

原创中药新药红珠胶囊质量标准的研究*

彭维¹, 苏薇薇¹, 古淑仪¹, 王永刚¹, 郭静²

(1. 中山大学广州现代中药质量研究开发中心, 广东 广州 510275;

2. 广东环球制药有限公司, 广东 佛山 528303)

摘要: 为建立红珠胶囊(其内容物为化橘红有效部位)的质量标准, 采用薄层色谱法对红珠胶囊中柚皮苷、野漆树苷进行定性鉴别, 紫外分光光度法测定红珠胶囊中总黄酮含量并进行溶出度考察, 高效液相色谱法测定其中柚皮苷含量。结果显示薄层鉴别专属性强; 总黄酮质量浓度在0~27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9998$, 平均回收率为99.63%, RSD为1.95% ($n=9$); 柚皮苷在0.2012~2.0120 μg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9999$, 平均回收率为97.92%, RSD为2.80% ($n=9$)。表明该质量标准方法简便、准确, 重复性好, 可用于红珠胶囊的质量控制。

关键词: 红珠胶囊; 薄层色谱法; 紫外分光光度法; 高效液相色谱法; 柚皮苷; 质量标准

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2013)06-0110-04

Quality Standard for Hongzhu Capsule of the Original New Chinese Medicine

PENG Wei¹, SU Weiwei¹, GU Shuyi¹, WANG Yonggang¹, GUO Jing²

(1. Guangzhou Quality Research and Development Center of Traditional Chinese Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Medi-World Pharmaceutical Company Limited, Foshan 528303, China)

Abstract: The quality standard for Hongzhu Capsule (Citrus Grandis active fraction) was established. Naringin and rhoifolin were identified by TLC. The TLC identification was specific. The assays of the total flavonoids were determined by UV. The linear range of flavonoids was from 0~27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9998$) with an average recovery of 99.63% (RSD was 1.95%, $n=9$). Naringin was determined by HPLC. The linear range of naringin was from 0.2012~2.0120 μg ($r=0.9999$) with an average recovery of 97.92% (RSD was 2.80%, $n=9$). The methods in quality standard were simple, accurate and reproducible. The established standard can be used for quality control of Hongzhu Capsule.

Key words: Hongzhu Capsule; TLC; UV; HPLC; naringin; quality standard

红珠胶囊是中山大学研制的原创中药五类新药, 具有止咳、化痰的功效, 用于呼吸道疾病引起的咳嗽, 痰多。药理研究表明: 总黄酮类化合物是化橘红发挥药效的主要物质基础^[1-2], 其中柚皮苷为其主要的活性成分, 占有有效部位的70%以上。

为保证产品质量, 确保临床疗效, 本研究建立了制剂中柚皮苷、野漆树苷的薄层色谱鉴别, 并采用紫外分光光度法测定红珠胶囊中总黄酮含量并进行溶出度考察, 采用高效液相色谱法测定其中柚皮苷含量。

* 收稿日期: 2013-05-02

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2011ZX09401-307); 广东省重大科技专项资助项目(2012A080204019)

作者简介: 彭维(1971年生), 女; 研究方向: 中药质量研究; 通讯作者: 郭静; E-mail: wisemouse1@126.com

1 仪器与材料

Dionex P680 型高效液相色谱仪 (美国戴安公司, 四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、PDA-100 检测器及 Chromeleon 工作站); BP211D 电子分析天平 (瑞士沙多利斯公司); ATS4 薄层自动点样仪, REPROSTAR 3 薄层成像系统, TLC PLATE HEATER III 薄层板加热器 (瑞士 CAMAG 公司); TU-1901 紫外-可见光分光光度仪 (北京普析通用仪器有限责任公司); ZRS-8G 智能溶出试验仪 (天津大学无线电厂); T660/H 超声波清洗器 (美国埃玛公司)。

