31): 2 934.

[5] 黄敏. 茶碱缓释片有关物质检查系统适用性探讨[J]. *医药导报*, 2014, 33(4): 511.

[6] 柯雪红. 高效液相色谱法测定舒金克喘胶囊中和厚朴酚与厚朴酚的含量[J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(8): 732.

[7] 宣超, 汤峰. 高效液相色谱法测定竹叶提取物中木犀草素的含量[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(26): 15 846.

[8] 杜洪志, 骆莉莉, 农亨. 等. 复方远枣宁神薄膜包衣片中有有效成分丹皮酚含量测定的方法学研究[J]. *贵阳中医学院学报*, 2014, 36(4): 37.

[9] 孙丹丹, 闫雪生, 李岩. 菊葛天麻颗粒质量标准研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 86.

[10] 谢宁, 王玉平, 王枫. 等. HPLC法测定决明消障丸中丹皮酚含量[J]. *中国疗养医学*, 2013, 22(6): 540.

[11] 孙林霞, 阮英恒, 高昭. 等. 阳春砂种子质量标准的研究[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(21): 83.

[12] 李志民, 夏亚君, 何厚洪. 反相高效液相色谱法测定双氯酚酸钾片的含量及有关物质[J]. *中国新药与临床杂志*, 2002, 21(9): 529.

[13] 方婧, 付梅红, 杨洪军. 等. 微波协助提取在中药材含量测定中的应用(2): 微波法与药典法测定白芷中欧前胡素含量比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 89.

[14] 周宗元, 王建, 陆小华. 2010版《中国药典》中药材含量测定成分与其功效的相关性分析[J]. *中药与临床*, 2014, 5(5): 5.

[15] 周娟, 王颖, 伍丕娥. 等. 血府逐瘀软胶囊中药材的鉴别及芍药苷的含量测定[J]. *华西药学杂志*, 2006, 21(5): 475.

[16] 英锡相, 袁昌鲁, 曲贤广. 等. 11种中药材及3种中成药马兜铃酸的含量测定[J]. *辽宁中医杂志*, 2003, 30(5): 404.

(收稿日期: 2016-01-17 修回日期: 2016-02-15)
(编辑: 张 静)

HPLC法测定抗骨质增生片中淫羊藿苷的含量

张桂林*,马慧萍#,李兰茹,董志臣,何 蕾,贾正平(兰州军区兰州总医院药材科,兰州 730050)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4291-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.37

摘要 目的:建立测定抗骨质增生片中淫羊藿苷含量的方法,以期完善该制剂的质量标准提供依据。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈,流动相为乙腈-水(27:73, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为270 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:淫羊藿苷检测质量浓度线性范围为3~60 μg/ml($r=0.999\ 9$);定量限为11.2 μg/ml,检测限为4.3 μg/ml;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为99.00%~100.67%(RSD=0.63%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于测定抗骨质增生片中淫羊藿苷的含量。
关键词 抗骨质增生片;淫羊藿苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Icaritin in Kangguzhi Zengsheng Tablet by HPLC

ZHANG Guilin, MA Huiping, LI lanru, DONG Zhichen, HE Lei, JIA Zhengping (Dept. of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of icaritin in Kangguzhi zengsheng tablet, and provide a basis for improving the quality standard. METHODS: HPLC was performed on the column of Hypersil ODS2 C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - water (27:73, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 270 nm, column temperature was 25℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of icaritin was 3-60 μg/ml ($r=0.999\ 9$); limit of quantitation was 11.2 μg/ml, limit of detection 4.3 μg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 99.00%-100.67% (RSD=0.63%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the content determination of icaritin in Kangguzhi zengsheng tablet.

KEYWORDS Kangguzhi zengsheng tablet; Icaritin; HPLC; Content determination

抗骨质增生片是兰州军区总医院自制的纯中药制剂[批准文号:兰制字(2012)F00020号],其是由熟地黄、鸡血藤、肉苁蓉、淫羊藿等多味中药材经提取加工而制成,具有滋补肝肾、强壮筋骨、益精养血、活血通络的作用^[1];临床主要用于治疗骨质增生及骨退行性病变等症。淫羊藿为方中君药,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效,其主要有效成分是黄酮类化合物淫羊藿苷^[2]。现代药理学研究发现,淫羊藿苷具有多种生物活性^[3-7],并有抗缺氧、抗氧化等多种生物学功效^[8-10]。由于目前尚未有测定抗骨质增生片中淫羊藿苷含量的报道,因此笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定抗骨质增生片中淫羊藿苷含量的方法,以期为进一步完善该制剂的质量标准提供依据。

1 材料

1.1 仪器

U-3000型HPLC仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);3300LH型超声提取仪(上海科导超声仪器有限公司,功率:220 W,频率:40 kHz);AE200型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

抗骨质增生片(兰州军区兰州总医院自制,批号:100618、100622、100624、101118、101125,规格:0.3 g/片);淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110737-200415,纯度:

98.5%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2 C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(27:73, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:270 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含淫羊藿苷300 μg的对照品贮备液。精密吸取上述贮备液1 ml,置于10 ml棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品10片,除去薄膜衣,研细,取样品细粉约0.2 g,精密称定,置于10 ml具塞锥形瓶中,加甲醇10 ml,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液;再置于10 ml棕色量瓶中备用。

2.2.3 阴性对照溶液 取除淫羊藿的其他药材适量,按样品的制备工艺和配方比例制备阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以淫羊藿苷峰计≥3 000,保留时间为11 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

*主管药师。研究方向:药物分析。电话:0931-8994665。E-mail:13639366065@163.com

#通信作者:副主任药师,博士。研究方向:药物分析。电话:0931-8994671。E-mail:mahuipingcxi@aliyun.com

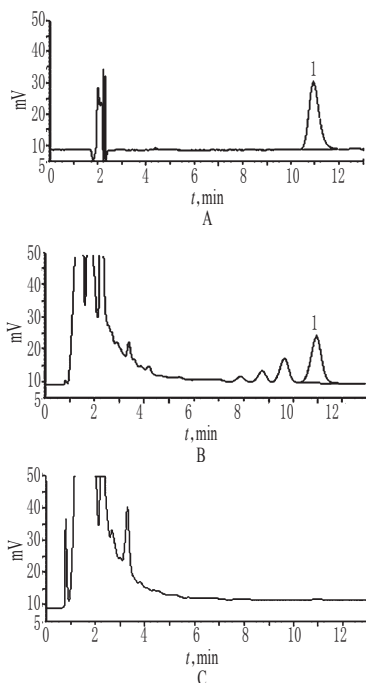


图1 高效液相色谱图
A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance;B.test sample;C.negative control;1.icariin

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液贮备液50、100、200、400、1 000、2 000 μl ,分别置于10 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以淫羊藿苷质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得淫羊藿苷的回归方程为 $y=24\,537.59x-3\,740.01(r=0.999\,9)$ 。结果表明,淫羊藿苷检测质量浓度线性范围为3~60 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限为11.2 $\mu\text{g/ml}$;当信噪比为3:1时,得检测限为4.3 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,淫羊藿苷峰面积的RSD=0.97%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:100618)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,淫羊藿苷峰面积的RSD=1.37%($n=6$),表明供试品溶液在室温下8 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:100618)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果,淫羊藿苷的平均含量为1.18 mg/g, RSD=0.31%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:100618)适量,共6份,每份约0.1 g,分别置于10 ml棕色量瓶中,加入一定质量的淫羊藿苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项

下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Recovery test results($n=6$)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.100 4	0.118 5	0.120 0	0.237 6	99.25	99.44	0.63
0.099 8	0.117 8	0.120 0	0.236 9	99.25		
0.101 2	0.119 4	0.120 0	0.238 2	99.00		
0.100 6	0.118 7	0.120 0	0.239 5	100.67		
0.102 9	0.121 4	0.120 0	0.240 8	99.50		
0.102 5	0.121 0	0.120 0	0.239 8	99.00		

2.10 样品含量测定

取5批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算淫羊藿苷的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=3$)

样品批号	淫羊藿苷,mg / 片	平均含量,mg / 片	RSD,%
100618	0.354	0.324	1.02
100622	0.321		1.36
100624	0.297		1.55
101118	0.333		1.22
101125	0.316		1.41

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

笔者参考2015年版《中国药典》(一部)^[11]和相关文献^[3,12-14]中的溶剂,选择甲醇、50%甲醇、50%乙醇作为提取溶剂。结果,甲醇作为提取溶剂时淫羊藿苷含量最高,提取效果最好。因此,本试验选择甲醇为提取溶剂。

3.2 提取时间的考察

笔者考察了3个不同的超声提取时间(20、30、40 min)。结果,超声处理20 min时,样品中的淫羊藿苷提取不完全,超声处理30和40 min时淫羊藿苷提取量相当,且可将样品中的淫羊藿苷提取完全。因此,为了节约试验时间,本试验的超声处理时间选择为30 min。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于测定抗骨质增生片中淫羊藿苷的含量。

参考文献

- [1] 邹文孝,田维君,张春.抗骨增生片联合骨肽片治疗骨质增生症60例[J].中国药师,2012,21(8):93.
- [2] 冯晶.淫羊藿的研究进展[J].湖北中医杂志,2012,34(9):74.
- [3] 范梅娟.强力健身胶囊定性定量方法的研究[J].药物分析杂志,2012,32(4):697.
- [4] 范永春.乳欣安胶囊质量标准研究[J].中成药,2010,32(5):786.
- [5] 万婷,熊富良,高文天,等.骨康胶囊的质量控制研究[J].中成药,2012,34(6):1 096.
- [6] 张伏军,尹小玲,李卿,等.高效液相色谱法测定穿龙骨刺片中薯蓣皂苷和淫羊藿[J].中成药,2011,33(7):1 182.
- [7] 马晓星,韩翠艳,朱丹,等.益康药酒的质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):101.
- [8] 翟宏颖,于林楠.淫羊藿苷对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心肌组织的保护作用[J].中国药房,2015,26(16):2 192.

藏药绿萝花的化学成分研究

朱海雯*,高 蝶,张永兰,张起辉,夏之宁[#](重庆大学化学化工学院,重庆 400044)

中图分类号 R282.1;R282.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4293-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.38

摘 要 目的:研究藏药绿萝花的化学成分。方法:采用多种柱色谱对绿萝花乙酸乙酯粗提物进行分离纯化,根据理化性质和波谱数据分析鉴定化合物结构。结果:从绿萝花乙酸乙酯粗提物中分离得到10个化合物,分别鉴定为Rutamontine(1)、结香苷C(2)、结香素(3)、银锻苷(4)、Helichrysoside(5)、山柰酚(6)、2,4-Dihydroxypheny-2-hydroxy-4-methoxybenzyl-ketone(7)、咖啡酸乙酯(8)、Phthalic acid bis-(2-ethyl-hexyl) ester(9)、去甲基丁香色原酮(10)。结论:化合物7为首次从植物来源分离得到,化合物5、8和9为首次从瑞香科植物分离得到,化合物6为首次从结香属分离得到,化合物2、10为首次从绿萝花分离得到。本研究为绿萝花质量评价奠定了一定基础。
关键词 结香属;绿萝花;化学成分

Study on the Chemical Constituents of the Flower of *Epipremnum aureum*
ZHU Haiwen,GAO Die,ZHANG Yonglan,ZHANG Qihui,XIA Zhining(College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the chemical constituents of the flower of Zang *Epipremnum aureum*. METHODS: The constituents of ethyl acetate extract of the flower of *E. aureum* were separated and purified with varied chromatographic techniques, and the structures were identified based on spectral data and chemical properties. RESULTS: Ten compounds were isolated from ethyl acetate extract of the flower of *E. aureum*, they were identified as rutamontine (1), edgeworoside C (2), edgeworin (3), tiliroside (4), helichrysoside (5), kaempferol (6), 2,4-dihydroxypheny-2-hydroxy-4-methoxybenzyl-ketone (7), ethyl caffeate (8), phthalic acid bis-(2-ethyl-hexyl) ester (9) and noreugenin (10). CONCLUSIONS: Compound 7 is firstly isolated from natural source, compounds 5, 8 and 9 is firstly isolated from the family Thymelaeaceae, compound 6 is firstly isolated from *Edgeworthia* and compound 2 and 10 are firstly isolated from the flowers of *E. aureum*. The study lays certain foundation for the quality evaluation of *E. aureum*.
KEYWORDS *Edgeworthia*; The flower of *Epipremnum aureum*; Chemical constituents

绿萝花为瑞香科结香属植物滇结香的花蕾,主要分布于我国西藏地区及云南西北部。民间常通过绿萝花泡水饮用的方式来治疗糖尿病、高血压、高脂血症、血管炎及脉管炎等疾病^[1-3]。有文献报道,绿萝花粗提物具有多种药理活性,如降糖及抑制 α -葡萄糖苷酶的活性^[4-5]。前期本院研究发现,绿萝花乙酸乙酯粗提物具有非常好的激活过氧化氢酶体增殖物激活受体(PPAR) γ 和PPAR β 的作用。此外,笔者根据PPARs活性对绿萝花进行了化学成分研究,发现该植物中含有双香豆素类、黄

酮类、脂肪酸和三萜等化合物。有研究表明,绿萝花中伞形花内酯和十五烷酸均具有良好的PPAR γ 激动活性^[6-7]。而PPARs在糖尿病研究中处于十分重要的位置,其参与的生物学效应包括调节血脂激活基因转录、脂质代谢、胰岛素敏感、炎症反应、细胞增殖等重要生化反应及生物调节过程,并与人类的慢性疾病密切相关,包括肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化及癌症等代谢疾病,它同糖尿病、肥胖症及炎症都有密切的关系^[8-11]。因此,绿萝花具有开发成为治疗糖尿病药物的潜力。为明确其

[9] Zhai YK, Guo XY, Ge BF, *et al.* Icariin stimulates the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells via activating the PI3K-AKT-eNOS-NO-cGMP-PKG [J]. *Bone*, 2014, 66(9):189.
[10] Ma HP, Ma XN, Ge BF, *et al.* Icariin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in osteoblasts and preserves their osteogenic differentiation potential in vitro [J]. *Cell Prolif.* 2014, 47(6):527.
[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:327.
[12] 焦守国,许学丽.HPLC法测定金乌骨通胶囊中淫羊藿苷的含量[J].*解放军药学学报*, 2009, 25(6):547.
[13] 赵明宏,韩镌竹,王常丽,等.高效液相色谱法同时测定复方仙灵脾颗粒中淫羊藿苷和丹参酮Ⅱ_A的含量[J].*解放军药学报*, 2011, 27(1):63.
[14] 许红涛,李媛,何勇静,等. HPLC法测定二仙汤提取物中抗骨质疏松有效成分的含量[J]. *中国药房*, 2015, 26(15):2122.

* 硕士研究生。研究方向:植物化学。E-mail: zhuhaiwen19891206@163.com
[#] 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析。电话: 023-65106615, E-mail: tcm_anal_cqu@163.com

(收稿日期:2015-11-02 修回日期:2016-08-18)
(编辑:刘 柳)

降糖成分与物质基础,笔者研究了绿萝花的化学成分,从绿萝花乙酸乙酯粗提物中分离出10个化合物,通过理化性质及光谱数据分析鉴定为Rutamontine(1)、结香苷C(Edgeworoside C,2)、结香素(Edgeworin,3)、银锻苷(Tiliroside 4)、Helichrysside (5)、山柰酚(Kaempferol,6)、2,4-Dihydroxypheny-2-hydroxy-4- methoxy- benzyl- ketone(7)、咖啡酸乙酯(Ethyl caffeate,8)、Phthalic acid bis-(2-ethyl-hexyl) ester(9)和去甲基丁香色原酮(Noreugenin,10)。

1 材料

1.1 仪器

DD2400-MR型和600-MR型核磁共振谱仪(美国Agilent公司);Acquity SQD型质谱仪(美国Waters公司);IR Affinity-1型红外光谱仪(日本Shimadzu公司);X-4型显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 色谱与试剂

梯度分离系统中低压制备色谱(包括玻璃柱C-690,Pump Manager C-615,Pump Module C-605)、流分收集系统中低压制备色谱(包括Fraction Collector C-660)均购自美国Buchi公司;半制备色谱(美国Waters公司);Sephadex LH-20凝胶(德国Merk公司);其余硅胶均购自青岛海洋化工有限公司;乙醇、甲醇、石油醚、乙酸乙酯和二氯甲烷均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

绿萝花于2012年9月购于西藏惠生堂药房,经重庆中药研究院钟国跃研究员鉴定为真品,其样品保存于重庆大学创新药物研究中心(编号:2013010)。

2 方法与结果

2.1 提取与分离

取6 kg干燥的样品,剪碎,以70%乙醇回流提取3次(1 h/次),减压浓缩成浸膏,分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取。减压浓缩得到石油醚粗提物(75 g)、乙酸乙酯粗提物(96 g)和正丁醇粗提物(115 g)。

对乙酸乙酯粗提物进行植物化学分离,经硅胶柱色谱粗分,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇进行梯度洗脱,得到9个流分(Fr.1~Fr.9)。Fr.6(18 g)以石油醚-乙酸乙酯-甲醇等度洗脱,经硅胶柱分离,合并后得到3个流分(Fr.6-1~Fr.6-3)。Fr.6-2经中低压制备系统(流速:10 ml/min,石油醚-乙酸乙酯体系)反复硅胶柱分离得到化合物7(10 mg)和化合物9(6.7 mg)。Fr.6-3经硅胶柱色谱分离后共得到3个流分(Fr.6-3-1~Fr.6-3-3);Fr.6-3-3经水洗沉淀后,在214 nm波长处半制备色谱(流速:3 ml/min,53%甲醇-水体系)分离得到化合物5(3.8 mg)。Fr.6-1经中低压制备系统[流速:10 ml/min,石油醚-乙酸乙酯(30:70, V/V)]进行分离,得到5个部分(Fr.6-1D~Fr.6-1H);Fr.6-1E经Sephadex LH-20凝胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(50:50, V/V)等度洗脱,得到流分Fr.6-1E-1和Fr.6-1E-2;除掉色素的Fr.6-1E-2经半制备色谱分离(流速:3 ml/min,50%甲醇-水体系)得到化合物8(7.4 mg, $t_R=32.3$ min)和化合物10(9.2 mg, $t_R=22.5$ min)。Fr.6-1F经反复硅胶色谱得到化合物3(35 mg)和化合物6(60.8 mg)。Fr.7(18 g)经硅胶柱分离得到6

个流分(Fr.7-1~Fr.7-6)。Fr.7-2经甲醇沉淀洗涤得到化合物1(230 mg)。Fr.7-5经硅胶柱分离得到3个流分(Fr.7-2A~Fr.7-2C),Fr.7-2B为绿萝花中的主要化合物4(4.8 g),Fr.7-2C经重结晶得到化合物2(52 mg)。最终,共获得10个化合物(1~10),质量分别为230 mg、52 mg、35 mg、4.8 g、3.8 mg、60.8 mg、10 mg、7.4 mg、6.7 mg、9.2 mg。

2.2 结构鉴定

化合物1:白色粉末,易溶于乙腈和乙醇的混合液中,难溶于甲醇和乙酸乙酯。IR:3 468,1 717,1 612,1 506,1 400,1 389,1 135,844 cm^{-1} 。HR-ESI-MS m/z 352.059 0[M]⁺,计算值为352.058 3,分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_7$ 。¹H-NMR(400 MHz,DMSO- d_6) δ :3.78(3H,s,7'-OMe),6.33(1H,d, $J=9.5$ Hz,H-3),6.83(1H,s,H-4'),7.07(1H,dd, $J=8.6,2.0$ Hz,H-6),7.14(1H,d, $J=1.6$ Hz,H-8),7.18(1H,s,H-8'),7.66(1H,d, $J=8.3$ Hz,H-5),7.84(1H,s,H-5'),7.99(1H,d, $J=9.4$ Hz,H-4),10.21(1H,s,6'-OH)。¹³C-NMR(100 MHz,DMSO- d_6) δ :55.5(C-OMe),103.2(C-8),104.4(C-8'),109.8(C-3),110.6(C-10'),113.9(C-5'),114.3(C-6),114.8(C-10),130.3(C-5),131.3(C-4'),136.16(C-3'),144.5(C-4),146.1(C-7'),147.8(C-6'),150.8(C-7),155.4(C-9),157.4(C-9'),160.1(C-2'),160.4(C-2)。与文献[12]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为Rutamontine(结构式见图1)。