化橘红对照药材 (中国药品生物制品检定所提供, 批号 1165-200001); 柚皮苷 (供含量测定用, 中国药品生物制品检定所提供, 批号 110722-200309); 野漆树苷 (美国 Sigma 公司提供, 纯度 >95%, 批号 A8906)。6 批红珠胶囊由中山大学广州现代中药质量研究开发中心研制, 委托广东环球制药有限公司生产。

甲醇 (德国默克) 为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

取本品内容物研磨均匀, 取约 0.2 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 (功率 360 W, 频率 35 kHz) 10 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取柚皮苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取化橘红对照药材粉末 1 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 (功率 360 W, 频率 35 kHz) 10 min, 滤过, 作为对照药材溶液。吸取上述对照品溶液 3 μ L, 对照药材溶液、供试品溶液各 1 μ L, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以丙酮-乙酸乙酯-水-冰醋酸 (20:40:4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 60 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材、对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰, 结果见图 1。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取已干燥至恒质量的柚皮苷对照品 15.00 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 中含柚皮苷 300 μ g 的对照品溶液 I; 精密量取对照品溶液 I 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻

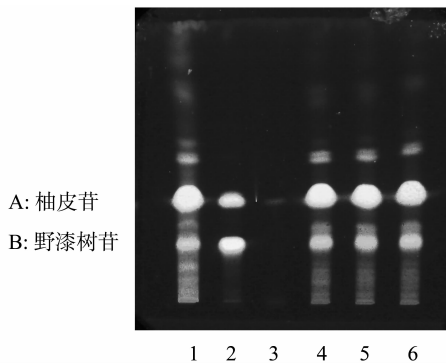


图 1 化橘红对照药材(1)、对照品(2)、阴性对照(3)、红珠胶囊供试品(4-6)薄层色谱图

Fig. 1 TLC of Citrus grandis reference drug(1), CRS(2) negative control(3) and Hongzhu Capsule(4-6)

度, 制成每 1 mL 中含柚皮苷 15 μ g 的对照品溶液 II。

2.2.2 供试品溶液的制备 取装量差异项下的胶囊内容物, 研细, 取 0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇约 70 mL, 超声处理 (功率 360 W, 频率 35 kHz) 30 min, 放冷至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液 I, 精密量取供试品溶液 I 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液 II。

2.2.3 专属性试验 分别取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液, 以甲醇作为溶剂空白, 分别进行光谱扫描 (400 ~ 200 nm), 结果表明: 对照品溶液和供试品溶液的光谱图基本一致, 最大吸收波长均在 (283 \pm 1) nm, 阴性对照溶液在 283 nm 处无干扰。故测定波长选择 283 nm。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液 I: 0.00 (空白)、0.10、0.30、0.50、0.70、0.90 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品系列溶液。以甲醇作为空白, 在波长 283 nm 测定吸收值。以质量浓度为横坐标, 吸收度为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程为: $A = 0.0370C + 0.0126$ ($r = 0.9998$)。柚皮苷质量浓度在 0 ~ 27 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取对照品溶液 II, 连续测定 6 次, 计算柚皮苷吸光度的 RSD 为 0.41%, 表明方法精密度好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液 II, 分别于 0、10、30、60、90、120 min 测定, RSD 为 1.26%, 表明供试品溶液在 2 h 内稳定性好。

2.2.7 重复性试验 取同一批号 (20050102) 的

红珠胶囊内容物粉末 (以平均装量 0.120 10 g 计), 研细, 平行取样 6 份, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液 6 份, 测定总黄酮的含量及计算 RSD 为 2.45%, 表明方法重复性较好。

2.2.8 加样回收率试验 按照高、中、低 3 个质量浓度梯度, 精密称取已测知含量的红珠胶囊 (20050102, 平均含量 46.20 mg/粒, 折算质量分数为 38.47%) 样品 9 份, 每个质量浓度梯度平行操作 3 份, 再分别精密加入一定量的柚皮苷, 依法测定, 计算回收率, 平均加样回收率为 99.63% ($n=9$), RSD 为 1.95%。表明方法回收率好。