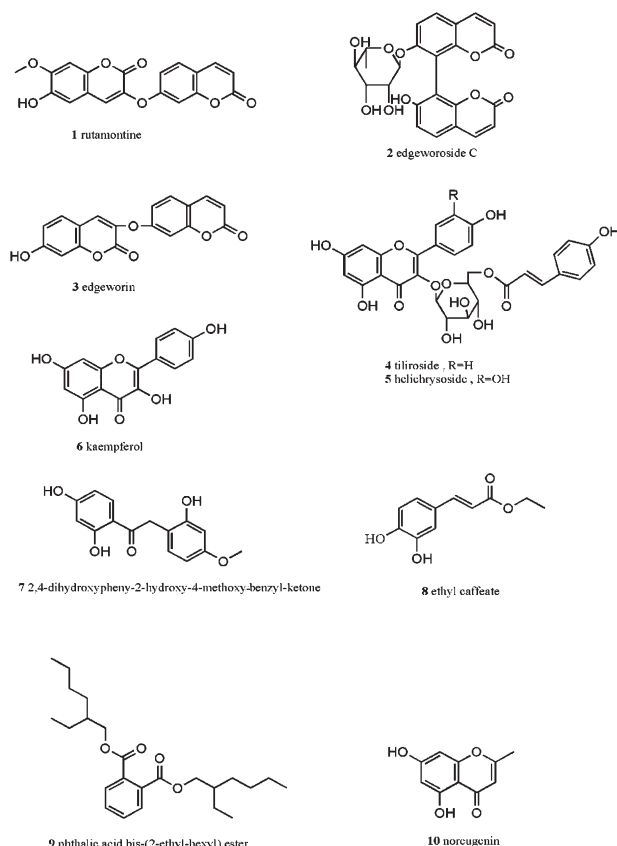


图1 化合物结构式

Fig 1 The structures of compounds

化合物2:白色针晶,能溶于甲醇。IR:3 570~3 150,1 734,1 699,1602 cm^{-1} 。MS(+)-EI m/z 469.31[M+H]⁺。¹H-NMR

(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.96 (3H, d, J =5.8 Hz, 5'' -Me), 2.9 (1H, m, H-3''), 3.15 (2H, m, H-4'', 5''), 3.50 (1H, s, H-2''), 5.46 (1H, s, H-1''), 6.30 (1H, d, J =9.8 Hz, H-3), 6.35 (1H, d, J =9.8 Hz, H-3'), 7.01 (1H, d, J =8.5 Hz, H-6), 7.28 (1H, d, J =8.6 Hz, H-6'), 7.65 (1H, d, J =8.5 Hz, H-5), 7.75 (1H, d, J =8.8 Hz, H-5'), 7.97 (2H, d, J =9.8 Hz, H-4), 8.05 (1H, d, J =9.3 Hz, H-4'), 10.49 (1H, s, 7' -OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 183.3 (C-6''), 70.1 (C-5''), 70.3 (C-2''), 70.6 (C-3''), 71.7 (C-4''), 98.8 (C-1''), 104.7 (C-8), 107.1 (C-8), 110.4 (C-8'), 111.1 (C-3), 120.0 (C-6'), 113.5 (C-3'), 129.6 (C-5), 129.9 (C-5'), 131.7 (C-6), 144.4 (C-4), 145.1 (C-4'), 153.1 (C-9'), 153.3 (C-9), 157.5 (C-7), 159.9 (C-7), 160.4 (C-2'), 160.5 (C-2)。与文献[13]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为结香苷 C (Edgeworoside C, 结构式见图 1), 系首次从绿萝花分离得到。

化合物 3: 白色粉末。HR-ESI-MS m/z 321.0399 [M-H] $^-$, 计算值为 321.0429, 分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.32 (1H, d, J =9.5 Hz, H-3), 6.76 (1H, d, J =1.5 Hz, H-8'), 6.79 (1H, dd, J =8.6, 1.9 Hz, H-6'), 7.08 (1H, dd, J =8.6, 2.1 Hz, H-6), 7.15 (1H, d, J =1.7 Hz, H-8), 7.47 (1H, d, J =8.5 Hz, H-5'), 7.66 (1H, d, J =8.6 Hz, H-5), 7.89 (1H, s, H-4'), 7.99 (1H, d, J =9.6 Hz, H-4), 10.55 (1H, s, 7-OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 102.6 (C-8'), 104.3 (C-8'), 111.3 (C-10'), 113.8 (C-5'), 114.0 (C-6), 114.3 (C-3), 114.8 (C-10), 129.9 (C-6'), 130.3 (C-5), 131.5 (C-4'), 135.7 (C-3'), 144.5 (C-4), 153.9 (C-9'), 155.4 (C-7'), 157.3 (C-9), 160.2 (C-7), 160.4 (C-2'), 161.1 (C-2)。与文献[14]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为结香素 (Edgeworin 结构式见图 1)。

化合物 4: 淡黄色粉末。IR: 3 250、1658、1607、1501、1420、1362、1177、1068、824 cm^{-1} 。MS (-)-EI m/z 593.23 [M-H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.20 (1H, d, J =5.6 Hz, H-1''), 6.06 (1H, d, J =15.9 Hz, H-8''), 6.12 (1H, d, J =1.7 Hz, H-6), 6.35 (1H, d, J =1.7 Hz, H-8), 6.74 (2H, d, J =8.4 Hz, H-3''', 5'''), 6.81 (2H, d, J =8.8 Hz, H-3', 5'), 7.29 (2H, d, J =14.8 Hz, H-2''', 6'''), 7.33 (1H, d, J =7.2 Hz, H-7'''), 7.95 (2H, d, J =8.8 Hz, H-2', 6')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 63.4 (C-6''), 70.4 (C-4''), 74.6 (C-5''), 74.7 (C-2''), 76.6 (C-3''), 94.1 (C-8), 99.2 (C-6), 101.4 (C-1''), 104.3 (C-10), 114.1 (C-3', 5'), 115.5 (C-3''', 5'''), 121.2 (C-1'), 125.3 (C-1'''), 130.6 (C-2''', 6'''), 131.2 (C-2', 6'), 133.5 (C-3), 145.0 (C-7'''), 156.7 (C-2), 156.9 (C-9), 160.2 (C-4'), 160.4 (C-4''), 161.6 (C-5), 164.6 (C-7), 166.6 (C-9''), 177.8 (C-4)。与文献[15]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为银锻苷 (Tiliroside, 结构式见图 1)。

化合物 5: 黄色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.23 (1H, d, J =7.1 Hz, H-1''), 6.03 (1H, d, J =15.0 Hz, H-8''), 6.10 (1H, d, J =2.1 Hz, H-6), 6.29 (1H, s, H-8), 6.72 (1H, d, J =8.5 Hz, H-5'), 6.76 (2H, d, J =8.4 Hz, H-3''', 5'''), 7.26 (2H, d, J =8.5 Hz, H-2''', 6'''), 7.38 (1H, d, J =15.0 Hz, H-7'''), 7.49

(1H, d, J =8.5 Hz, H-6'), 7.53 (1H, s, H-2'), 9.96 (1H, s, 3-OH), 10.11 (1H, s, 4' -OH), 10.80 (1H, s, 7-OH), 12.504 (1H, s, 5-OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 64.0 (C-6''), 70.3 (C-4''), 74.8 (C-5''), 74.6 (C-2''), 76.7 (C-3''), 94.0 (C-8), 99.5 (C-6), 101.2 (C-1''), 104.4 (C-10), 117.8 (C-2'), 115.8 (C-3''', 5'''), 115.2 (C-5'), 120.8 (C-6'), 121.1 (C-1'), 125.4 (C-1'''), 130.7 (C-2''', 6'''), 133.8 (C-3), 144.7 (C-3'), 145.3 (C-7'''), 149.4 (C-4'), 156.8 (C-2), 157.0 (C-9), 160.6 (C-4''), 161.4 (C-5), 164.3 (C-7), 166.5 (C-9''), 178.1 (C-4)。与文献[16]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为 Helichrysoside (结构式见图 1), 系首次从瑞香科植物分离得到。

化合物 6: 黄色粉末。IR: 3 400~3 285、1 656、1 616 cm^{-1} 。MS (-)-EI m/z 285.12 [M-H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.17 (1H, d, J =1.6 Hz, H-6), 6.42 (1H, d, J =1.6 Hz, H-8), 6.90 (2H, d, J =8.8 Hz, H-3', 5'), 8.02 (2H, d, J =8.8 Hz, H-2', 6'), 9.37 (1H, s, 3-OH), 10.09 (1H, s, 4' -OH), 10.74 (1H, s, 7-OH), 12.46 (1H, s, 5-OH)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 93.9 (C-8), 98.6 (C-6), 103.5 (C-10), 115.9 (C-2', 6'), 122.1 (C-1'), 129.9 (C-3', 5'), 136.1 (C-3), 147.2 (C-2), 156.6 (C-9), 159.6 (C-4'), 161.1 (C-5), 164.3 (C-7), 176.3 (C-4)。与文献[17]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为山柰酚 (Kaempferol, 结构式见图 1), 系首次从结香属植物分离得到。

化合物 7: 白灰色粉末。MS (+)-EI m/z 275.48 [M+H] $^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.73 (3H, s, 4' -OMe), 2.52 (2H, s, H-1), 5.96 (1H, s, H-3'), 6.18 (1H, d, J =9.4 Hz, H-5'), 6.69 (1H, d, J =2.3 Hz, H-3''), 6.76 (1H, dd, J =8.5, 2.3 Hz, H-5''), 7.51 (1H, d, J =8.5 Hz, H-6'), 7.92 (1H, d, J =9.4 Hz, H-6'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 40.8 (C-1), 56.9 (C-OMe), 102.6 (C-3'), 107.5 (C-3''), 110.0 (C-5'), 111.7 (C-5''), 111.9 (C-1'), 113.6 (C-1''), 130.1 (C-6''), 130.2 (C-6'), 155.9 (C-2''), 157.7 (C-2'), 160.9 (C-4'), 161.7 (C-4''), 187.6 (C=O)。与文献[18]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为 2, 4-Dihydroxyphenyl-2-hydroxy-4-methoxybenzylketone (结构式见图 1), 系首次从植物来源中分离得到。

化合物 8: 棕色粉末。MS (-)-EI m/z 207.20 [M-H] $^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 1.29 (3H, t, J =7.1 Hz, H-2'), 4.19 (2H, q, J =7.1 Hz, H-1'), 6.23 (1H, d, J =15.9 Hz, H-8), 6.76 (1H, d, J =8.1 Hz, H-5), 6.93 (1H, dd, J =6.6, 1.1 Hz, H-6), 7.05 (1H, d, J =1.0 Hz, H-2), 7.51 (1H, d, J =15.9 Hz, H-7)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 13.2 (C-2'), 60.0 (C-1'), 113.8 (C-2), 115.1 (C-5), 121.5 (C-6), 126.3 (C-1), 145.3 (C-7), 145.4 (C-4), 148.1 (C-3), 167.9 (C=O)。与文献[19]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为咖啡酸乙酯 (Ethyl caffeate 结构式见图 1), 系首次从瑞香科植物分离得到。

化合物 9: 棕色油状物。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.82 (6H, t, J =6.4 Hz, H-6', 6''), 0.85 (6H, m, H-b', b''), 1.26 (16H, m, 8 $\times$ CH $_2$), 1.59 (2H, m, H-2', 2''), 4.12 (4H, m, H-1',

1''), 7.65 (2H, m, H-4, 5), 7.71 (2H, m, H-3, 6)。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.2 (C-b', b''), 14.3 (C-6', 6''), 22.9 (C-5', 5''), 23.7 (C-a', a''), 28.8 (C-4', 4''), 30.2 (C-3', 3''), 38.5 (C-2', 2''), 67.9 (C-1', 1''), 129.1 (C-4, 5), 132.0 (C-3, 6), 132.2 (C-1, 2), 167.4 (C=O)。与文献[20]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为 Phthalic acid bis-(2-ethyl-hexyl) ester (结构式见图1),系首次从瑞香科植物分离得到。

化合物10:淡黄色针晶。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.31 (3H, s, 2-Me), 6.12 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-6), 6.13 (1H, s, H-3), 6.27 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-8), 12.80 (1H, s, 5-OH)。¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 20.3 (C-Me), 94.3 (C-8), 99.5 (C-6), 103.4 (C-10), 108.2 (C-3), 158.3 (C-9), 161.9 (C-5), 165.9 (C-2), 167.7 (C-7), 182.0 (C-4)。MS (-)-EI *m/z* 191.13 [M-H]⁻。与文献[21]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为去甲丁香色原酮(Noreugenin, 结构式见图1),系首次从绿萝花中分离得到。

3 讨论

有关绿萝花化学成分的研究尚不多见,本试验从绿萝花乙酸乙酯粗提取物分离得到的主要成分为双香豆素类和黄酮类成分。已有研究证明,双香豆素类为绿萝花中的主要成分,该类物质具有显著的抗凝活性^[3]。黄酮类成分是否为绿萝花降糖的主要活性物质,还需进一步试验证明。化合物7为首次从植物来源分离得到,化合物5、8和9为首次从瑞香科植物分离得到,化合物6为首次从结香属分离得到,化合物2、10为首次从绿萝花分离得到。本研究为绿萝花质量评价奠定了一定基础。

参考文献

- [1] 黄福开.藏医养生图说[M].北京:人民卫生出版社,2006:153.
- [2] Zeng YL, Li L. Optimization on craft and hypoglycemic effect research of SFE-CO₂ extractive for luluohua[J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2008, 17(10):7
- [3] Ma YY, Zhao DG, Zhou AY, *et al.* α-glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of phenolics from the flowers of *Edgeworthia gardneri*[J]. *J Agr Food Chem*, 2015, 63 (37):8 162.
- [4] Geng Y, Yang HM, Xu HY, *et al.* A-glucosidaseinhibitory activity of the alabastrum of *Edgeworthia gardneri* (wall.) meisn[J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2013, 32 (9): 967.
- [5] Wang QY, Xu HY, Xu ZH, *et al.* Hypoglycemic effect of water extracts from *edgeworthia gardneri* (wall.) meisn on type 2 diabetic mice[J]. *Nat Prod Res Develop*, 2014, 26 (9):1 385.
- [6] Gao X, Li R, Zhu GF, *et al.* Effect of alkyl chain length on adsorption properties of alkyl imidazolium ionic liquids surface imprinting polymers[J]. *Monatsh Chem*, 2015, 146 (3):475.

- [7] Xu P, Xia ZN, Lin YX. Chemical constituents from *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae)[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012(45):148.
- [8] Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: Lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6):2 201.
- [9] Dreyer C, Krey G, Keller H, *et al.* Control of the peroxisomal β-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors[J]. *Cell*, 1992, 68(5):879.
- [10] Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation[J]. *BBA*, 2011, 1812(8):1 007.
- [11] 王妍,何治,朱斌,等.多甲氧基黄酮类化合物抗2型糖尿病效应的研究进展[J]. *中国药房*, 2014, 25 (38):3 619
- [12] Kabouche Z, Benkiki N, Seguin E, *et al.* A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Rruta montana*[J]. *Fitoterapia*, 2003, 74 (1):194.
- [13] Li XN, Tong SQ, Cheng DP, *et al.* Coumarins from *Edgeworthia chrysantha*[J]. *Molecules*, 2014, 19(2):2 042.
- [14] Chaya N, Terauchi K, Yamagata Y, *et al.* Antiproliferative constituents in plants 14 coumarins and acridone alkaloids from *Boenninghausenia japonica nakai*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(8):1 312.
- [15] Bajaj R, Chang CJ, McLaughlin JL, *et al.* Tiliroside from the seeds of *Eremocarpus setigerus*[J]. *J Nat Prod*, 1986, 49(6):1 174.
- [16] Candy HA, Wright W. Helichryoside-new acylated flavonoid glycoside from *Helichrysum kraussii* sch bip[J]. *J S Afr Chem I*, 1975, 28(2):215.
- [17] Bonacheva VM, Botirov EK. Kaempferol and its glycosides from *Equisetum silvaticum*[J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2014, 40(7):777.
- [18] Farkas L, Gottsege A, Nogradi M, *et al.* Synthesis of sophorol, violanone, lonchocarpan, claussequinone, phenopteran, leiocalycin, and some other natural isoflavonoids by oxidative rearrangement of chalcones with thallium nitrate[J]. *J Chem Soc Perk T*, 1974(3):305.
- [19] Li Y, Wang SF, Zhao YL, *et al.* Chemical constituents from *Clematis delavayi* var. *Spinescens*[J]. *Molecules*, 2009, 14(11):4 433.
- [20] Li JT, Yin BL, Liu Y, *et al.* Mono-aromatic constituents of *Dendrobium longicornu*[J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45 (2):234.
- [21] Anh DTP, Duong TB, Hoang VD. A new chromone from *Hymenocallis littoralis* Salisb[J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28 (21):1 869.

(收稿日期:2015-07-21 修回日期:2016-03-21)

(编辑:张 静)

顶空气相色谱法同时测定比沙可啶原料药中2种溶剂残留量

姜建国*, 孙 婷, 郭永辉, 韩学静, 苗会娟(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4297-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.39

摘 要 目的:建立同时测定比沙可啶原料药中二氯甲烷和乙酸乙酯残留量的方法。方法:采用顶空气相色谱法。色谱柱为以6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷(DB-624)为固定液的毛细管柱,程序升温,进样口温度为220℃,检测器为氢火焰离子化检测器,温度为250℃,载气为高纯氮气,载气流速为3.0 ml/min,分流比为1:10,顶空加热温度为70℃,平衡时间为30 min,顶空瓶装样量为5 ml,顶空进样量为1 ml。结果:二氯甲烷和乙酸乙酯检测质量浓度线性范围分别为6~120 μg/ml($r=0.999\ 9$)、50~1 000 μg/ml($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.2、1.7 μg,检测限分别为0.06、0.5 μg;精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤3%;加样回收率分别为100.30%~102.00%(RSD=0.63%, $n=9$)、100.10%~101.30%(RSD=0.44%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确,可用于同时测定比沙可啶原料药中二氯甲烷和乙酸乙酯的残留量。

关键词 比沙可啶;顶空气相色谱法;溶剂残留量;二氯甲烷;乙酸乙酯

Simultaneous Residual Determination of Two Organic Solvents in Bisacodyl Raw Material by Head-space GC

JIANG Jianguo, SUN Ting, GUO Yonghui, HAN Xuejing, MIAO Huijuan(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous residual determination of dichloromethane and ethyl acetate in bisacodyl raw material. METHODS: Head-space GC was performed on the capillary column of 6% cyanopropyl phenyl-94% dimethyl polysiloxane (DB-624) by temperature programming, the temperature of injector was 220℃, detector was flame ionization detector with temperature of 250℃, carrier gas was high purity nitrogen with the flow rate of 3.0 ml/min, split ration was 1:10, headspace heating temperature was 70℃, equilibration time was 30 min, volume of headspace vial was 5 ml, and the injection volume was 1 ml. RESULTS: The linear range was 6-120 μg/ml for dichloromethane ($r=0.999\ 9$) and 50-1 000 μg/ml for ethyl acetate ($r=0.999\ 9$); the limit of quantitation was 0.2, 1.7 μg, limit of detection was 0.06, 0.5 μg; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no higher than 3%; recoveries were 100.30%-102.00% (RSD=0.63%, $n=9$) and 100.10%-101.30% (RSD=0.44%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the simultaneous residual determination of dichloromethane and ethyl acetate in bisacodyl raw material.

KEYWORDS Bisacodyl; Head-space GC; Residual determination; Dichloromethane; Ethyl acetate

比沙可啶,是德国20世纪50年代末上市且目前仍在临床上广泛使用的接触性缓泻剂^[1-3]。在该原料药的合成过程中,使用了二氯甲烷和乙酸乙酯^[4],其中乙酸乙酯残留可导致患者恶心、呕吐、腹痛、腹泻、倦睡、昏迷甚至死亡等;二氯甲烷属于二类残留溶剂且具有一定的毒性。该原料药收载于2015年版《中国药典》(二部)^[5],但该标准并未对二氯甲烷和乙酸乙酯的残留量作具体要求;且目前尚未见测定比沙可啶原料药中有机溶剂残留量的报道。因此,为保证药品质量和用药安全,笔者采用顶空气相色谱法同时测定比沙可啶原料药中二氯甲烷和乙酸乙酯的含量。

1 材料

1.1 仪器

Trace1310型气相色谱仪,包括TriPlusRSH型自动顶空进样器、氢火焰离子化检测器(FID)和CHROMLETEON 6色谱工作站(美国Thermo Fisher Scientific公司);XS105型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);MCM36型百万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:40

kHz);GWA-UN2-C30型超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

比沙可啶原料药(A公司,编号:201301A;B公司,编号:201302B);二氯甲烷对照品(批号:M1550000,纯度:98%)、乙酸乙酯对照品(批号:209-686-8,纯度:99%)均购自美国药典委员会;*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:以6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷(DB-624)为固定液的毛细管柱(30.00 m×0.32 mm,1.80 μm);程序升温:初始温度40℃,保持9 min,以40℃/min升温至200℃,保持10 min;进样口温度:220℃;检测器:FID;温度:250℃;载气:高纯氮气;载气流速:3.0 ml/min;分流比:1:10;顶空加热温度:70℃;平衡时间:30 min;顶空瓶装样量:5 ml;顶空进样量:1 ml。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取二氯甲烷、乙酸乙酯对照品各300、2 500 mg,置于同一50 ml量瓶中,加DMF溶解并定容,作为混合对照品贮备液。取上述混合对照品贮备液适量,置于50 ml量瓶中,加DMF溶解并定容,摇匀,制得二氯甲烷

* 主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0311-85212009。E-mail:122547652@qq.com

的质量浓度为 60 μg/ml、乙酸乙酯的质量浓度为 500 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,精密称定,置于 50 ml 量瓶中,加 DMF 溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.3 空白对照溶液 取 DMF 作为空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>2.0;理论板数以乙酸乙酯峰计为 10 000,保留时间为 13.5 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

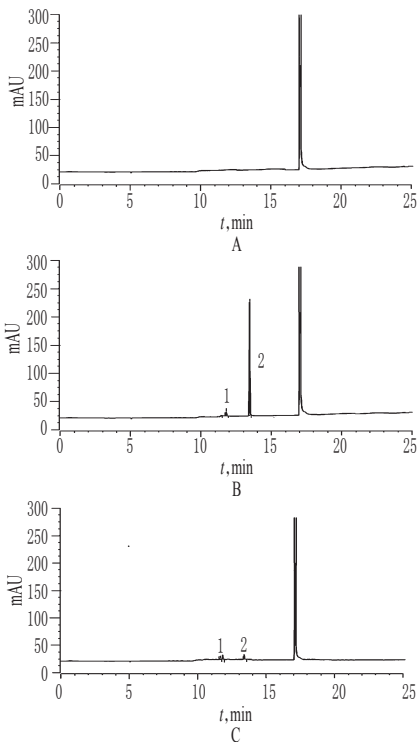


图 1 气相色谱图

A.空白对照;B.混合对照品;C.供试品;1.二氯甲烷;2.乙酸乙酯
Fig 1 GC chromatograms
A. blank control; B. mixed reference substance; C. test sample; 1. dichloromethane; 2. thyl acetate

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 ml,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得二氯甲烷的回归方程为 $y=0.036x+0.001$ ($r=0.999\ 9$)、乙酸乙酯的回归方程为 $y=0.855x-0.025$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,二氯甲烷和乙酸乙酯检测质量浓度线性范围分别为 6~120、50~1 000 μg/ml。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得二氯甲烷和乙酸乙酯的定量限分别为 0.2、1.7 μg;当信噪比为 3:1 时,得二氯甲烷和乙酸乙酯的检测限分别为 0.06、0.5 μg。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,二氯甲烷和乙酸乙酯峰

面积的 RSD 分别为 3.0%、2.6%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密量取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:201301A)适量,分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,二氯甲烷和乙酸乙酯峰面积的 RSD 分别为 3%、2.3%($n=6$),表明供试品溶液在室温下 10 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取样品(编号:201301A)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,二氯甲烷和乙酸乙酯峰面积的 RSD 分别为 2.3%、2.1%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(编号:201301A)适量,共 9 份,每份约 500 mg,置于 50 ml 量瓶中,分别加入低、中、高质量的二氯甲烷和乙酸乙酯对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)							
残留溶剂	取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
二氯甲烷	500.000 0	0.150 0	0.270 0	0.425 4	102.00	101.02	0.63
	500.000 0	0.150 0	0.270 0	0.423 7	101.37		
	500.000 0	0.150 0	0.270 0	0.424 6	101.70		
	500.000 0	0.150 0	0.300 0	0.451 8	100.60		
	500.000 0	0.150 0	0.300 0	0.454 1	101.37		
	500.000 0	0.150 0	0.300 0	0.452 3	100.77		
	500.000 0	0.150 0	0.330 0	0.480 5	101.52		
	500.000 0	0.150 0	0.330 0	0.482 9	100.88		
	500.000 0	0.150 0	0.330 0	0.481 0	100.30		
	500.000 0	0.100 0	2.250 0	2.377 0	101.20	100.81	0.44
乙酸乙酯	500.000 0	0.100 0	2.250 0	2.365 7	100.70		
	500.000 0	0.100 0	2.250 0	2.370 2	100.90		
	500.000 0	0.100 0	2.500 0	2.627 5	101.10		
	500.000 0	0.100 0	2.500 0	2.632 5	101.30		
	500.000 0	0.100 0	2.500 0	2.630 0	101.20		
	500.000 0	0.100 0	2.750 0	2.866 5	100.60		
	500.000 0	0.100 0	2.750 0	2.852 7	100.10		
	500.000 0	0.100 0	2.750 0	2.855 5	100.20		

2.10 样品中残留溶剂测定

取 2 批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算二氯甲烷和乙酸乙酯的残留量。结果,2 批样品(编号:201301A、201302B)乙酸乙酯中的残留量分别为 0.2%、0.3%($n=3$);1 批样品(编号:201301A)二氯甲烷的残留量为 0.03%($n=3$),而另外 1 批样品则未检出。

3 讨论

3.1 气相色谱方法的选择

二氯甲烷和乙酸乙酯均为中、低沸点的有机挥发性溶剂^[6-11]。顶空气相色谱法的原理是通过加热装置将样品中可挥发组分烘出收集,使用该方法测定时可避免挥发性成分的损失,又可降低提取物引起的噪声;与液-液萃取和固相萃取相比,灵敏度更高、分析速度更快,可消除样品基质的潜在干扰。因此,本试验选择顶空气相色谱法进行二氯甲烷和乙酸乙酯残留量的测定。

3.2 提取溶剂的选择

HPLC法同时测定益肤丸中香豆素类化合物的含量

李小玲^{1*},刁娟娟²,李新霞^{2#}(1.新疆医科大学第二附属医院药剂科,乌鲁木齐 830028;2.新疆医科大学中心实验室分析测试中心,乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4299-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.40

摘要 目的:建立同时测定益肤丸中香豆素类化合物含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-3,流动相为乙腈-水(49:51, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为320 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯检测质量浓度线性范围分别为5.16~206.4 μg/ml($r=0.999\ 9$)、37.40~1 495.89 μg/ml($r=0.999\ 9$)、9.95~318.34 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为96.05%~103.19%(RSD=2.18%, $n=9$)、96.90%~103.09%(RSD=2.07%, $n=9$)、95.50%~103.57%(RSD=2.15%, $n=9$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性较好,可用于益肤丸中香豆素类化合物含量的同时测定。

关键词 益肤丸;蛇床子素;异欧前胡素;二氢欧山芹醇当归酸酯;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Coumarin Compounds in Yifu Pill by HPLC

LI Xiaoling¹, DIAO Juanjuan², LI Xinxia²(1.Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830028, China; 2.Analysis and Testing Center of Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the simultaneous determination of coumarin compounds in Yifu pill. **METHODS:** HPLC was performed on the column of Inertsil ODS-3 with mobile phase of acetonitrile-water (49:51, V/V) at a flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was 320 nm, column temperature was 30 ℃, injection volume was 20 μl. **RESULTS:** The linear range was 5.16-206.4 μg/ml for osthole ($r=0.999\ 9$), 37.40-1 495.89 μg/ml for isoimperatorin ($r=0.999\ 9$) and 9.95-318.34 μg/ml for columbianadin ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.0%; recoveries were 96.05% -103.19% (RSD=2.18%, $n=9$) for osthole, 96.90% -103.09% (RSD=2.07%, $n=9$) for isoimperatorin, 95.50% -103.57% (RSD=2.15%, $n=9$) for columbianadin. **CONCLUSIONS:** The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of coumarin compounds in Yifu pill.

KEYWORDS Yifu pill; Osthole; Isoimperatorin; Columbianadin; Content determination; HPLC

由于比沙可啶不溶于水^[5],且采用顶空气相色谱法测定样品时,一般使用二甲亚砜和DMF作为提取溶剂^[12]。结果,二甲亚砜作为提取溶剂时,样品在二甲亚砜中的溶解性较差且对其他峰干扰较大;DMF作为提取溶剂时,二氯甲烷和乙酸乙酯在DMF中的溶解性较好,且DMF沸点高,对其他峰的干扰较小。因此,笔者采用DMF作为本试验的提取溶剂。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,可用于同时测定比沙可啶原料药中二氯甲烷和乙酸乙酯的残留量。

参考文献

[1] 王卉,杜春波,沈立,等.RP-HPLC法测定比沙可啶片剂含量及有关物质[J].药学进展,2005,29(12):565.
[2] 张奕华,侯秀清,黄赐福.比沙可啶合成工艺研究[J].中国药师,1999,2(1):7.
[3] 李颖,刘世宽,郝志刚.结肠定位给药制剂:比沙可啶速释片的研制[J].山东医药工业.2000,19(3):7.
[4] 张军辉,刘英华,李金岭,等.比沙可啶的合成工艺研究[J].精细化工中间体,2012,42(2):30.
[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年

* 主管药师。研究方向:中成药质量标准。电话:0991-4609105。
E-mail:lixiaoling008@sohu.com
通信作者:教授,博士生导师。研究方向:新药研发。电话:0991-4365034。E-mail:LXX6668@163.com

版.北京:中国医药科技出版社,2015:74.
[6] 祝波,赵鲁青,陈安珍,等.顶空采样-毛细管气相色谱法分析格列美脲原料药中的溶剂残留[J].色谱,2009,27(6):755.
[7] 孙悦,王卫,唐素芳.顶空气相色谱法测定盐酸帕罗西汀中残留的有机溶剂及基质效应考察[J].药物分析杂志,2010,30(5):963.
[8] 冯敏,王淼,王曦,等.顶空气相色谱法测定西尼地平原料药中残留的三乙胺和哌啶[J].华西药学杂志,2014,29(5):596.
[9] 汪斌,郑璐,姚仲青,等.顶空气相色谱法测定胡黄连苷Ⅱ原料药中7种有机溶剂残留量[J].中国药房,2015,26(27):3 859.
[10] 谷央丽,沈丽娟,傅应华.顶空毛细管气相色谱法测定头孢克肟颗粒中乙醇残留量[J].中国药师.2013,16(1):63.
[11] 吴朝华,王秀梅,顾保明,等.顶空毛细管气相色谱法测定盐酸丁卡因原料药中的残留溶剂[J].药物分析杂志,2011,31(6):1 188.
[12] 张晶蓉.顶空气相色谱法测定富马酸喹硫平的残留溶剂[J].天津药学,2015,27(5):17.

(收稿日期:2016-01-11 修回日期:2016-08-18)
(编辑:刘 柳)

益肤丸由党参、羌活、独活等16味中药材组成,具有健脾化湿、活血润肤止痒的功效,常用于慢性湿疹、银屑病、神经性皮炎、皮肤瘙痒等症的治疗,原方以煎剂在临床使用多年,因其疗效显著,后制成丸剂作为新疆昌吉州中医医院的院内中药制剂,目前尚无质量可控方法。存在于益肤丸中的羌活、独活均有祛风除湿、止痛抗炎作用,而产生该药理活性的物质主要为香豆素类化合物^[1-2]。异欧前胡素、蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯^[3]分别为羌活和独活中的香豆素类化合物,其含量的多少与益肤丸药效有一定的联系。因此,本研究利用高效液相色谱法(HPLC)在同一色谱条件下同时测定以上3种香豆素类化合物的含量,建立含量测定方法,从而确定量效关系,为益肤丸质量控制方法的建立提供更加准确的试验数据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括SPD-M20A二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);AB135-S型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);HH-S4型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

1.2 药品与试剂

益肤丸(新疆昌吉回族自治州中医医院自制,批号:20140201、20140202、20140301,规格:60 g/瓶);蛇床子素对照品(批号:110822-201308,纯度:100%)、二氢欧山芹醇当归酸酯对照品(批号:111583-201304,纯度:98.3%)均购自中国食品药品检定研究院;异欧前胡素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:A0012,纯度:≥99%);乙腈为色谱纯,甲醇、95%乙醇均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(49:51, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:320 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取蛇床子素对照品10.32 mg,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为206.4 μg/ml的蛇床子素对照品贮备液;精密称取异欧前胡素对照品15.11 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为1 495.8 μg/ml的异欧前胡素对照品贮备液;精密称取二氢欧山芹醇当归酸酯对照品10.12 mg,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为397.92 μg/ml的二氢欧山芹醇当归酸酯对照品贮备液。分别精密吸取上述蛇床子素对照品贮备液2.5 ml、异欧前胡素对照品贮备液0.6 ml、二氢欧山芹醇当归酸酯对照品贮备液0.5 ml,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品5 g,加硅藻土2.5 g,研匀,置圆底烧瓶中,加甲醇75 ml,加热回流45 min,滤过,再加甲醇

50 ml,加热回流0.5 h,滤过,合并滤液,滤液蒸干,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按益肤丸处方比例和制备工艺制备缺羌活、独活的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,蛇床子素的保留时间约为33 min,理论板数为19 619;分离度为1.7,拖尾因子为1.05。异欧前胡素的保留时间约为38 min,理论板数为18 984;分离度为1.6,拖尾因子为1.04。二氢欧山芹醇当归酸酯的保留时间约为42 min,理论板数为19 553;分离度为1.7,拖尾因子为0.99。

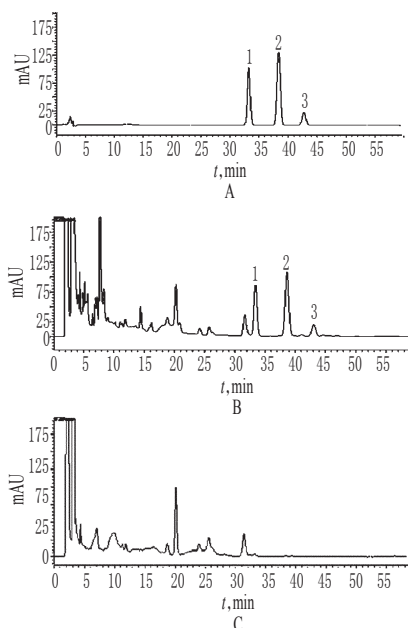


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.蛇床子素;2.异欧前胡素;3.二氢欧山芹醇当归酸酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.osthole; 2.isoimperatorin; 3.columbianadin

2.4 线性关系考察

分别量取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,加甲醇制成质量浓度分别为5.16、10.32、20.64、51.6、103.2、206.4 μg/ml的系列蛇床子素对照品溶液,加甲醇制成质量浓度分别为37.40、74.79、149.59、299.18、747.95、1 495.89 μg/ml的系列异欧前胡素对照品溶液,加甲醇制成质量浓度分别为9.95、19.90、39.79、79.58、159.17、318.34 μg/ml的系列二氢欧山芹醇当归酸酯对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯回归方程分别为 $y = 72\,898.611x + 2\,858.811\,5$ ($r = 0.999\,9$)、 $y = 56\,920.295\,1x + 89\,098.993\,5$ ($r = 0.999\,9$)、 $y = 53\,724.346\,8x + 8\,786.074\,6$ ($r = 0.999\,9$)。结果

表明,蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯检测质量浓度线性范围分别为5.16~206.4、37.40~1 495.89、9.95~318.34 μg/ml。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积的RSD分别为2.87%、1.07%、2.98%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20140201)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、12、15、18、21、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,蛇床子素、异欧前胡素在24 h内稳定性良好,其峰面积的RSD分别为1.43%、0.98%(n=9);二氢欧山芹醇当归酸酯在15 h内基本稳定,其峰面积的RSD=1.31%(n=9),超过15 h后发生降解,其峰面积增大,RSD=29.4%。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20140201)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,蛇床子素、异欧前胡素、二氢欧山芹醇当归酸酯含量平均值分别为131.26、236.57、52.92 μg/g,RSD分别为2.16%、1.57%、2.15%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20140201)适量,共6份,分别加入低、中、高含量的蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量,g	样品含量,μg/g	加入量,μg/g	测得量,μg/g	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
蛇床子素	4.999 2	127.16	110.88	236.37	98.49	99.26	2.18
	5.000 0	131.96	110.88	246.38	103.19		
	4.999 2	135.32	110.88	245.50	99.37		
	5.001 1	132.22	138.60	265.34	96.05		
	4.999 8	133.70	138.60	269.14	97.72		
	4.999 9	128.73	138.60	267.37	100.03		
	4.999 8	127.14	166.32	290.25	98.07		
	5.000 3	131.95	166.32	301.18	101.75		
	5.000 2	135.95	166.32	299.99	98.63		
	4.999 2	238.20	239.34	470.13	96.90	100.13	2.07
异欧前胡素	5.000 0	231.15	239.34	466.54	98.35		
	4.999 2	254.19	239.34	496.50	101.24		
	5.001 1	239.48	299.18	530.56	97.29		
	4.999 8	237.46	299.18	542.08	101.82		
	4.999 9	248.10	299.18	547.17	99.96		
	4.999 8	238.17	359.02	596.81	99.89		
	5.000 3	231.13	359.02	601.26	103.09		
	5.000 2	254.14	359.02	622.71	102.66		
	4.999 2	51.33	42.28	95.12	103.57	99.19	2.15
二氢欧山芹醇当归酸酯	5.000 0	52.89	42.28	94.82	99.17		
	4.999 2	49.27	42.28	91.04	98.79		

续表1

Continued Tab 1

待测成分	取样量,g	样品含量,μg/g	加入量,μg/g	测得量,μg/g	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
二氢欧山芹醇当归酸酯	5.001 1	53.85	52.43	106.08	99.62	99.50	
	4.999 8	53.62	52.43	103.69	95.50		
	4.999 9	49.45	52.43	101.08	98.47		
	4.999 8	51.32	62.57	113.70	99.70		
	5.000 3	52.89	62.57	115.79	100.53		
	5.000 2	52.26	62.57	113.21	97.41		

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3,μg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3,μg/g)

样品批号	蛇床子素	异欧前胡素	二氢欧山芹醇当归酸酯
20140201	123.20	238.78	49.56
20140202	121.16	225.30	48.60
20140301	129.86	238.54	51.70

3 讨论

本试验因在同一色谱条件下同时测定益肤丸中蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯3种化合物,综合2015年版《中国药典》(一部)和相关文献方法^[3-6],最终确定采用文中色谱条件。

益肤丸中二氢欧山芹醇当归酸酯稳定性差,故用于益肤丸中香豆素类化合物含量测定的供试品溶液应在检测前临时制备。考虑到样品中化合物的稳定性,提取和滤液蒸干时,温度应不超过80℃,以避免热不稳定成分的降解。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性较好,可用于益肤丸中香豆素类化合物含量的同时测定。

参考文献

[1] 李云霞,高春华,沙明.中药羌活化学成分及药理作用研究进展[J].辽宁中医学院学报,2004,6(1):22.