2.2.9 样品测定 取上述对照品溶液 II 及供试品溶液 II, 在 283 nm 的波长处测定吸光度, 计算, 即得。

表 1 红珠胶囊总黄酮含量测定结果

Table 1 Determination of total flavonoids in Hongzhu Capsule

批号	总黄酮含量/(mg·粒 ⁻¹)		平均含量/(mg·粒 ⁻¹)
20041222	44.92	44.64	44.78
20050101	50.90	51.56	51.23
20050102	45.17	47.23	46.20
20050103	43.75	43.27	43.51
20061101	46.30	47.34	46.82
20080601	47.75	47.70	47.72

本品每粒含总黄酮以柚皮苷 (C₂₇H₃₂O₁₄) 计, 不得少于 38 mg, 不得高于 56 mg。

2.2.10 溶出度测定^[3] 取本品, 每批随机取 6 粒, 照溶出度测定法 (《中国药典》2010 年版二部附录 X C 第一法), 以水 900 mL 为溶出介质, 转速为 100 r/min, 依法操作, 经 45 min, 取溶液 5 mL, 滤过, 精密量取续滤液 2.5 mL, 置 5 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 按照上述总黄酮紫外分光光度法, 在 283 nm 的波长处分别测定吸光度; 另取柚皮苷对照品适量, 精密称定, 加溶出介质溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 16 μg 的溶液, 同法测定, 计算每粒的溶出量及以实际含量计的溶出度, 并作均一性比较。限度为实际含量的 70%, 应符合规定。结果见表 2。

表 2 红珠胶囊溶出度测定结果

Table 2 The results of dissolution rate in Hongzhu Capsule

批号	溶出度/%	RSD/%	批号	溶出度/%	RSD/%
20041222	79.74	2.23	20050101	88.67	3.10
20050102	80.24	2.62	20061101	89.70	3.48
20050103	89.86	2.65	20080601	95.27	2.50

2.3 柚皮苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 *Dikma Diamasil C₁₈* (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-醋酸-水 (35:4:61); 检测波长为 283 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量 5 μL。

2.3.2 专属性试验 分别量取对照品溶液 I、供试品溶液 I 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果柚皮苷能与样品中其他成分峰分离良好。理论板数按柚皮苷峰计算应不低于 2 000, 柚皮苷与邻近色谱峰达到基线分离, 分离度大于 1.5。色谱图见图 2。

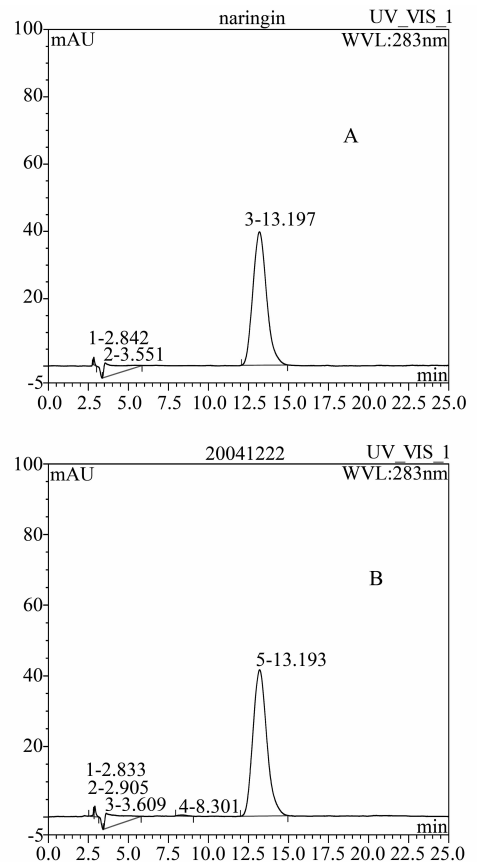


图 2 柚皮苷对照品(A)和供试品(B)色谱图

Fig. 2 HPLC of naringin CRS(A) and Hongzhu Capsule(B)