[2] 段志富,陈建伟,李祥.伞形科药用植物中香豆素类成分及其药理作用研究现状[J].中国药房,2008,19(3):223.

[3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:182.

[4] 胡太德,陈绍成,谭君.重庆道地药材独活与全国其他产区独活主要药效成分含量对比研究[J].中国药房,2015,26(33):4 711.

[5] 段红,翟科峰,曹稳根,等.正交试验法优选祛风止痛片中制草乌、独活的合提工艺[J].中成药,2010,32(8):1 421.

[6] 谢惠艳,王英豪,王蓉蓉,等.正交试验优选羌活-独活药对的合提工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):10.

(收稿日期:2015-10-19 修回日期:2016-02-04)
(编辑:张 静)

HS-SPME-GC-MS 法分析南、北葶苈子的挥发性成分

曹利*,卢金清#,叶欣,许俊洁,屠寒(湖北中医药大学湖北省药用植物研发中心,武汉 430065)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4302-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.41

摘要 目的:分析南、北葶苈子的挥发性成分,并比较其差异。方法:采用顶空固相微萃取法对葶苈子的挥发性成分进行提取,采用气相色谱-质谱联用法检测成分,采用面积归一化法计算各成分相对含量。结果:南、北葶苈子的挥发性成分分别为25、18种,分别占各自挥发性成分总量的75.76%、64.29%,其中含量最高的化学成分分别为 β -石竹烯、邻甲基苯腈。结论:该方法操作简便,结果可靠,可用于南、北葶苈子挥发性成分的分析;南、北葶苈子的挥发性成分在种类和含量上差异较大。该研究为快速鉴定南、北葶苈子提供了依据。
关键词 南葶苈子;北葶苈子;顶空-固相微萃取;气相色谱-质谱联用法;挥发性成分

Analysis of Volatile Components in *Descurainia sophia* and *Lepidium apetalum*

CAO Li, LU Jinjing, YE Xin, XU Junjie, TU Han (Hubei Provincial Research and Development Center of Medicinal Plant, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze the volatile components in *Descurainia sophia* and *Lepidium apetalum* and compare its differences. METHODS: HS-SPME was conducted for extracting volatile components in *D. sophia* and *L. apetalum*, GC-MS was used for detecting components, and area normalization method was adopted for calculating relative content of each component. RESULTS: The volatile components in *D. sophia* and *L. apetalum* were 25 and 18, accounting for 75.76% and 64.29% of total volatile components, respectively, and chemical components with the highest contents were β -caryophyllene and *O*-tolunitrile. CONCLUSIONS: The method is simple, reliable, and can be used for the analysis of volatile components in *D. sophia* and *L. apetalum*. The volatile components show great differences in the kinds and contents, the study can provide basis for rapid identification of *D. sophia* and *L. apetalum*.
KEYWORDS *Descurainia sophia*; *Lepidium apetalum*; Headspace-solid phase microextraction; GC-MS; Volatile component

葶苈子为十字花科植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 或独行菜 *Lepidium apetalum* Willd. 的干燥成熟种子,前者习称“南葶苈子”,后者习称“北葶苈子”,味辛、苦,大寒,归肺、膀胱经,有泻肺平喘、行水消肿之功效,主治痰涎壅肺、胸肋胀满、胸腹水肿、小便不利等证^[1],其主产于山东、江苏、河北等地。

根据相关文献记载,葶苈子具有强心、抑制心室重构、抑制心肌肥大、降血脂、止咳平喘、利尿、抗癌、抗氧化等药理作用^[2-4]。有学者总结了葶苈子的妙用及用于治疗心力衰竭的经验^[5],而目前临床上用于治疗心衰的主要是左西孟旦、奈西立肽等化学药^[6],葶苈子在治疗心衰方面具有较大的开发前景。南、北葶苈子外形相似,临床上常有混用,但南葶苈子在临床上较北葶苈子应用广泛,且效果更好。为更好地将二者加以区别,本研究首次采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法(HS-SPME-GC-MS)分析南、北葶苈子的挥发性成分,旨在为规范二者在临床上的应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

6890/5973型GC-MS仪(美国Hewlett-Packard公司);65 μ m PDMS/DVB萃取纤维头(美国Supelco公司);手动固相微萃取

* 硕士研究生。研究方向:中药及其天然产物活性成分。E-mail: 15377575302@qq.com

通信作者:教授。研究方向:中药及其天然产物活性成分。电话:027-68890101。E-mail: ljqs9169@sohu.com

装置(德国IKA公司)。

1.2 药材

南、北葶苈子药材于2015年10月8日购于武汉强康药业有限公司,经湖北中医药大学药教研室张秀桥教授鉴定为十字花科植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 和独行菜 *Lepidium apetalum* Willd. 干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 HS-SPME条件 称取样品粉末1.5 g,置于15 ml顶空瓶中,用带有65 μ m PDMS/DVB萃取纤维头的手动进样器插入瓶内,100 $^{\circ}$ C下平衡15 min,再顶空萃取20 min,取出,立即插入GC仪进样口(温度为250 $^{\circ}$ C)中,解吸3 min。

2.1.2 色谱条件 色谱柱:HP-5M毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m);柱温:程序升温,初始温度为50 $^{\circ}$ C,先以3 $^{\circ}$ C/min升温至80 $^{\circ}$ C,后以6 $^{\circ}$ C/min升温至92 $^{\circ}$ C,再以7 $^{\circ}$ C/min升温至180 $^{\circ}$ C,最后以10 $^{\circ}$ C/min升温至200 $^{\circ}$ C;进样口温度:250 $^{\circ}$ C;载气:高纯氮气(纯度:99.999%);载气流速:1.0 ml/min;不分流进样。

2.1.3 质谱条件 离子源:电子轰击源(EI);离子源温度:230 $^{\circ}$ C;四级杆温度:150 $^{\circ}$ C;电子能量:70 eV;倍增管电压:1.2 kV;接口温度:250 $^{\circ}$ C;扫描范围:45~400 *m/z*。

2.2 成分分析

按上述试验条件进行分析处理,设定积分参数初始峰宽为0.080,初始阈值为16.0,得南、北葶苈子挥发性成分总离子流图(见图1),南葶苈子共分离出33个色谱峰,北葶苈子共分

离出28个色谱峰,将相关色谱峰数据碎片信息与Wiley7Nist05和NIST05数据库进行检索、比对,采用峰面积归一化法计算各成分的相对质量分数,对质谱相似度>80%的化合物进行收集整理,分别从南葶苈子中鉴定出25种成分,从北葶苈子中鉴定出18种成分,分别占各自挥发性成分总量的75.76%和64.29%,详见表1。

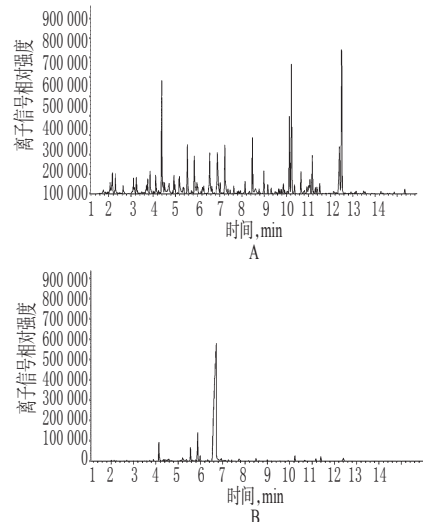


图1 总离子流图

A.南葶苈子挥发性成分;B.北葶苈子挥发性成分

Fig 1 Total ion spectra

A.volatil components in *D. sophia*;B.volatil components in *L. apetalum*

表1 南北葶苈子挥发性成分分析

Tab 1 Volatile components in *D. sophia* and *L. apetalum*

序号	名称	分子式	相对百分含量,%(相似度,%)	
			南葶苈子	北葶苈子
1	Methallyl cyanide 丁烯腈	C ₄ H ₅ N	1.12(83)	-
2	Hexyl alcohol 正己醇	C ₆ H ₁₄ O	1.71(80)	-
3	Ethyl 2-furyl ketone 2-丙酰呋喃	C ₇ H ₈ O ₂	1.20(80)	-
4	2-Pinene 2-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	2.27(95)	-
5	1-Acetyl-1-cyclohexene 1-乙酰环己烯	C ₈ H ₁₂ O	1.70(82)	-
6	Benzaldehyde 苯甲醛	C ₇ H ₆ O	1.99(91)	3.45(95)
7	4-Isothiocyanato-1-butene 3-丁烯基异硫氰酸酯	C ₄ H ₇ NS	8.85(81)	-
8	Hexanoic acid 己酸	C ₆ H ₁₂ O ₂	1.89(84)	-
9	Cyclol decene 双戊烯	C ₁₀ H ₁₆	1.98(93)	-
10	1-Octen-3-ol 1-辛烯-3-醇	C ₈ H ₁₆ O	-	1.20(80)
11	4-Octyne 4-辛炔	C ₈ H ₁₄	-	1.28(82)
12	Benzyl alcohol 苯甲醇	C ₇ H ₈ O	2.16(96)	1.85(96)
13	Ethyl butyrolactone 丙位己内酯	C ₈ H ₁₀ O ₂	-	0.54(81)
14	3,5-Octadien-2-one 3,5-辛二烯-2-酮	C ₈ H ₁₂ O	3.45(91)	5.38(90)
15	1-Nonanal 壬醛	C ₉ H ₁₈ O	1.38(80)	1.07(82)
16	Phenethyl alcohol 苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	1.38(81)	-
17	Alcanfor 樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	4.33(96)	-
18	Mesityl fluoride 1-氟-2,4,6-三甲基苯	C ₈ H ₉ F	-	0.65(80)
19	CNT 邻甲基苯腈	C ₈ H ₇ N	-	71.61(97)
20	Borneol 冰片	C ₁₀ H ₁₆ O	5.49(82)	1.70(80)
21	2-Methyl-5-(2-allyl-2-) cyclohexene-1- alcohol acetate 2-甲基-5-(2-丙烯基)-2-环己烯-1-醇乙酸酯	C ₁₈ H ₃₀ O	0.50(80)	-
22	Decanal 癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	-	0.30(84)
23	Benzothiazole 苯并噻唑	C ₇ H ₅ NS	-	1.04(91)
24	L-Borneol acetate 左旋乙酸冰片酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	3.48(99)	0.63(99)
25	Z-2-Methyl-5-(1-methylethenyl)-acetate, cis-2-cyclohexen 顺-2-甲基-5-(1-甲基乙烯基)-2-环己	C ₁₂ H ₂₀ O	0.54(91)	-
26	D-2-Carene 2-萜烯	C ₁₀ H ₁₆	0.39(81)	-
27	2-Methylnaphthalene 2-甲基萘	C ₁₁ H ₁₀	-	0.18(82)

续表1

Continued Tab 1

序号	名称	分子式	相对百分含量,%(相似度,%)	
			南葶苈子	北葶苈子
28	Eicosane 二十烷	C ₂₀ H ₄₂	-	0.13(90)
29	β -Caryophyllene β -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	14.6(99)	1.00(99)
30	Cis-b-Farnesene 1,6,10-十二碳三烯	C ₁₅ H ₂₄	0.62(92)	-
31	Pentamethylcyclopentadiene 五甲基环戊二烯	C ₁₀ H ₁₆	1.02(80)	-
32	γ -Cadinene γ -杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	0.63(98)	-
33	BHT 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚	C ₁₅ H ₂₄ O	-	0.98(80)
34	Diethyl phthalate 邻苯二甲酸二乙酯	C ₁₂ H ₁₄ O	4.85(96)	1.08(96)
35	8-Propoxy-cedrane 8-丙氧基-柏木烷	C ₁₈ H ₃₂ O	11.08(80)	-

注:“-”为未检测出

Note:“-”means no detected

由表1可知,通过GC-MS法分析、计算机检索和核对质谱库,从南葶苈子中共鉴定出的占其挥发性成分总量的75.76%,主要成分为萜烯类(30.3%)、酯类(15.15%)、醇类(9.09%)等;其中相对百分含量最高的成分是 β -石竹烯(14.6%),其次是8-丙氧基-柏木烷(11.08%)、3-丁烯基异硫氰酸酯(8.85%)等。从北葶苈子中共鉴定出的成分占其挥发性成分总量的64.29%,其主要成分为苯类(21.43%)、醛类(10.71%)、炔类(3.57%)等;其中邻甲基苯腈(71.61%)的相对百分含量最高。

3 讨论

赵海誉等^[7]采用水蒸气蒸馏法结合GC-MS法分析北葶苈子挥发油成分,鉴定出其中的17种化合物,主要为含苯环的化合物,与本试验检测出的含量高达71.61%的邻甲基苯腈吻合;弓建红等^[8]通过GC-MS法分析南葶苈子挥发油成分,分离检测出33个成分,鉴定出27种主要成分,发现含量最高的物质为3-亚甲基-壬烷(68.14%),其次为噻啉(29.32%)、2-庚烯醛(0.58%)、哌啉-3-甲酸甲酯(0.43%)等,此法与本试验方法得出的挥发性成分存在一定差异,可能是由于提取方法不同造成的,也可看出南此葶苈子的挥发性成分在种类和含量上差异较大。

由于南、北葶苈子形态细小,肉眼不易观察,在中药材流通领域内易与形态相似的药材混淆,有学者采用高效毛细管电泳法鉴别南葶苈子和车前子^[9]。而本试验运用HS-SPME-GC-MS法分析比较南、北葶苈子挥发性成分的差异,因为HS-SPME法是一种非常简单、快速、灵敏的前处理方法,其结合GC-MS法可迅速分析挥发性成分。加上南、北葶苈子挥发性成分种类多,特有成分含量大,因此运用此方法来分析南、北葶苈子的挥发性成分并以每种药材的典型挥发性成分为标准来鉴定其真伪是简便可靠的。综上所述,HS-SPME-GC-MS法在分析南、北葶苈子挥发性成分中具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 313.

[2] 郭娟, 陈长勋, 沈云辉. 葶苈子水提液对动物实验性心室重构的影响[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1519.

[3] 张晓丹, 范春兰, 余迎梅, 等. 葶苈子水提液对CHF大鼠利尿作用的影响[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(3): 210.

[4] 马梅芳, 李洁. 葶苈子对昆明种小鼠移植H22肝癌移植瘤抑瘤作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(2): 385.

[5] 周淑平. 于作盈教授应用香加皮、葶苈子治疗心衰的经验

HPLC法测定他米巴罗汀片的溶出度

陈丽姣^{1*}, 杨冬霞², 赵艳霞^{3#} (1. 山东理工职业学院, 山东 济宁 272067; 2. 山东创新药物研发有限公司, 济南 250101; 3. 山东省医学科学院研究生教育中心, 济南 250062)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4304-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.42

摘要 目的: 建立测定他米巴罗汀片溶出度的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为甲醇-水-冰乙酸(85:15:1, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 235 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 20 μl。溶出度测定采用桨法, 以 pH6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质, 溶出介质体积为 900 ml, 转速为 50 r/min, 60 min 取样。结果: 他米巴罗汀检测质量浓度线性范围为 0.801~2.804 μg/ml ($r=0.999\ 6$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<3%; 回收率分别为 99.58%~100.90% (RSD=0.25%, $n=9$); 3 批样品的溶出度测定结果分别为 98.25%、96.54%、92.38% ($n=6$)。结论: 该方法简便、准确, 灵敏度高, 专属性强, 适用于他米巴罗汀片的溶出度测定。
关键词 高效液相色谱法; 他米巴罗汀片; 溶出度

Dissolution Determination of Tamibarotene Tablet by HPLC

CHEN Lijiao¹, YANG Dongxia², ZHAO Yanxia³ (1. Shandong Polytechnic College, Shandong Jining 272067, China; 2. Shandong Chuangxin Pharmaceutical Research and Development Co. Ltd., Jinan 250101, China; 3. Graduate Education Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the dissolution determination of Tamibarotene tablet. METHODS: HPLC was performed on the column of Diamonsil C₁₈ with mobile phase of methanol-water-acetic acid (85:15:1, V/V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 235 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume was 20 μl. The paddle method was used to determine the dissolution, using pH6.8 phosphate buffer dissolution as medium, medium volume was 900 ml, the rotating speed was 50 r/min, taking samples after 60 min. RESULTS: The linear range of tamibarotene was 0.801-2.804 μg/ml ($r=0.999\ 6$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recovery was 99.58%-100.90% (RSD=0.25%, $n=9$); the accumulative dissolution rate of 3 batches of samples was 98.25%, 96.54%, 92.38% ($n=6$). CONCLUSIONS: The method simple, accurate with high sensitivity and specificity, and suitable for the dissolution determination of Tamibarotene tablet.
KEYWORDS HPLC; Tamibarotene tablet; Dissolution

急性早幼粒细胞白血病 (APL) 是一种特殊类型急性髓系白血病, 病程发展迅速, 死亡率高^[1]。APL 患者存在染色体 t(15; 17) 易位, 该易位导致分别定位于染色体 15q22 和 17q21 的病变蛋白与维 A 酸受体 (RAR) α 嵌合, 形成 PML-RAR α 融合基因^[2-4]。他米巴罗汀 (Tamibarotene) 化学名为 4-[(5, 6, 7, 8-四氢-5, 5, 8, 8-四甲基-2-萘基) 甲酰] 苯甲酸, 它是一个新的 RAR α 促进剂, 对复发或难治性急性前骨髓细胞性白血病 (即 APL) 具有显著的分化诱导能力, 从而可产生治疗作用。其片剂由日本新药株式会社研制开发, 于 2005 年在日本首次上市 (商品名: Amnolake, 规格: 2 mg)^[5-6], 该药口服后吸收迅速、疗效确切、副作用小^[7]。目前, 其仿制药我国有几家研发单位正在申

报临床, 国内市场空间巨大。为了保障药品质量和用药安全, 笔者参照 2015 年版《中国药典》(四部) “溶出度与释放度测定法”^[8] 和《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》^[9] 中的相关要求, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 建立了国产他米巴罗汀片的溶出度测定方法。

1 材料

1.1 仪器

600E-2487 型 HPLC 仪, 包括 600E 多溶剂输送系统 (有梯度控制器的高压输液泵)、在线脱气机、Rheodyne 7725i 手动进样阀、2487 双通道紫外检测器等 (美国 Waters 公司); ZRS-8G 型智能溶出试验仪 (天津市天大天发科技有限公司); AX105

研究[J]. 中国中医急症, 2014, 23(2): 271.
[6] 黄震华. 心力衰竭治疗现状和展望[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(5): 321.
[7] 赵海誉, 王秀坤, 陆景珊. 北葶苈子中挥发油及脂肪油类成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(6): 827.
* 讲师, 硕士研究生。研究方向: 仪器分析。电话: 0537-3617622。E-mail: hahachenlijiao@126.com
通信作者: 副研究员, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0531-58672115。E-mail: mls_zhaoyx@ujn.edu.cn

[8] 弓建红, 张艳丽, 冯卫生, 等. GC-MS 分析南葶苈子挥发油成分的研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(9): 1 942.
[9] 郭丹, 陈娜. HPLC 法鉴别南葶苈子和车前子[J]. 中国药房, 2009, 20(9): 683.
(收稿日期: 2016-01-14 修回日期: 2016-03-23)
(编辑: 张 静)

DR 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 药品与试剂

他米巴罗汀片(济南康和医药科技有限公司,批号:20130401、20130402、20130403,规格:2 mg);他米巴罗汀对照品(济南康和医药科技有限公司,批号:20130301S,纯度:99.9%);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[10]

色谱柱:Diamondsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-冰乙酸(85:15:1,V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:235 nm;柱温:25 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取对照品适量,精密称定,加甲醇 10 ml 使溶解,用溶出介质 pH6.8 磷酸盐缓冲液(取 0.2 mol/L 磷酸二氢钾溶液 250 ml,加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 118 ml,用水稀释至 1 000 ml,摇匀,即得)稀释制成每 1 ml 中含约 2 μg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,采用 2015 年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法”第二法(桨法),以 pH6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质,溶出介质体积为 900 ml,转速为 50 r/min,温度为(37±0.5)℃,依法操作,于 60 min 时取溶出液 10 ml,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 滤膜吸附试验

取按“2.2.1”项下方法制备的对照品溶液适量,作为滤过前溶液;取上述滤过前溶液适量,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为滤过后溶液。分别取滤过前、后溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量,以滤过前含量为 100%,计算滤膜吸附量。结果表明,0.45 μm 微孔滤膜对他米巴罗汀的吸附量<2.0%,符合规定^[9]。

2.4 专属性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和溶出介质各 20 μl,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。结果表明,供试品和对照品色谱中主峰的保留时间一致;各成分峰基线分离良好,且其他成分对主成分测定无干扰。

2.5 线性关系考察

取对照品约 10 mg,精密称定,置于 100 ml 量瓶中,加甲醇 10 ml 使溶解,以溶出介质 pH6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,精密量取 10 ml,置于 50 ml 量瓶中,用 pH6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取上述贮备液 2、3、4、5、6、7 ml,分别置于 50 ml 量瓶中,加 pH6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度,配制成质量浓度分别为 0.8~2.8 μg/ml 的系列对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以他米巴罗汀质量浓度(x , μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=101\,023x-1\,924.4$ ($r=0.999\,6$)。结果表明,他米巴罗汀检测质量浓度线性范围为 0.801~2.804 μg/ml。

2.6 精密度试验

2.6.1 仪器精密度 取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,他米巴罗汀峰面积的 RSD=0.25%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6.2 中间精密度 取同一批样品(批号:20130401)6 片,由不同人员分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,各 6 份,分别在不同仪器上(Waters 600 型和 Waters 2695 型 HPLC 仪)按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算溶出度。结果,他米巴罗

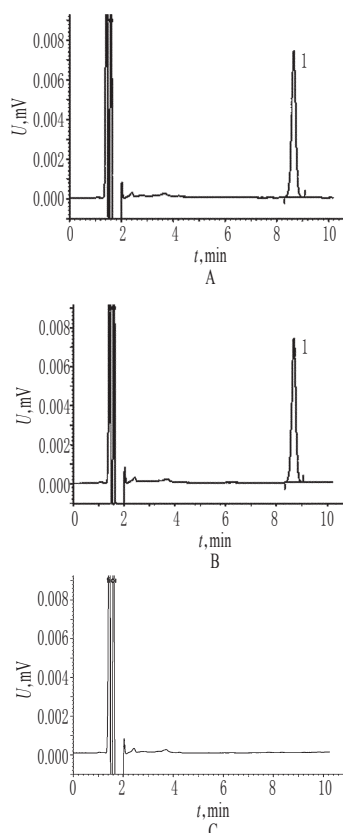


图 1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.溶出介质;1.他米巴罗汀

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.dissolution medium; 1.tamibarotene

汀片的平均溶出度分别为 98.42%、97.25%,RSD 分别为 2.06%、2.14%($n=6$),表明本方法的中间精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20130401)适量,分别于室温下放置 0、1、2、4、6、8 h 时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,他米巴罗汀峰面积的 RSD=0.37%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 8 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20130401)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,他米巴罗汀峰面积的 RSD=0.74%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取对照品约 12、16、20 mg,每种质量各 3 份,置于不同的 100 ml 量瓶中,再分别按样品处方比例混合辅料,加甲醇 10 ml 使溶解,加溶出介质 pH6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,滤过,分别精密量取续滤液 1 ml,置于 100 ml 量瓶中,加 pH6.8 磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算回收率,结果见表 1。

2.10 溶出度均匀性试验

取批号 20130401 的样品 6 片,各按“2.2.2”项下方法进行溶出度试验,分别在 5、15、30、45、60 min 时取溶出液 10 ml(同时补充溶出介质 10 ml),滤过,取续滤液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算他米巴罗汀在各时间点的累积溶出度(详见表 2),并绘制溶出曲线(详见图

2)。结果,6片样品溶出曲线趋势基本相同,在各时间点的累积溶出度的RSD均<2%,表明样品同一批次内的溶出度均一性良好。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)				
加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
12.73	12.78	100.39	100.30	0.25
12.82	12.86	100.31		
12.29	12.40	100.90		
16.18	16.24	100.37		
16.27	16.41	100.86		
16.66	16.76	100.60		
19.97	19.94	99.85		
20.31	20.27	99.80		
19.06	18.98	99.58		

表2 各时间点的累积溶出度测定结果(%)

Tab 2 Determination results of cumulative dissolution at each time point(%)								
取样时间 点,min	测定次数						平均累积溶出度	RSD
	1	2	3	4	5	6		
5	77.52	76.24	77.21	75.51	77.27	77.61	76.89	1.09
15	89.78	90.38	89.53	90.13	89.44	89.70	89.83	0.40
30	100.16	98.68	98.96	100.44	99.82	100.27	99.72	0.74
45	101.57	101.67	98.98	100.02	99.52	98.73	100.08	1.27
60	99.26	98.54	99.82	94.92	97.51	99.50	98.26	1.86

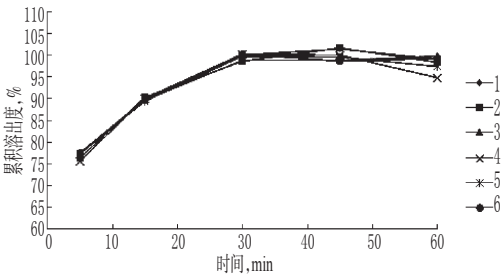


图2 溶出曲线
Fig 2 Dissolution curves

2.11 样品溶出度测定

取3批样品各6片,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算每片的溶出度及平均值(要求均≥标示量的75%),结果见表3。

表3 样品溶出度测定结果(n=6,%)

Tab 3 Determination results of dissolution of samples(n=6,%)							
样品批号	测定次数						平均值
	1	2	3	4	5	6	
20130401	99.10	97.95	97.83	99.61	96.69	98.32	98.25
20130402	98.67	96.01	99.12	99.68	94.28	91.48	96.54
20130403	92.31	90.30	92.86	93.10	92.44	93.25	92.38

3 讨论

3.1 溶出介质体积的选择

根据《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》^[9]的要求,口服固体制剂溶出度测定溶出介质体积一般采用900 ml或1 000 ml,方可符合漏槽条件,并能满足溶出度测定方法的要求。考虑到样品规格为2 mg,规格较小,为了提高灵敏度,笔者参考相关文献^[10],选用900 ml作为本试验溶出介质的体积。

3.2 溶出介质的选择

口服固体制剂溶出度测定所用溶出介质一般采用水、0.1 mol/L 盐酸溶液(pH1.0)、pH4.5 乙酸盐缓冲液和pH6.8 磷酸盐缓冲液等。本试验前期曾分别选用以上4种溶出介质进行预试验(其他试验条件不变),结果发现,他米巴罗汀在0.1 mol/L 盐酸溶液(pH1.0)和pH4.5 乙酸盐缓冲液介质中60 min时的溶出度均比较低,而在水和pH6.8 磷酸盐缓冲液介质中45~60 min时的溶出度比较高;进一步分析发现在水介质中的溶出曲线未出现拐点,而在pH6.8 磷酸盐缓冲液中溶出曲线有明显的拐点。故本试验最终选择了与文献[10]方法一致的溶出介质pH6.8 磷酸盐缓冲液。

3.3 转速的选择

本试验前期还对溶出度试验的转速进行了考察。通过比较发现以50 r/min作为转速,溶出速率已较快。在水、pH6.8 磷酸盐缓冲液中5 min时溶出度均>60%,15 min时均>80%,即50 r/min的转速可以满足本品溶出度测定要求。

3.4 测定方法的选择

当他米巴罗汀片溶于900 ml的pH6.8 磷酸盐缓冲液中时,主成分质量浓度约为2.2 μg/ml,值非常低,在紫外条件下的吸收度<0.1,会显著影响检测结果的准确性。故本试验最终选择了更为灵敏的HPLC法进行测定。

综上所述,本方法简便、准确,灵敏度高,专属性强,适用于他米巴罗汀片的溶出度测定。

参考文献

[1] 刘春燕.急性早幼粒细胞白血病的“克星”:全反式维甲酸[J].开卷有益:求医问药,2007(3):10.
[2] Ohnishi K. PML-RARalpha inhibitors (ATRA, tamibarotene, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia[J]. Int J Clin Oncol, 2007, 12(5):313.
[3] 王杰松,陈志哲.急性早幼粒细胞白血病的治疗现状[J].医学综述,2007,13(11):838.
[4] 杨立平.他米巴罗汀药理学研究进展[J].中华临床医学杂志,2008,9(7):57.
[5] Takeuchi M. Clinical experience with a new synthetic retinoid, tamibarotene (Am-80) for relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2006, 33(3):401.
[6] Davies SL, Castaner J, Capdevila LG. Tamibarotene[J]. Drugs Future, 2005, 30(7):688.
[7] 赖树清,须媚.急性早幼粒细胞性白血病治疗药:他米巴罗汀:tamibarotene[J].世界临床药物,2007,28(4):252.
[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:121-124.
[9] 国家食品药品监督管理局.普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[S].2009.
[10] 東光薬品工業(株).アムノレイク錠2mgに関する資料,新薬の承認に関する情報[EB/OL]. (2005-06) [2013-06].http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/P200500012/left.html.

(收稿日期:2015-12-02 修回日期:2016-09-17)

(编辑:周 箐)

相似因子法评价雷美替胺片自研制剂与原研制剂溶出曲线的相似性

张琳^{1*}, 刘葵葵¹, 李欣¹, 邢雪敏¹, 王伶^{2#} (1. 山东省药学科学院/山东省化学药物重点实验室, 济南 250101; 2. 山东福瑞达医药集团公司/山东省黏膜与皮肤给药技术重点实验室, 济南 250101)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4307-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.43

摘要 目的: 评价雷美替胺片自研制剂与原研制剂体外溶出行为的一致性。方法: 采用桨法, 转速为 50 r/min, 分别以水、pH1.2 盐酸溶液、pH4.0 乙酸盐缓冲液和 pH6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质, 用高效液相色谱法(HPLC)测定雷美替胺片自研制剂与原研制剂中主成分在不同时间点的累积溶出度, 并绘制溶出曲线, 进而采用相似因子(f_2)法评价二者溶出曲线的相似性。结果: 在 4 种溶出介质中, 雷美替胺片自研制剂与原研制剂的 f_2 分别为 62.8、80.0、77.7、76.2, 说明二者溶出曲线具有相似性。结论: 所建立的 HPLC 法适用于雷美替胺片的溶出度测定; 自研制剂与原研制剂的体外溶出行为相似, 初步说明自研制剂的处方和工艺具有合理性。

关键词 雷美替胺片; 自研制剂; 原研制剂; 高效液相色谱法; 相似因子; 溶出曲线; 评价

Similarity Evaluation of the Dissolution Profiles of Self-made and Original Preparation of Ramelteon Tablet by f_2

ZHANG Lin¹, LIU Kuikui¹, LI Xin¹, XING Xuemin¹, WANG Ling² (1. Shandong Academy of Pharmaceutical Science/Shandong Provincial Key Laboratory for Chemical Drug, Jinan 250101, China; 2. Shandong Freda Pharmaceutical Group Company/Shandong Provincial Key Laboratory of Mucosal and Transdermal Drug Delivery Technology, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the similarity of in vitro dissolution of self-made and original preparation of Ramelteon tablet. METHODS: The paddle method was adopted with rotational speed of 50 r/min, using water, pH1.2 hydrochloric acid solution, pH4.0 acetate buffer solution and pH6.8 phosphate buffer solution as dissolution media, HPLC was used to determine the cumulative dissolution of main components of self-made and original preparation of Ramelteon tablet at different time points, dissolution profile was drew, then f_2 was used to evaluate its similarity. RESULTS: In the 4 dissolution media, the f_2 of self-made and original preparation of Ramelteon tablet was 62.8, 80.0, 77.7, 76.2, respectively, which indicated that the dissolution profiles showed similarity. CONCLUSIONS: The established HPLC is suitable for the dissolution determination of Ramelteon tablet; the dissolution profiles of the self-made and original preparations are similar, it preliminary indicates the prescription and technological rationality of self-made preparation.

KEYWORDS Ramelteon tablet; Self-made preparation; original preparation; HPLC; f_2 ; Dissolution curve; Evaluation

雷美替胺(Ramelteon)是一种口服催眠药,由日本武田公司首研成功,于 2005 年 7 月通过美国食品与药品管理局(FDA)批准上市,片剂批准的规格为 8 mg,商品名 Rozerem[®][1]。该药是第一个临床应用于治疗失眠的褪黑素受体激动药,对褪黑素 MT₁和 MT₂受体具有高度亲和性,对 MT₃受体的亲和力很弱[2],主要用于治疗难以入睡型失眠症,对慢性失眠和短期失眠也有确切疗效[3-4]。

目前,国内尚未有雷美替胺片仿制制剂获批上市,也未见雷美替胺片溶出度测定或溶出曲线考察的相关文献报道。本研究建立了雷美替胺片溶出度测定的高效液相色谱法(HPLC),并考察了其自研制剂(受试制剂)与原研制剂(参比制剂)在 4 种溶出介质中的溶出曲线;同时,采用相似因子(f_2)法评价了二者溶出曲线的相似性,旨在为其自研制剂与原研制剂的质量一致性评价提供依据。

1 材料

* 工程师,硕士。研究方向:药物分析。电话 0531-88562280。E-mail: watasumi@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:新药研发。电话:0531-88562280。E-mail: lw6624@126.com

1.1 仪器

1260 型 HPLC 仪,包含二极管阵列检测器(DAD)、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱等(美国 Agilent 公司);ZRS-8G 型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);BT125D 型电子天平(德国 Sartorius 公司);pHSJ-3F 型酸度计(上海雷磁仪器厂);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

雷美替胺对照品(上海医药工业研究院,批号:131224,纯度:99.57%);雷美替胺片(山东省药学科学院自制批号:20130901,规格:8 mg);雷美替胺片(原研制剂,美国武田制药公司,批号:C18882,规格:8 mg);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent-ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液(pH5.0)-甲醇(30:70, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:288 nm;柱温:30 ℃;进样量:50 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取样品细粉适量(约含雷美替胺8 mg),精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相适量,超声处理5 min使溶解,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm 混合纤维素酯滤膜滤过,精密量取续滤液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 取对照品约8 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相振摇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取上述贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品处方比例称取除雷美替胺外的各辅料制备混合粉末,取约0.16 g,精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相适量,超声处理5 min使溶解,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm 混合纤维素酯滤膜滤过,精密量取续滤液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 溶出介质 水:纯化水;pH1.2盐酸溶液:精密量取盐酸7.65 ml,加水稀释至1 000 ml;pH4.0乙酸盐缓冲液:称取乙酸钠1.22 g,冰乙酸2.46 g,加水950 ml搅拌使乙酸钠溶解后再加水稀释至1 000 ml;pH6.8磷酸盐缓冲液:取磷酸二氢钾6.8 g、氢氧化钠0.896 g,加水适量搅拌使溶解后再加水稀释至1 000 ml。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液(自研制剂)和阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,该色谱条件下,供试品溶液中主峰保留时间与对照品溶液中主峰保留时间一致,而阴性对照在该保留时间处无干扰,说明本方法的专属性良好。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下对照品贮备液1、2、4、6、8、10、15 ml,置于100 ml量瓶中,分别用“2.2.4”项下4种溶出介质稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得雷美替胺在水、pH1.2盐酸溶液、pH4.0乙酸盐缓冲液、pH6.8磷酸盐缓冲液中的回归方程分别为 $y=30.178x+0.628\ 5$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=30.176x+0.569\ 8$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=30.179x+0.769\ 8$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=30.181x+0.885\ 6$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,4种溶出介质中雷美替胺检测质量浓度线性范围均为0.796 3~11.94 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 定量限考察

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液适量,分别稀释100倍、250倍和500倍后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,当信噪比为10:1时,测得雷美替胺的定量限为0.80 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,雷美替胺峰面积的RSD=1.14% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.10”项下自研制剂样品在4种溶出介质中30 min时的溶出液为供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,4种溶出介质制备的供试品溶液中雷美替胺峰面积的RSD分别为1.17%、1.38%、1.26%、1.54% ($n=6$),表明4种溶出介质制备

的供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。

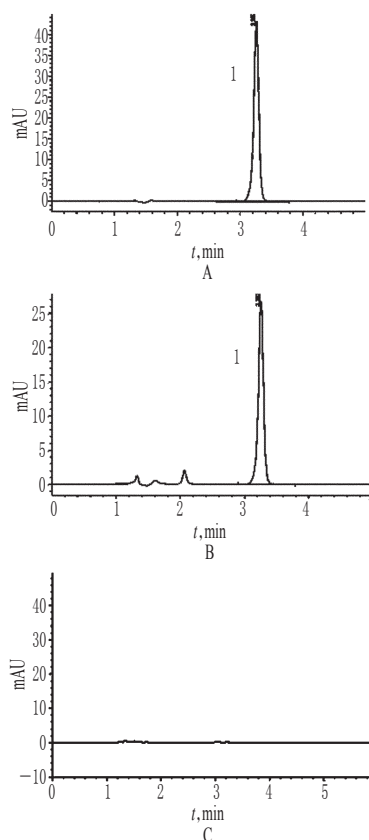


图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液;1.雷美替胺

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance solution; B.test sample solution; C.negative control solution; 1.ramelteon

2.8 重复性试验

精密称取自研制剂样品1.3 g,共6份,分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,雷美替胺的平均含量为6.04 mg/g, RSD=1.14% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取对照品约12、16、20 mg,各3份,精密称定,分别置于100 ml量瓶中,并按样品处方比例分别加入各辅料的混合粉末适量,再加流动相适量,超声处理5 min使溶解,放冷,加流动相稀释至刻度,制成含雷美替胺低、中、高3种质量浓度的溶液,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 ml,共4份,置于不同的25 ml量瓶中,分别用“2.2.4”项下4种溶出介质稀释至刻度,摇匀,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算雷美替胺的回收率,结果见表1。

2.10 溶出度测定及溶出曲线绘制

参考FDA溶出度方法数据库中雷美替胺片的溶出度测定条件^[5]及2015年版《中国药典》(四部)“0931溶出度与释放度测定法”的要求^[6],并参考《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》附录中的规定,本试验采用桨法,分别选用水、pH1.2盐酸溶液、pH4.0乙酸盐缓冲液、pH6.8磷酸盐缓冲液4种溶出介质进行溶出试验,溶出介质体积为900 ml,转速为50 r/min,温度为37 $^{\circ}\text{C}$,依法操作,分别于5、10、15、20、30、45、60 min时取溶出液5 ml(取液后及时补充溶出介质5 ml),用0.45 μm 混合纤维素酯滤膜滤过,取续滤液适量,按“2.1”项下色谱条

表1 回收率试验结果($n=9$)
Tab 1 Results of recovery test($n=9$)

溶出 介质	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
水	12.28	12.19	99.27	99.55	0.35
	12.11	12.06	99.59		
	12.06	12.09	100.25		
	16.15	16.04	99.32		
	16.03	15.89	99.13		
	16.08	16.04	99.75		
	20.09	20.01	99.60		
	20.10	20.03	99.65		
	20.16	20.04	99.40		
	20.16	20.04	99.40		
pH1.2盐酸溶液	12.05	12.02	99.74	99.19	0.79
	12.07	11.99	99.31		
	12.59	12.69	100.79		
	16.57	16.33	98.53		
	16.59	16.52	99.58		
	16.72	16.59	99.22		
	20.03	19.79	98.80		
	19.96	19.63	98.35		
	20.09	19.77	98.41		
	20.09	19.77	98.41		
pH4.0乙酸盐缓冲液	12.13	12.09	99.67	99.30	0.50
	12.25	12.23	99.84		
	12.37	12.31	99.51		
	16.06	16.01	99.69		
	16.39	16.24	99.08		
	15.98	15.91	99.56		
	20.17	20.07	99.50		
	20.03	19.69	98.30		
	20.07	19.78	98.56		
	20.07	19.78	98.56		
pH6.8磷酸盐缓冲液	12.58	12.51	99.44	99.52	0.33
	11.97	11.95	99.83		
	12.16	12.06	99.18		
	16.14	16.15	100.06		
	16.25	16.17	99.51		
	16.03	15.94	99.44		
	20.03	19.94	99.55		
	20.08	19.89	99.05		
	20.19	20.12	99.65		
	20.19	20.12	99.65		