2.3.3 线性关系考察 精密称取柚皮苷对照品 0.010 06 g, 用甲醇定容到 50 mL 量瓶中, 再精密吸取 5 mL 稀释至 10 mL, 质量浓度为 0.100 6 mg/mL。按上述色谱条件, 吸取柚皮苷对照品, 以 2、5、10、15、20 μL 连续进样, 测定。以峰面积积分值 A 对对照品的进样量 C (μg) 进行回归分析, 得回归方程: 柚皮苷 $A = 27.907 C - 0.096 1$, $r = 1.000 0$ 。结果表明柚皮苷在 0.201 2 ~ 2.012 0 μg 范围线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 精密吸取柚皮苷对照品溶液

10 μL , 在以上色谱条件下, 连续重复进样 5 次, 依法测定, 计算柚皮苷峰面积的 RSD 为 1.03%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取供试品溶液, 室温下分别放置 0、2、4、8、12、24、48 h 后, 按“2.3.1”项色谱条件, 取 5 μL 进样, 依法操作, 测定峰面积, 计算柚皮苷峰面积的 RSD 为 2.14%, 表明稳定性较好。

2.3.6 重复性试验 取同一批号的同一批号红珠胶囊内容物(批号 20041222, 平均装量 0.121 11 g) 6 份, 精密称定, 照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件, 进样 5 μL , 测定柚皮苷的含量及计算 RSD 为 1.95%, 表明方法重复性较好。

2.3.7 加样回收率试验 精密称取已测知柚皮苷含量的红珠胶囊内容物(批号 20041222, 柚皮苷质量分数 36.67%, 44.42 mg/粒) 适量, 再分别精密加入一定量的对照品, 使供试品溶液中的柚皮苷质量浓度分别在柚皮苷标准曲线的高、中、低区域各 3 份, 照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件, 进样 5 μL , 测定, 计算, 平均加样回收率为 97.92%, RSD 为 2.80%, 表明方法回收率好。

2.3.8 样品测定 取装量差异项下的胶囊内容物, 研细, 精密称定, 照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取柚皮苷对照品、供试品溶液各 5 μL , 注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 按外标法计算样品中柚皮苷的含量, 结果见表 3。

表 3 红珠胶囊中柚皮苷的含量测定结果

Table 3 Assay of Naringin in Hongzhu Capsule

批号	柚皮苷含量/(mg·粒 ⁻¹)		平均含量/(mg·粒 ⁻¹)
20041222	44.36	44.48	44.42
20050101	47.05	50.02	48.54
20050102	45.15	46.60	45.88
20050103	43.17	43.60	43.38
20061101	43.23	45.24	44.23
20080601	39.93	39.56	39.74

3 讨论

1) 建立与国际接轨的中药质量控制方法, 是中药现代化的客观要求^[4-5]。红珠胶囊的化学成分组成是以柚皮素为母核的柚皮苷、新北美圣草苷等二氢黄酮类化合物以及柚皮苷的氧化物野漆树苷, 最大吸收波长大多在(283 ± 1) nm 处, 且柚皮苷含量占有效部位的 70% 以上, 故可采用紫外分光光度法测定总黄酮含量。所建立的总黄酮含量测定方法可用于胶囊溶出度的测定。

2) 本研究建立的质量标准, 方法简便、准确, 重复性好, 为全面监控红珠胶囊的质量提供了可靠的方法。

参考文献:

- [1] 李沛波, 马燕, 王永刚, 等. 化州柚提取物止咳化痰平喘作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(16): 1350 - 1352.
- [2] 李沛波, 苏畅, 毕福钧, 等. 化州柚提取物止咳作用及其机制的研究[J]. 中草药, 2008, 39(2): 247 - 250.
- [3] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部、二部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 69, 附录 85.
- [4] 关倩怡, 黄琳, 彭维, 等. 口炎清颗粒指纹图谱研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2011, 50(1): 115 - 118.
- [5] 彭维, 黄琳, 关倩怡, 等. 红腺忍冬的质量研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2010, 49(6): 142 - 144.