件进样测定,记录峰面积并按外标法计算雷美替胺在各时间点的累积溶出度,并绘制溶出曲线。雷美替胺片自研制剂与原研制剂(各取12片进行试验)在各溶出介质中的平均累积溶出度测定结果见表2,溶出曲线见图2。

2.11 f_2 法评价溶出曲线的相似性

f_2 法是美国FDA推荐的用于评价两条溶出曲线是否具有相似性的方法,其通过将自研制剂(受试制剂)与原研制剂(参比制剂)两组累积溶出度数据代入公式进行计算,得到 f_2 。若 f_2 在50~100之间,即可认为两条溶出曲线相似;若 $f_2<50$,即可认为两条溶出曲线不相似^[7]。 f_2 计算公式如下:

$$f_2=50\lg\sqrt{\frac{100}{1+\frac{\sum_{i=1}^n(R_i-T_i)^2}{n}}}$$

式中, R_i 和 T_i 分别代表参比和受试制剂第 t 时间点的平均累积溶出度; n 代表选取计算时间点数。本试验选取雷美替胺片自研制剂与原研制剂5~20 min时的平均累积溶出度进行 f_2 计算和相似性评价,结果见表3。

3 讨论

表2 雷美替胺片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的平均累积溶出度测定结果($n=12$,%)

Tab 2 Determination results of average cumulative dissolution of self-made and original preparations of Ramelteon tablet in each dissolution medium ($n=12$,%)

溶出 介质	样品	平均累积溶出度						
		取样时间,min						
		5	10	15	20	30	45	60
水	原研制剂	12.3	47.1	74.0	88.1	94.1	97.1	97.0
	自研制剂	19.7	49.1	80.5	92.3	97.2	98.4	99.1
pH1.2盐酸溶液	原研制剂	16.3	52.1	79.3	87.4	92.7	94.1	94.4
	自研制剂	18.6	54.7	80.8	90.1	93.7	94.9	96.7
pH4.0乙酸盐缓冲液	原研制剂	16.0	53.1	82.2	90.8	95.4	95.6	97.6
	自研制剂	17.3	57.5	80.5	92.6	97.4	98.3	99.1
pH6.8磷酸盐缓冲液	原研制剂	20.4	68.1	89.1	93.8	95.2	95.7	98.1
	自研制剂	24.9	65.5	89.4	92.7	97.1	96.8	99.1

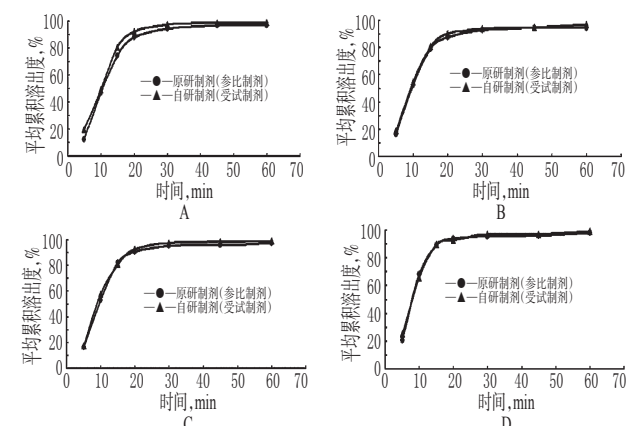


图2 雷美替胺片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的溶出曲线($n=12$)

A.水;B.pH1.2 盐酸溶液;C.pH4.0 乙酸盐缓冲液;D.pH6.8 磷酸盐缓冲液

Fig 2 The cumulative dissolution profiles of self-made and original preparations of Ramelteon tablet in each dissolution medium($n=12$)

A.water;B.pH1.2 hydrochloric acid solution;C.pH4.0 acetate buffer solution;D.pH6.8 phosphate buffered solution

表3 雷美替胺片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的溶出曲线相似性评价结果

Tab 3 Results of similarity evaluation of dissolution profiles of self-made and original preparations of Ramelteon tablet in each dissolution medium

溶出介质	f_2	相似性评价
水	62.8($n=4$)	相似
pH1.2盐酸溶液	80.0($n=4$)	相似
pH4.0乙酸盐缓冲液	77.7($n=4$)	相似
pH6.8磷酸盐缓冲液	76.2($n=3$)	相似

3.1 流动相的选择

雷美替胺解离常数(pK_a)为-0.84^[8],流动相pH调节至弱酸性范围内均可得到较理想的色谱峰形。本试验以pH5.0的磷酸二氢钠缓冲液与甲醇体系为流动相,得到的色谱峰理论板数可达8 000以上,对称因子在0.90~1.10之间,可对色谱峰进行准确积分。另外,因溶出曲线考察测定样本数量较多,为了达到大量样品快速分析的目的,该流动相中有机相占有较

高的比例(70%),可加快主峰的洗脱,缩短运行时间。

3.2 测定波长的选择

采用HPLC法进行试验前,应首先对其测定波长进行确定。取“2.2”项下对照品贮备液、供试品溶液和阴性对照溶液制备过程中的过滤液,在200~400 nm波长范围内扫描。结果显示,对照品和供试品中雷美替胺的最大吸收波长均为288 nm,阴性对照在288 nm波长处无干扰,因此本试验选择288 nm为溶出度测定波长。

3.3 过滤器吸附量的研究

进行溶出试验时,过滤装置对主成分可能有一定的吸附作用,因此有必要研究在取续滤液进行测定前需要弃除多少体积的初滤液,以保证续滤液中主成分的质量浓度与过滤前主成分的质量浓度一致。取“2.2.1”项下供试品溶液适量,用过滤器(内含直径为25 mm、孔径为0.45 μm 混合纤维素酯滤膜)滤过,分别弃除0、1、2、3、4 ml的初滤液,取续滤液按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积分别为357.03、356.91、356.50、355.32、353.40。可见峰面积无明显变化,说明过滤器对雷美替胺几乎无吸附作用,取溶出液经滤过后弃除适量初滤液即可。

3.4 自研制剂与原研制剂溶出曲线相似性评价的意义

由雷美替胺片原研制剂在4种溶出介质中的溶出曲线考察结果可知,20 min时其在4种介质中的平均累积溶出度均>85%,在30 min后其累积溶出度到达平台期;且其在水、pH1.2盐酸溶液及pH4.0乙酸盐缓冲液中各时间点的平均累积溶出度无明显差别,在pH6.8磷酸盐缓冲液中15 min之前的平均累积溶出度略高于其他3种介质(这可能与雷美替胺的 pK_a 有关)。研究人员在进行雷美替胺片自研制剂的处方工艺研究时应以原研制剂为目标,确保自研制剂至少在上述4种介质中均与原研制剂保持溶出一致性,从而为实现二者的生物等效奠定基础。本试验溶出曲线相似性评价结果显示,雷美替胺片自研制剂与原研制剂在4种不同溶出介质中的溶出曲线具有相似性,可初步判断该自研制剂处方和工艺具有合理性。

3.5 f_2 计算选取时间点原则的探讨

进行 f_2 计算时,选取计算的时间点有一定原则,所选时间点间隔可不相等,但两对比制剂所取的时间点必须一致,计算时间点为3~5个之间,且需选择平均累积溶出度>85%的时间点应不多于1个^[9]。根据雷美替胺片在4种溶出介质中的不同累积溶出度数据,笔者最终选取的计算时间点分别为:水、pH1.2盐酸溶液、pH4.0乙酸盐缓冲液介质中选取了5、10、15、20 min 4个时间点,pH6.8磷酸盐缓冲液介质中选取了5、10、15 min 3个时间点。

3.6 仿制药的质量一致性评价及目前的要求

目前,国家食品药品监督管理总局开始要求对2007年前

获得生产批件的口服固体药物仿制制剂进行质量和疗效一致性评价^[10],要求通过采用全面的体外溶出度试验来对其内在质量进行评估,主要目的是保证其对于不同患者均能具有较高的生物利用度。另外,国内申报仿制药时均要求对自研制剂与原研制剂进行多介质的溶出曲线对比,以保证自研制剂在体外溶出行为上与原研制剂的一致性,从而初步反映自研制剂的处方和工艺的合理性,由此给仿制药初期的工艺开发提供一种快速、便捷的指导。

参考文献

- [1] 叶敏,吕林,徐啸晨.治疗失眠症新药雷美替胺[J].中国新药杂志,2006,15(15):1309.
- [2] Nancy N, Nguyen SS, Jessica C. Ramelteon: a novel melatonin receptor agonist for the treatment of insomnia[J]. *Formulary*, 2005, 40(5):358.
- [3] Pandi-Perumal SR, Zisapel N, Srinivasan V, et al. Melatonin and sleep in aging population [J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(2):911.
- [4] FDA. RozeremTM(ramelteon tablets) Label[EB/OL].(2010-09-11)[2014-05-11].http://www.accessdata.fda.gov/drugs-atfda_docs/label/2010/021782s011b1.pdf.
- [5] FDA. Dissolution methods database[EB/OL].(2014-11-13)[2015-09-26].http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:121-124.
- [7] 程怡,裘建设,胡瑞标,等. f_2 因子法评价头孢克洛干混悬剂溶出曲线的相似性[J].中国新药杂志,2012,21(20):2437.
- [8] Reddy IU, Rao PN, Reddy VR, et al. Stability-indicating UPLC determination of Ramelteon and their degradation products in active pharmaceutical ingredients[J]. *J Liq Chromatog RT*, 2012, 35(5):688.
- [9] 谢沐风,操洪欣.溶出度测定中的若干问题[J].中国医药工业杂志,2006,37(12):859.
- [10] 国家食品药品监督管理总局.国家食品药品监督管理总局关于征求《关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见(征求意见稿)》意见的公告:2015年第231号[EB/OL].(2015-11-18).[2016-03-26].<http://www.sda.gov.cn/W501/CL0778/135400.html>.

(收稿日期:2015-10-31 修回日期:2016-09-09)

(编辑:周 簪)

琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂溶出曲线的相似性评价

龚俊强^{1,2*}, 陈仙², 徐彩虹², 张霞³, 吴春梅², 王萍², 傅旭春^{1#} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 浙江华义医药有限公司, 浙江义乌 320002; 3. 华东医药生物工程研究所, 杭州 310011)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4311-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.44

摘要 目的: 考察琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂溶出曲线的相似性, 为前者的处方和工艺筛选以及与后者的质量一致性评价提供参考。方法: 采用桨法, 转速为 50 r/min, 分别以水、pH1.2 盐酸溶液、pH4.5 乙酸盐缓冲液和 pH6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质进行溶出度试验, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂中主成分在不同时间点的累积溶出度, 并绘制溶出度曲线, 进而采用相似因子(f_2)法评价二者溶出曲线的相似性。结果: 在 4 种溶出介质中, 琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂的 f_2 均 > 50, 说明二者溶出曲线具有相似性。结论: 所建立的 HPLC 法适用于琥珀酸索利那新片的溶出度测定; 自研制剂与原研制剂的溶出行为基本一致, 一定程度说明自研制剂的处方和工艺具有可行性。
关键词 琥珀酸索利那新片; 自研制剂; 原研制剂; 高效液相色谱法; 溶出曲线; 相似因子法; 评价

Similarity Evaluation of Dissolution Profiles of Self-development and Original Preparation of Solifenacin Succinate Tablet

GONG Junqiang^{1,2}, CHEN Xian², XU Caihong², ZHANG Xia³, WU Chunmei², WANG Ping², FU Xuchun¹ (1. College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Huayi Pharmaceutical Co., Ltd., Zhejiang Yiwu 320002, China; 3. Huadong Biological Engineering Research Institute, Hangzhou 310011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the similarity of dissolution profiles of self-development and original preparation of Solifenacin succinate tablet, and provide reference for the prescription and process screening of the former one and the quality similarity evaluation of the latter one. METHODS: The paddle method was adopted with rotational speed of 50 r/min, using water, pH1.2 hydrochloric acid solution, pH4.0 acetate buffer solution and pH6.8 phosphate buffer solution as dissolution media, HPLC was used to determine the cumulative dissolution of main components of self-development and original preparation of Solifenacin succinate tablet at different time points, dissolution profile was drew, then f_2 was used to evaluate its similarity. RESULTS: In the 4 dissolution media, the f_2 of both self-development and original preparation of Solifenacin succinate tablet was higher than 50, which indicated that the dissolution profiles showed similarity. CONCLUSIONS: The established HPLC is suitable for the dissolution determination of Solifenacin succinate tablet; the dissolution profiles of the self-development and original preparations are basically similar, which indicates the prescription and technology of self-development preparation are feasible.
KEYWORDS Solifenacin succinate tablet; Self-development; Original preparation; HPLC; Dissolution profiles; f_2 similarity factor; Evaluation

琥珀酸索利那新(Solifenacin succinate)是由日本安斯泰来制药公司开发,其片剂商品名为卫喜康(Vesicare),2004年8月首次在欧洲上市,同年11月获美国食品与药品管理局(FDA)许可在美国上市,2009年9月在我国获得上市许可。该药通过阻滞膀胱平滑肌的毒蕈碱M₃受体来抑制逼尿肌的过度活动,从而缓解膀胱过度活动症(OAB)伴随的急迫性尿失禁、尿急和尿频症状。该药具有高度膀胱选择性和M₃受体选择性,临床疗效确切,口干等副作用相对较少,患者耐受性好^[1]。因此,包括中国、美国等多个国家的泌尿外科疾病诊断治疗指南都已将该药列为治疗OAB的一线药物^[2-3]。

* 工程师,硕士研究生。研究方向:药物制剂研发。E-mail: 47160688@qq.com
通信作者:教授,博士。研究方向:新药研发和药动学。E-mail: fuxc@zucc.edu.cn

本研究中,笔者参考国家食品药品监督管理总局(CFDA)发布的《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》^[4]和FDA溶出度方法数据库^[5]等,对琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂在水、pH1.2盐酸溶液、pH4.5乙酸盐缓冲液和pH6.8磷酸盐缓冲液4种溶出介质中溶出曲线的相似性进行了评价,旨在为其自研制剂的处方和工艺筛选以及与原研制剂的质量一致性评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪,含自动进样器、光电二极管阵列检测器[沃特世科技(上海)有限公司];XS205DU型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];ZRS-8L型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

琥珀酸索利那新对照品(埃斯特维华义制药有限公司,批号:13-601,纯度:99.9%);琥珀酸索利那新原料药(埃斯特维华义制药有限公司,批号:130401,纯度:99.2%);琥珀酸索利那新片原研制剂[商品名:卫喜康,安斯泰来制药(中国)有限公司,批号:12I22/03,规格:5 mg];琥珀酸索利那新片自研制剂(浙江华义医药有限公司,批号:130901,规格:5 mg);盐酸、氢氧化钠、乙酸、乙酸钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸(均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,默克股份两合公司);试验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry Shield RP18(150 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相:0.05 mol/L磷酸氢二钾缓冲液(pH6.0)-乙腈(65:35, V/V);流速:1 ml/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;检测波长:210 nm;进样量:50 μ l。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取琥珀酸索利那新对照品约25 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,以水-乙腈(70:30, V/V)溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为0.5 mg/ml的对照品贮备液。精密量取上述贮备液1.0 ml,置于100 ml量瓶中,用水-乙腈(70:30, V/V)稀释至刻度,制成质量浓度为5 μ g/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取自研制剂样品,按2015年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法”第二法(桨法)^[6],以900 ml水为溶出介质,转速为50 r/min,温度(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C,依法操作,经30 min后,取溶出液适量,滤过,取续滤液3.5 ml与1.5 ml乙腈混匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按自研制剂处方取空白辅料适量,按“2.2.2”项下方法进行操作,制成阴性对照溶液。

2.2.4 溶出介质的制备 水:纯化水;pH1.2盐酸溶液:取盐酸7.65 ml,加水稀释至1 000 ml,摇匀,即得;pH4.5乙酸盐缓冲液:取2 mol/L乙酸溶液(取120.0 g冰乙酸用水稀释至1 000 ml,即得)14.0 ml和乙酸钠2.99 g,加水溶解并稀释至1 000 ml,摇匀,即得;pH6.8磷酸盐缓冲液:取0.2 mol/L磷酸二氢钾溶液(取27.22 g磷酸二氢钾,用水溶解并稀释至1 000 ml,即得)250 ml和0.2 mol/L氢氧化钠溶液(取8.00 g氢氧化钠,用水溶解并稀释至1 000 ml,即得)112.0 ml,加水稀释至1 000 ml,摇匀,即得。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,对照品与供试品的主峰保留时间一致,阴性对照在此波长下无干扰。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,用水-乙腈(70:30, V/V)

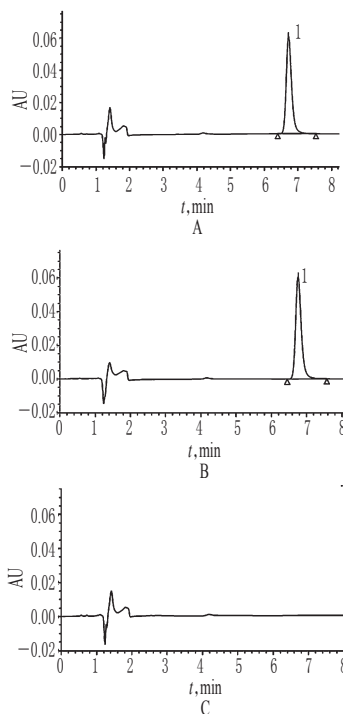


图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液;1.琥珀酸索利那新

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance solution; B. test sample solution; C.negative control solution; 1.solifenacin succinate

稀释成质量浓度约为0.4、0.8、2.0、3.2、4.0、4.8和5.6 μ g/ml的系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以待测成分质量浓度(x, μ g/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=133\ 495x-6\ 840$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,琥珀酸索利那新检测质量浓度线性范围为0.4~5.6 μ g/ml。

2.5 精密度试验

取“2.4”项下0.4、4.0、5.6 μ g/ml 3种质量浓度的琥珀酸索利那新对照品溶液适量,分别按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,琥珀酸索利那新峰面积的RSD分别为0.88%、0.20%、0.17%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取自研制剂样品,以水、pH1.2盐酸溶液、pH4.5乙酸盐缓冲液和pH6.8磷酸盐缓冲液4种溶出介质,分别按“2.2.2”项下方法进行溶出度试验并制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,4种溶出介质中琥珀酸索利那新峰面积的RSD分别为0.45%、0.68%、0.70%和1.08%($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取自研制剂样品,每次6片,按“2.2.2”项下方法进行溶出度试验并制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算其溶出度,重复测定6次。结果,琥珀酸索利那新溶出度的平均值为97.60%,RSD=0.89%($n=6$),表明本方法重复

性良好。

2.8 回收率试验

根据自研制剂处方,按处方量50%、80%、100%精密称取琥珀酸索利那新对照品,辅料按处方量100%称取,每个水平各3份,按“2.2.2”项下方法进行溶出度试验并制备供试品溶液;另取琥珀酸索利那新对照品适量,精密称定,以水-乙腈(70:30, V/V)溶解并稀释制成与供试品溶液质量浓度相近的对照品溶液。分别取上述两种溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)				
加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
2.51	2.53	100.80	100.46	0.41
2.53	2.53	100.00		
2.54	2.56	100.78		
4.02	4.05	100.74		
3.99	4.01	100.50		
4.03	4.06	100.74		
5.01	5.04	100.59		
5.00	5.02	100.40		
5.02	5.00	99.60		

2.9 溶出度测定及溶出曲线绘制

按2015年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法”第二法(桨法)进行溶出试验^[6],分别以900 ml水、pH1.2盐酸溶液、pH4.5 乙酸盐缓冲液和pH6.8磷酸盐缓冲液作为溶出介质,转速50 r/min,温度(37.0±0.5)℃,依法操作,分别于5、10、15、20、30、45 min时取溶出液10 ml(即时在溶出杯中补加10 ml溶出介质),经0.45 μm微孔滤膜滤过后,取续滤液3.5 ml与1.5 ml乙腈混匀,制成供试品溶液;另取琥珀酸索利那新对照品适量,按“2.2.1”项下方法制成对照品溶液。分别取上述两种溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算各时间点的累积溶出度,绘制溶出曲线,结果见表2和图2。

2.10 溶出曲线的相似性评价

采用FDA推荐的相似因子(f_2)法,分别考察在4种溶出介质中琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂溶出曲线的相似性。 f_2 计算公式为:

$$f_2=50\cdot\log\{1+(1/n)\sum_{t=1}^n(R_t-T_t)^2\}^{-0.5}\cdot100$$

式中, R_t 为原研制剂(参比制剂) t 时间的平均累积溶出度; T_t 为自研制剂(受试制剂) t 时间的平均累积溶出度; n 为取样时间点个数($n=3\sim5$,且 $R_t>85\%$ 的点不超过1个,因此本研究选取5、10、15、30 min时的平均累积溶出度进行计算)。 f_2 取值在0~100之间,FDA规定当 f_2 值在50~100之间时,表明两种制剂的溶出曲线相似,且值越大相似度越高。经计算,琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂在4种溶出介质中溶出曲线的 f_2 均>50,说明二者溶出曲线具有相似性。琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中溶出曲线的见表3。

表2 琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的平均累积溶出度(n=12,%)

Tab 2 Average cumulative dissolution of self-development and original preparations of Solifenacin succinate tablet in each dissolution medium(n=12,%)

样品	溶出介质	取样时间,min					
		5	10	15	20	30	45
原研制剂	水	23	60	83	94	98	97
	pH1.2盐酸溶液	21	50	72	86	100	102
	pH4.5乙酸盐缓冲液	22	51	71	85	97	101
	pH6.8磷酸盐缓冲液	24	51	75	87	94	98
自研制剂	水	26	58	75	89	96	97
	pH1.2盐酸溶液	20	51	75	89	99	100
	pH4.5乙酸盐缓冲液	21	40	63	80	98	101
	pH6.8磷酸盐缓冲液	22	50	73	88	96	98

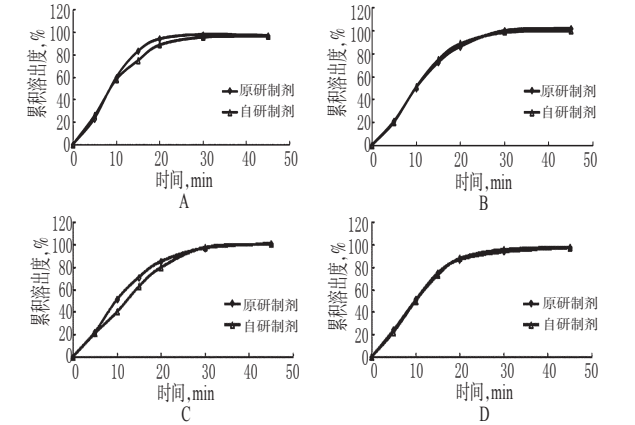


图2 琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中的溶出曲线(n=12)

A.水;B.pH1.2 盐酸溶液;C.pH4.5 乙酸盐缓冲液;D.pH6.8 磷酸盐缓冲液

Fig 2 The cumulative dissolution profiles of self-development and original preparations of Solifenacin succinate tablet in each dissolution medium(n=12)

A. water; B. pH1.2 hydrochloric acid solution; C. pH4.0 acetate buffer solution; D. pH6.8 phosphate buffered solution

表3 琥珀酸索利那新片自研制剂与原研制剂在各溶出介质中溶出曲线的 f_2 (n=4)

Tab 3 The f_2 of dissolution profiles of self-development and original preparations of Solifenacin succinate tablet in each dissolution medium(n=4)

溶出介质	f_2
水	67
pH1.2盐酸溶液	85
pH4.5乙酸盐缓冲液	58
pH6.8磷酸盐缓冲液	84

3 讨论

体外溶出度试验常用于指导药物制剂的研发,评价制剂批间、批内质量的一致性,以及评价药品处方工艺变更前后质量和疗效的一致性。已有数据表明,若仿制制剂体外多条溶出曲线与原研制剂皆一致,则二者体内生物利用度一致的

概率高^[7]。琥珀酸索利那新血药峰浓度($c_{\max}$)在口服后3~8 h达到^[8],该药体内生理pH介质下30 min已经完全溶出,故其体外溶出曲线更重要的意义在于为制剂处方和工艺的开发及优化提供参考。尤其对于小规格口服固体制剂而言,原辅料的混合均匀性、片重和硬度差异等均会对溶出曲线和片间溶出差异产生较大影响。

3.1 溶出介质的选择

固体制剂口服给药后,药物的吸收取决于药物从制剂中的溶出或释放、药物在生理条件下的溶解以及在胃肠道的渗透。溶出度试验应尽可能在生理条件下进行,这样可以从药品体内行为的角度,更好地理解体外溶出数据^[9],且溶出介质中药物溶解性应满足漏槽条件的要求。预试验中,取琥珀酸索利那新原料药约1 g,分别加入1 ml水、pH1.2盐酸溶液、pH4.5乙酸盐缓冲液和pH6.8磷酸盐缓冲液中,37℃恒温,均迅速溶解,呈无色透明黏稠状溶液,表明琥珀酸索利那新在所选取的不同pH介质中均易溶,溶解性为非pH依赖型,完全满足漏槽条件。故参考CFDA发布的《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》,最终选择水、pH1.2盐酸溶液、pH4.5乙酸盐缓冲液和pH6.8磷酸盐缓冲液作为溶出介质。

3.2 溶出方法和转速的选择

3.2.1 溶出方法的选择 取原研制剂(12片),按2015年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法”项下第一法(篮法)与第二法(桨法)进行溶出试验^[6],以水为溶出介质,溶出介质体积为900 ml,转速为50 r/min,分别在5、10、15、20、30、45 min时取溶出液10 ml(即时在溶出杯中补加10 ml溶出介质),经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液3.5 ml与1.5 ml乙腈混匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各取样时间点琥珀酸索利那新的累积溶出度。结果表明,采用篮法与桨法在各取样时间点的平均累积溶出度基本一致,因片剂溶出度测定一般采用桨法,故本试验最终选用桨法。

3.2.2 转速的选择 取原研制剂(12片),按2015年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法”项下第二法(桨法)^[6],以水为溶出介质,溶出介质体积为900 ml,转速分别为50、75 r/min,余按“3.2.1”项下方法操作,进样测定并计算各取样时间点琥珀酸索利那新的累积溶出度。结果表明,转速为75 r/min时溶出偏快,15 min时间点平均累积溶出度>85%,导致溶出曲线的区分能力较差;而当转速为50 r/min时,溶出速率较为合适,故本试验最终选择转速为50 r/min。

3.3 本研究的成果

本研究建立了琥珀酸索利那新片溶出度测定的HPLC法。经验证,本方法准确性好、灵敏度高,适用于琥珀酸索利那新片的溶出度测定。同时,本研究建立了具有区分力的琥珀酸索利那新片的溶出试验方法^[10],为琥珀酸索利那新片自研制剂的处方和工艺筛选以及与原研制剂的质量一致性评价提供了试验依据。研究表明,自研制剂与原研制剂溶出行行为基本一致,一定程度说明自研制剂的处方和工艺具有可行性,但二者的体内生物利用度和生物等效性是否一致还有待进一步考察。

参考文献

- [1] 郑建洪,黄红萍.治疗膀胱过度活动症的新药索利那新[J].中国新药与临床杂志,2013,32(10):771.
- [2] 那彦群,叶章群,孙颖浩,等.中国泌尿外科疾病诊断治疗指南:2014版[M].北京:人民卫生出版社,2013:330-333.
- [3] Apostolidis A. Antimuscarinics in the treatment of OAB: is there a first-line and a second-line choice?[J]. *Current Drug Targets*,2015,16(11):1 187.
- [4] 国家食品药品监督管理总局.普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[EB/OL]. (2015-02-05) [2015-06-06]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0087/114286.html>.
- [5] FDA. *Dissolution Methods Database: Solifenacin Succinate Tablets*[EB/OL]. (2008-02-19) [2015-07-06].<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm>.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:121-124.
- [7] 林兰,牛剑钊,许明哲,等.国外仿制药一致性评价比较分析[J].中国新药杂志,2013,22(21):2 470.
- [8] 刘军,姚建.新型毒蕈碱受体拮抗剂 solifenacin 治疗膀胱过动症[J].世界临床药物,2006,27(1):39.
- [9] 张启明,谢沐风,宁保明,等.采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J].中国医药工业杂志,2009,40(12):946.
- [10] 谢沐风.具有区分力的溶出曲线[J].中国医药工业杂志,2014,45(7):687.

(收稿日期:2015-11-04 修回日期:2016-09-14)

(编辑:周 簪)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅

基于应用型人才培养的《药物化学实验》教学体系的构建^Δ

赵建国*,曲伟红,余敬谋,张磊,吕璐(九江学院药学与生命科学学院,江西九江 332000)

中图分类号 G640 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4315-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.45

摘要 目的:为提高《药物化学实验》教学效果,培养出符合医药行业需求的应用型人才提供参考。方法:从我院药物制剂专业的培养目标出发,论述构建《药物化学实验》教学体系的基本思路,详细分析《药物化学实验》的教学目标、教学内容、教学过程和实验成绩评价等内容。结果:构建了以知识、能力与素质的提高作为教学目标,以基础实验、综合性和设计性实验、开放性实验3个模块为教学内容,从课前、课中和课后3个阶段开展以实践教学为中心,采取多元化的成绩评价为手段的实验教学体系。结论:所构建的实验教学体系适应于药物制剂专业《药物化学实验》的教学,开创了将专业教育、创新能力教育与素质教育有机融合于教育教学活动的新局面,调动了学生的学习积极性与主动性,巩固了学生的专业知识和专业技能,培养了学生的创新能力和综合素质,提升了实验教学效果。

关键词 应用型人才;药物化学;实验教学体系

Establishment of Teaching System of *Medicinal Chemistry Experiment* Based on Practical Talents Cultivation

ZHAO Jianguo, QU Weihong, YU Jingmou, ZHANG Lei, LYU Lu (College of Pharmaceutical and Life Science, Jiujiang University, Jiangxi Jiujiang 332000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for improving teaching effects of *Medicinal Chemistry Experiment*, and cultivating practical talents that in line with needs of the pharmaceutical industry. METHODS: Based on the training target of medicinal preparation major in our college, the basic idea of establishing *Medicinal Chemistry Experiment* system was discussed, and teaching target, content, process and experimental evaluation results of *Medicinal Chemistry Experiment* were analyzed in detail. RESULTS: The experiment teaching system was established, with teaching target of improving knowledge, ability and quality, teaching contents of basic experiment, comprehensive experimental design experiment and open experiment, center of developing practical teaching from before class, in class and after class, and means of diversified performance evaluation. CONCLUSIONS: The established experiment teaching system is suitable for the teaching of *Medicinal Chemistry Experiment* in medicinal preparation major, it has created a new situation that professional, innovation and quality education organic integrate in teaching activity, mobilized the students' learning enthusiasm and initiative, exercised the students' professional knowledge and practical ability, cultivated students' creative ability and comprehensive quality and enhanced the effect of experiment teaching.

KEYWORDS Practical talent; Medicinal chemistry; Experiments teaching system

目前,我国医药院校专业人才的培养目标是培养应用型人才,其核心是培养科技创新能力,同时具备扎实的专业知识和较强的综合素质“下得去、用得上、留得住”^[1-2]。我校药物制剂专业的培养目标是培养掌握药学、药剂学和药物制剂工程学等基本理论、基本知识和基本技能,具备制剂工艺设计、剂型改造、车间工艺设计等基本能力,能够在药物制剂及其相关部门从事制剂的开发研制、工艺设计、质量控制、技术改造、生产管理及营销等工作,具有创新意识和创业精神的高素质应

用型人才。《药物化学实验》是该专业的主修课程之一,通过理论和实验教学,学生掌握药物制备中常用反应的原理、实验操作技能和基本实验方法,为药物制剂专业的后续学习打下基础。但在实际教学过程中,由于实验室仪器、实践基地等条件制约,教学多重理论轻实践。同时,教师往往采用“照单抓药”式教学,操作无新意,亦无挑战性,且以实验报告成绩作为实验成绩,只是训练学生的机械操作技能,忽视了学生的创新能力和综合素质的发展。本课题组以药物制剂专业的《药物化学实验》课程为研究对象,以应用型人才培养为导向,对《药物化学实验》的教学体系进行探讨,以提高教学效果,培养出符合医药行业需求的应用型人才。

^Δ 基金项目:江西省高等学校教学改革研究省级课题(No. JXJG-14-17-20)

* 副教授,硕士。研究方向:药学教学与药物质量标准。E-mail: zhaojg10000@163.com

1 《药物化学实验》教学体系构建的基本思路

药物制剂专业的《药物化学实验》教学体系的构建以应用型人才培养为目标,坚持专业教育、创新能力教育与素质教育有机融合于教育教学活动的各个环节中,以教学内容和教学过程为中心,以实验成绩评价为手段,形成具有药物制剂特色的《药物化学实验》教学体系。

2 《药物化学实验》教学体系的构建内容

2.1 教学目标

根据药物制剂专业的培养目标,结合我校药物制剂专业学情^[3],将教学目标细分为知识目标、能力目标和素质目标,使学生的知识、能力和素质均得到提高,以满足该专业应用型人才

2.1.1 知识目标 学生通过实验,在巩固所学物理论识的基础上,熟练掌握典型药物的合成工艺、药物合成中的典型化学反应(氧化、还原、水解、酯化、中和等基本方法)及其基本操作,掌握精制的原理与操作,熟悉药物的鉴定方法与操作。

2.1.2 能力目标 学生通过实践训练,具有较强发现问题、解决问题的实践能力和科研创新能力,能进行现有药物的合成、工艺改进以及新的工艺设计等试验任务。

2.1.3 素质目标 通过实验,培养遵守纪律,具有良好科研工作作风、社会责任感、团结合作和适应企业需要的高素质人才。

2.2 教学内容

根据我校药物制剂专业培养计划,以普通高等教育“十一五”国家级规划教材,全国高等医药院校药学类实验双语教材《药物化学实验与指导》^[4]为教学教材。为了适应教学目标,减少了药物合成实验中的重复性实验,精选出有代表性的实验项目,并将验证性实验改为设计性实验,同时增加了开放性实验,增加设计性实验和开放性实验的比例,以突出对学生创新能力的培养。将教学实验分为基础实验、综合性和设计性实验以及开放性实验模块,其中基础实验、综合性和设计性实验共计40学时(详见表1)。在综合性和设计性实验模块中采取科学试验的原理与方法^[5],以保证学生具备专业知识与技能的同时,还具备创新能力、自主学习和终身学习的能力。

2.3 教学过程

结合我校药物制剂专业学生具有学习意愿强烈、要求与动力强烈、综合素质较高、创新思维与能力中等、探索创新意识强烈,但主动性、持久性较差,团队协作精神不足以及对目前学习满意度不高等学情特点^[3],在该实验教学中选择小组合作学习法^[6]、导学案法^[7]、多媒体教学技术^[8],从课前准备、课中探究和课后总结等3个阶段来实施教学,从而提高学生的专业知识、创新能力、团队协作能力和综合素质,以达到应用型人才的培养目标。

表1 实验教学模块

Tab 1 Experimental teaching modules

模块	实验项目	培养能力
基础实验	实验室的安全、常用仪器、设备(2学时)	基本实践能力
综合性和设计性实验	有机药物的定性鉴别(3学时)	基本实践能力、综合创新能力、协作能力、计算机操作能力
	磺胺醋酸钠的合成(10学时)	
	阿司匹林的合成(6学时)	
	对乙酰氨基酚的合成(6学时)	
开放性实验	苯佐卡因的合成(13学时)	自主创新能力和自主学习能力
	教师的科研课题	
	各类学科竞赛	

2.3.1 课前准备 分为5个环节。(1)学情调查与分组:开学初,对药物制剂专业学生按学习驱动力与习惯、综合素质、创新思维与能力、对目前学习的满意度等进行学情调查^[9],掌握学情,并将学习习惯和综合素质差异按“组间同质,组内异质”的原则进行分组。(2)编写教案与导学案:根据学情,编写实验项目教案与导学案^[7]。(3)任务分配:提前一周分配实验任务,将学案资料分发给学生(人手一册)。(4)组内预习:小组内分工后,结合教师印发的学习材料,对照教材或查找参考资料,进行小组内合作学习,包括个体预习、组内合作探究和形成结果。(5)预习情况检查:实验前教师检查学案中预习的知识点或实验初步设计方案,将预习情况反馈给学生,并做好相关记录。

2.3.2 课中探究 分为2个环节。(1)课堂理论探究:就学案中关于药物知识、实验原理、仪器、药品与试剂、操作关键点等问题进行理论探究,包括预习成果展示与补充、质疑、答疑、点评、教师精讲等。(2)实践操作探究:小组根据设计方案或修订的实验方案开展实验操作,各组将操作结果进行实时展示。教师随堂指导、记录操作成绩与小组合作情况等。

2.3.3 课后总结 课后师生对此次教学进行总结反思,完成学案中相应的巩固、检测、拓展与反思内容,实验完成后两天内学生每人提交学案、含反思内容的实验报告。

2.4 实验成绩评价

采取多元化的评价体系取代传统单一的评价体系来评价学生的实验成绩。评价体系的多元化包括评价的主体、角度和内容的多元化。评价的主体包括学生自评(15%)、学生间互评(15%)以及教师评价(70%)。评价的角度包括预习、课堂操作及课后巩固拓展等。评价的内容包括个体学习完成情况、小组合作学习完成情况、小组合作学习的有效性、劳动与纪律、实验操作的准确性、实验报告的书写和实验测验等。

学生最终实验成绩计算公式:学生实验成绩=自评分×15%+(组内+组间)互评分÷2×15%+预习×7.5%+小组合作的有效性评分×7.5%+实验报告分×30%+实验考核分×25%。

其中“自评分”与“互评分”是从个体学习完成情况、参与程度、团结协作情况、学习效果、劳动和纪律等5个方面进行评

价;预习指的是对导学案的预习完成情况;“小组合作的有效性”是从小组内学生分工、参与程度、倾听与互助互学、解决问题的情况、合作探究的氛围等5个方面进行评价;实验报告包括实验名称、实验目的和要求、实验材料与仪器、实验原理、实验操作过程、原始记录、实验结果及分析、实验收获、巩固拓展题、劳动、纪律、实验态度及书写等;实验考核包括劳动、态度与纪律、实验操作、实验现象与结果、结果分析、思考题等。

3 实验教学体系构建的效果

通过几年的实践教学,我校逐步完善了本课程的实验教学目标、教学内容、教学过程与学生实验成绩评价方式,以提高学生的专业知识和专业技能、创新能力与综合素质,并取得了较好的效果。我校2012级药物制剂专业学生参加了2015年全国第四届药学中药学试验技能大赛并获得一等奖。

4 讨论

本课题组在前期教学方法探索成果的基础上^[5-7],从改革《药物化学实验》教学目标、教学内容、教学过程及实验成绩评价4个方面出发,对《药物化学实验》教学体系进行探讨,构建了适用于药物制剂专业《药物化学实验》教学的实验教学体系。该体系下的实验教学开创了将专业教育、创新能力教育与素质教育有机融合于教育教学活动的新局面,调动了学生的学习积极性与主动性,巩固了学生的专业知识和专业技能,培养了学生的创新能力和综合素质,提升了实验教学效果,可为培养高素质应用型人才提供参考。

但实验教学体系的构建和优化不是一蹴而就的,是一个循序渐进的过程,今后还需要学校加强实验室建设^[9]、实训基地建设^[10]、实验管理^[11]等,同时借鉴其他学者的经验^[12-15]在实验教学中不断完善实践教学体系,对学生进行全方位的培养和训练,实现应用型人才的培养目标。

参考文献

[1] 晏磊,詹斌.关于地方高校培养应用型人才的几点思考[J].南昌教育学院学报,2008,23(2):47.

- [2] 王茜莎,臧林泉,张德志.培养药学应用型人才的高校教育改革的几点思考[J].内蒙古中医药,2010,29(15):97.
- [3] 赵建国,曲伟红.基于应用型人才培养的药物制剂专业学情调查及分析[J].现代高教论坛,2015,39(3):60.
- [4] 尤启冬.药物化学实验与指导[M].北京:中国医药科技出版社,2008.
- [5] 赵建国,曲伟红,吕璐.应用科学试验原理和方法进行药物化学实验教学[J].广州化工,2011,39(10):186.
- [6] 赵建国,曲伟红,吕璐,等.自主合作学习在药物化学实验教学中的应用[J].广州化工,2013,41(8):232.
- [7] 赵建国,曲伟红,吕璐,等.导学案模式在药物化学实验教学中的应用[J].广州化工,2015,43(4):190.
- [8] 殷馨,王海文.合理运用多媒体教学手段提高化学实验教学质量[J].化工高等教育,2011,28(6):48.
- [9] 鲍爱莲,刘万辉,王振廷,等.实验室建设在应用型人才培养中的作用[J].黑龙江科技信息,2009,13(36):251.
- [10] 郭伶,于金玲.校企合作实训基地培养应用型人才探析[J].前沿,2013,35(24):11.
- [11] 赵春青,张卫光,董会,等.强化实验教学管理培养应用型人才[J].实验科学与技术,2015,13(6):61,127.
- [12] 陈绍成,李俊.药品经营与管理专业实践教学体系构建研究[J].中国药房,2012,23(24):2300.
- [13] 叶秉良,戴文战,杨蔚琪.基于创新能力培养目标的实验教学体系的构建[J].实验技术与管理,2008,25(11):131.
- [14] 姜翠玉,吕志凤,王芳珠,等.研究型化学实验教学体系的构建与实践[J].实验室研究与探索,2015,34(4):174.
- [15] 许凤,张杰,沙子健.PBL教学法在药学类专业有机化学实验教学中的实施[J].中国科教创新导刊,2011,30(22):94.

(收稿日期:2015-10-30 修回日期:2016-07-26)

(编辑:刘柳)

重庆市稳妥推进卫生计生领域综合执法

本刊讯 为全面贯彻落实国家卫生计生委、中央编办等六部门联合印发的《关于进一步加强卫生计生综合监督行政执法工作的意见》精神,重庆市卫生计生委与市编办、市财政局、市人力资源社会保障局、市公务员局联合印发《关于在卫生计生领域实施综合执法的意见》(渝卫监督发〔2016〕49号),对基层卫生计生监督执法机构、监督执法力量、监督员职位分级管理进行强化细化具体化。

一是推动基层卫生计生监督执法关口前移。要求各区县根据当地实际,进一步完善区县卫生计生监督执法体系,建立健全片区监督执法工作机制。明确乡镇(街道)由社会事务办公室(计划生育办公室)承担辖区监督执法工作,接受区县卫生计生监督执法机构的业务指导,逐步实现卫生计生监督执法重心下沉、关口前移。

二是充实基层卫生计生监督执法力量。明确各区县要综合考虑辖区人口、工作量、服务范围和经济水平等因素,加强卫生计生监督执法力量。区域面积大、人口较多、执法任务较重的,可按照控制总量、盘活存量、优化结构、有增有减的原则,适当调增卫生计生监督执法人员。要重点推动执法力量向基层倾斜,逐步提高一线执法人员比例。

三是全面推开卫生计生监督员职位分级管理制度。在2015年全市完成卫生计生执法资源整合、统一卫生计生监督执法机构名称的基础上,决定在全市范围内全面实施卫生计生监督员职位分级管理制度。明确要做好卫生计生监督员职级评聘工作,构建奖惩并重的竞争激励机制,畅通卫生计生监督员晋升途径,充分调动监督执法机构及人员的工作积极性、创造性。

药物晶型多态性及其测定、评价方法

金朝辉^{1*}, 顾锦建¹, 郑明琳¹, 赵 森^{2#} (1. 四川大学华西医院, 成都 610041; 2. 成都医学院药学院, 成都 610000)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4318-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.46

摘要 目的: 为新药研发生产及药物质量控制指标的优化与完善提供参考。方法: 以“药物多晶型”“晶型多态性”“测定”“评价”等为关键词, 检索2006年1月—2015年12月在PubMed、中国知网、维普等数据库中收录的相关文献, 进行归纳、总结。结果: 药物晶型多态性可对新药研发生产及临床疗效产生影响, 不容忽视。多晶型药物的定量测定方法主要有X-射线粉末衍射法、拉曼光谱法、中红外光谱法、近红外光谱法、差示扫描量热法等。多晶型药物的体内外评价技术可分为细胞模型技术、动物离体组织器官技术、动物在体组织器官模型技术、动物模型技术等。结论: 药物晶型多态性研究已成为新药研发及药物质量控制的重要环节。我国当前应加强该方面的研究, 以提高仿制药的生物利用度和临床疗效, 缩小仿制药与原研药的差距。

关键词 药物晶型多态性; 测定; 评价

在临床上80%的药物以固体制剂形式给药, 固体药物的多晶型现象是普遍存在的, 化学药中50%以上存在多晶型的情况, 而晶型是影响药物稳定性、质量可控性、临床疗效与安全性的的重要因素, 同一种药物由于晶型不同, 其理化性质、生物活性会有所差异, 因此药物晶型多态性问题不容忽视。本文中, 笔者以“药物多晶型”“晶型多态性”“测定”“评价”等为关键词, 检索2006年1月—2015年12月在PubMed、中国知网、维普等数据库中收录的相关文献, 进行归纳、总结, 旨在为 Newman 研发生产及药物质量控制指标的优化与完善提供参考。

1 药物晶型多态性及效应

1.1 药物晶型多态性对新药研发生产的影响

在新药研发生产过程中, 药物自身的晶型类型极为关键。多晶型药物根据其稳定性可分为稳定型、亚稳定型和不稳定型。稳定型熔点高、化学稳定性较好, 但溶出速率慢, 溶解度小; 不稳定型则溶出速率快、溶解度大, 但化学稳定性相对较差; 亚稳定型介于稳定型和不稳定型之间, 储存一段时间会向稳定型转变。在新药研发生产的过程中, 需重点关注药物的晶型类型, 探究药物晶型多态性产生的机制, 根据其各晶型类型的稳定性特征, 采取必要的工艺技术, 保障原料和制剂在生产与贮藏过程中的晶型一致。我国自20世纪70年代开始关注固体化合物的多晶型现象, 尤其是在药物研究方面, 但现在绝大多数药物晶型研究仍没有系统化。

1.2 药物晶型多态性对临床疗效的影响

药物晶型多态性对临床疗效的影响是目前药学界比较关注的问题。同一种药物在疗效上存在差异, 其原因除了因生产工艺不同而产生的质量差异外, 另一个可能原因就是药物

晶型对生物利用度的影响。药物因晶型不同(晶型自由能差异以及分子间作用力不同)导致其生物利用度不同, 进而影响药物在体内的吸收, 产生药效差异。有研究表明^[1-2], 造成仿制药与原研药、不同企业生产的同种药物、同一企业同种药物的不同生产批次临床疗效差异的原因, 大多数是由于固体药物的晶型物质存在状态变化。如, 那格列奈的S晶型与临床使用的H晶型溶解度均明显>B晶型; 阿司匹林有晶型I和晶型II, 相同给药剂量下服用II型的血药浓度超出I型达70%。

目前, 文献对于药物晶型的报道大多集中在药物晶型制备和表征及其多晶型的存在形式上, 而对药物不同晶型间生物利用度的差异研究则较少涉及^[3]。这提示我们需进一步掌握各种固体药物的晶型种类, 发现其优势晶型, 摸索引起晶型变化的各种控制条件, 保证药物晶型的稳定性, 改善药物的溶出速率和生物利用度, 从而提高临床疗效和安全性。

2 多晶型药物的定量测定

2.1 多晶型药物定量测定的必要性

目前, 我国药品质量标准中对药物晶型的控制相对薄弱, 多是定性分析, 而仅定性分析原料药或制剂中的晶型已不能满足药物临床疗效和安全性评价的需求。因此, 有必要研究完善的晶型质量控制体系来提高药物的质量标准, 进而为提高其临床疗效奠定基础。此外, 对药典上已经收录的各类固体药物的晶型问题尚缺少必要的、有效的、定量的检测数据支持, 该方面研究与国际水平仍存在着较大的差距。2015年版《中国药典》编制大纲中明确提出增订“晶型研究指导原则”, 这说明晶型控制问题已引起国家药典委员会的重视, 但该指导原则的推迟发布说明该方面的研究目前还未完全成熟, 在今后的药物质量评价与控制体系的发展方向上, 晶型的研究, 尤其是多晶型定量测定, 必然是其中的一项重要内容^[4]。

2.2 多晶型药物的定量测定方法

2.2.1 X-射线粉末衍射法(X-ray powder diffraction, XRD)^[5-7]

* 主管药师, 博士研究生。研究方向: 临床用药的药动学基础。电话: 028-85423202。E-mail: 695025422@qq.com

通信作者: 讲师。研究方向: 药事管理与法规。电话: 028-68289198。E-mail: xiangxiajiuxia@163.com

每个化合物的晶体都有它自己特定的X射线衍射图,因此X-射线衍射分析是鉴别药物晶型的有力手段。XRD法常用最强衍射线的晶面间距和相对强度来进行定性分析和定量测定,具有特异、准确、快速、操作简便的优点,正日益受到人们的重视,已广泛应用于药物的晶型分析。

2.2.2 拉曼光谱法(Raman spectroscopy)^[7-12] 拉曼光谱(Raman spectra)是一种散射光谱。拉曼光谱法是基于拉曼散射效应,对与入射光频率不同的散射光谱进行分析以得到分子振动、转动方面信息,并应用于分子结构研究的一种定性、定量分析方法。该方法可获得样品的物理化学及深层结构信息^[13],与其他方法相比,其优势在于:样品无需前处理、对样品无破坏、操作简便、时间短、灵敏度高。此外,由于该方法对于非极性物质具有较高的响应值,而药用辅料通常为极性物质,响应值较低,因此其更适合于药物制剂的分析^[14]。

2.2.3 红外光谱法 红外光谱法可分为中红外光谱法和近红外光谱法。(1)中红外光谱法(Infrared spectroscopy, IR)。物质照射中红外光后,一部分中红外光被该物质吸收。被吸收的中红外光的波长和吸收程度(吸光度或透射率)由该物质决定,故测量中红外吸收光谱可以得知物质固有光谱。IR法通过选取样品中红外光谱的特征峰,采用内标法或外标法,测定有效晶型的含量,具有快速、简便、无污染等优点。(2)近红外光谱法(Near infrared spectroscopy, NIR)^[7, 11-15]。NIR法对样品在近红外光谱区域的特征吸收峰进行分析,获取其有效晶型在近红外光谱区域的特征吸收波段光谱,并在此基础上运用偏最小二乘法(PLS)建立校正模型,从而对其中的有效晶型进行定量测定。该方法分析速度快,不仅可以鉴别活性成分的不同晶型,还可以检测原料药和制剂中晶型的纯度。

2.2.4 差示扫描量热法(Differential scanning calorimetry, DSC) DSC法是一种热分析技术。物质的晶型不同,在DSC曲线上的熔化吸热峰的位置也各异,据此可进行多晶型的鉴别^[16]。对于混合有效晶型和无效晶型的药物,进行DSC扫描,绘制DSC曲线,根据峰面积正比于热焓的变化,即可计算两种晶型的百分含量。DSC试验中需要对参比物质和待测物质以相同的速率进行加热和冷却,记录的信息是保持两种样品的温度相同时两者之间的热量之差,在试验过程中,参比物质和待测物质始终保持温度相等,所以两者之间没有热传递,在定量计算时精度比较高。

3 多晶型药物的体内外评价

对于多晶型化合物,可在早期成药性评价中明确其药理活性是否具有晶型选择性,从而提前预测其后期开发的必要性,提高研发的效率和成功率,避免早期评价中存在的由于晶型不同造成的生物活性差异。目前,多晶型药物的生物学评价技术主要可分为体外模型技术和体内模型技术。

3.1 体外模型技术

体外模型技术是评价多晶型药物吸收机制、代谢酶和转运体处置原理以及药物与载体蛋白相互作用的常见研究方法。通过体外试验可预测多晶型药物体内处置结果,甚至药物体内相互作用机制^[17]。该技术可分为细胞模型技术和动物

离体组织器官技术。

3.1.1 细胞模型技术 细胞模型技术最常用的肠渗透模型是Caco-2细胞和MDCK细胞,其中Caco-2细胞是被美国食品与药品管理局(FDA)批准的药物吸收模型。(1)Caco-2细胞。Caco-2细胞与人肠组织的吸收特性十分相似,故被认为是体外研究药物吸收特性的主要手段,并被广泛应用。虽然Caco-2细胞模型尚存在一些不足,如细胞培养时间过长(21 d),模型本身为纯细胞系,缺乏在小肠上皮细胞中的黏液层,缺少细胞培养标准以及试验操作标准等,但作为一种药物离体口服特性筛选模型,Caco-2细胞可用于了解不同晶型药物的吸收机制及其在小肠的代谢情况^[18]。(2)MDCK细胞。MDCK细胞为犬肾近曲小管上皮细胞,可以在聚碳酸酯膜上生长分化为类似小肠上皮细胞的单层膜结构,具有3~7 d后细胞单分子层即可达到完全分化的优点。而通过用人类的mdr1基因稳定转染MDCK细胞后,建立的MDCK-MDR1细胞系,能大量表达P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp),具有培养周期短,代与代之间均一性高的特点,是一种很好的人小肠上皮细胞模型,可用于P-gp底物与具有晶型多态性的P-gp抑制剂活性的筛选、P-gp介导的药物(包括多晶型药物)相互作用评价及其吸收情况观察^[19]。

3.1.2 动物离体组织器官技术 动物离体组织器官技术是将动物离体肠段固定在扩散池中间,测定在组织器官水平上的药物吸收。该模型可用于考察多晶型促吸收剂作用的部位差异及用于促吸收剂的筛选^[20-21]。

3.2 体内模型技术

虽然体外细胞与组织器官水平的评价数据,可用于预测晶型药物的体内过程,但是药物处置的关键参数只能通过体内研究获得。为了得到更准确的晶型对体内药物吸收影响的结果,需采用体内模型技术。

3.2.1 动物在体组织器官模型技术 动物在体组织器官模型保留了完整的肠道神经以及内分泌系统,同时也保证了血液和淋巴液的供应。单向灌流法借用肠插管,用低流速对某一肠段进行单向灌流,考察进出口处灌流液中的药物浓度差,评价药物在该肠段的吸收情况。该方法组织活性高,易操控,与人体有良好的相关性^[22]。有研究者将单向灌流法与液相色谱-质谱联用技术相结合,成功建立了肠段灌注后肠系膜静脉中双环醇血浆浓度的检测方法,具有简单、快速、灵敏的优点^[23]。

3.2.2 动物模型技术 动物模型比细胞模型、动物离体组织器官模型及动物在体组织器官模型更接近于人体内药物代谢的实际情况。适宜的动物模型对晶型药物的研究和开发至关重要。缺少这类数据,将无法建立理想的生理药动学模型。对于固体多晶型口服药物在动物体内生物活性的研究,关键在于如何保证化合物的晶型保持不变。而采用与临床用药方式更为接近的给药方法,如将不同晶型的固体药物用灌胃器经口送到实验动物的胃中,由此可保证在给药过程中药物晶型不发生改变,从而能更加准确地反映不同晶型的固体药物生物活性的真实情况。

4 结语

目前,在药物晶型多态性研究方面,我国与国际先进水平存在较大差距。加强该方面的研究,尤其是多晶型药物的生物活性研究,不仅有助于改善药品质量标准中晶型控制的薄弱环节,为“晶型研究指导原则”的制订提供充实的实(试)验基础,还可以为化合物的早期成药性评价提供晶型选择依据,从而加快新药研发的进度。该方面的研究对于提高仿制药的生物利用度和临床疗效,缩小仿制药与原研药的差距,提升国内仿制药产业的竞争力具有重要意义,其产生的直接经济效益不容小觑。

参考文献

- [1] 陈桂良,李君婵,彭兴盛,等.药物晶型及其质量控制[J]. 药物分析杂志,2012,32(8):1 503.
- [2] 李钢,徐群为,李瑞,等.那格列奈的多晶型与溶解度[J]. 化学学报,2007,65(24):2 817.
- [3] 张娜,黄海伟,林兰,等.心血管系统治疗药物的晶型研究进展[J]. 现代药物与临床,2014,29(6):690.
- [4] 马乐伟,杜葳,赵春顺.药物晶型定量分析方法的研究进展[J]. 药科学报,2011,46(8):896.
- [5] Tanninen VP, Yliruusi J. X-ray powder diffraction profile fitting in quantitative determination of two polymorphs from their powder mixture[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, 81(2/3):169.
- [6] Campbell RSN, Williams AC, Grimsey IM, *et al.* Quantitative analysis of mannitol polymorphs. X-ray powder diffractometry: exploring preferred orientation effects[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 28(6):1 149.
- [7] Croker DM, Hennigan MC, Maher A, *et al.* A comparative study of the use of powder X-ray diffraction, Raman and near infrared spectroscopy for quantification of binary polymorphic mixtures of piracetam[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 63(7):80.
- [8] Numata Y, Tanaka H. Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(126):751.
- [9] Wu ZL, Zhang C, Stair PC. Influence of absorption on quantitative analysis in Raman spectroscopy[J]. *Catalysis Today*, 2006, 113:40.
- [10] Pratiwi D, Fawcett JP, Gordon KC, *et al.* Quantitative analysis of polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride by Raman spectroscopy and principal components analysis[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, 54(3):337.
- [11] Hu Y, Erxleben A, Ryder AG, *et al.* Quantitative analysis of sulfathiazole polymorphs in ternary mixtures by attenuated total reflectance infrared, near-infrared and Raman spectroscopy[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3):412.
- [12] Hennigan MC, Ryder AG. Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infrared spectroscopies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72(2):163.
- [13] 刘燕德,刘涛,孙旭东,等.拉曼光谱技术在食品质量安全检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(11):3 007.
- [14] Patel AD, Luner PE, Kemper MS. Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy[J]. *Int J Pharm*, 2000, 206(1/2):63.
- [15] Reich G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(8):1 109.
- [16] 刘文英. 药物分析[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社, 2006:15-62.
- [17] Brantley SJ, Argikar AA, Lin YS, *et al.* Heab-drug interactions: challenges and opportunities for improved predictions[J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(3):301.
- [18] Ding R, Jian Y, Kan H, *et al.* Studies on the intestinal absorption of the alkaloids in the Gancaofuzi decoction in a Caco-2 cell culture system by UPLC-MS/MS analysis[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2016, 27(6):915.
- [19] Hu PY, Liu D, Zheng Q, *et al.* Elucidation of transport mechanism of paeoniflorin and the influence of ligustilide, senkyunolide I and senkyunolide A on paeoniflorin transport through Mdr1 cells as blood-brain barrier in vitro model[J]. *Molecules*, 2016, 21(3):300.
- [20] Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, *et al.* Human small intestinal and colonic tissue mounted in the using chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46(5):367.
- [21] Fortuna A, Alves G, Falcão A, *et al.* Evaluation of the permeability and P-glycoprotein efflux of carbamazepine and several derivatives across mouse small intestine by the Ussing chamber technique[J]. *Epilepsia*, 2012, 53(3):529.
- [22] Sun M, Zhai X, Xue K, *et al.* Intestinal absorption and intestinal lymphatic transport of sirolimus from self-emulsifying drug delivery systems assessed using the single-pass intestinal perfusion (SPIP) technique and a chylomicron flow blocking approach: linear correlation with oral bioavailabilities in rats[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(3):132.
- [23] Tan W, Wang BL, Hu JP, *et al.* Establishment of liquid chromatography/mass spectrometry for determination of bicyclol in rat single-pass intestinal perfusion[J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(10):1 059.

(收稿日期:2015-11-09 修回日期:2016-09-18)

(编辑:周 簪)