

· 研究报告 ·

三藤口服液的质量标准研究

陈小玲, 陈 顺, 高守红, 束 畅, 庞 涛, 陆文铨 (第二军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003)

[摘要] **目的** 建立三藤口服液的质量标准。**方法** 采用薄层色谱法鉴别处方中的大血藤和鸡血藤, 采用 HPLC 法测定绿原酸的含量, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (0.1% 甲酸) (9 : 91, v/v) 等度洗脱; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 330 nm; 进样量: 20 μl。**结果** 薄层鉴别色谱中特征斑点明显, 专属性强。绿原酸在 2.70~202.50 μg/ml 浓度范围内线性关系良好, 其回归方程为 $Y = 60.14X - 6.37$ ($r > 0.9999$)。**结论** 该法简便、稳定可靠、重复性好, 能够较好地控制三藤口服液的质量。

[关键词] 三藤口服液; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 绿原酸

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)04-0350-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.015

Research on quality standard of Santeng oral solution

CHEN Xiaoling, CHEN Shun, GAO Shouhong, SHU Chang, PANG Tao, Lu Wenquan (Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective** To establish the quality standard of Santeng oral solution. **Method** Sargentodoxa Caulis and Spatholobi Caulis were identified by thin layer chromatography. Chlorogenic acid was assayed by high performance liquid chromatography. The chromatographic column is Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a stable temperature of 35 °C. The mobile phase in isocratic elution consists of acetonitrile and 0.1% folic acid aqueous solution with a preliminary volume ratio of 9 : 91. The flow rate is 1.0 ml/min with an injection volume of 20 μl. **Results** Thin layer chromatography showed distinct spots of Sargentodoxa Caulis and Spatholobi Caulis with a great specificity. A regression formula $Y = 60.14X - 6.37$ ($r > 0.9999$) was obtained with a good linearity in concentration range of 2.70~202.50 μg/ml. **Conclusion** A simple, stable and repeatable method was established for the quality control of Santeng oral solution.

[Key words] Santeng oral solution; quality standard; TLC; HPLC; chlorogenic acid

三藤口服液是第二军医大学附属长征医院纯中药复方自制制剂, 处方由大血藤、鸡血藤及雷公藤组成, 故名三藤口服液; 该药为军队医院特色药品^[1], 具有祛风除湿、舒筋通络等功效, 主要用于银屑病、多发性皮肤血管炎、结缔组织病等疾病的治疗, 还可用于因战争性和非战争性突发事件引起的皮肤过度应激反应的缓解及治疗。该制剂在临床应用已 20 余年, 具有反应快、适应性强、疗效确切且不良反应少等特点, 深受临床医师、部队官兵和广大地方患者的欢迎^[2]。

该处方中的大血藤^[3], 又名血藤、红藤, 为木通

科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata* (Oliv.) Rehd. et Wils. 的干燥藤茎, 具有清热解毒、活血、祛风止痛等功效; 方中鸡血藤^[3], 又名猪血藤、血龙藤, 为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎, 具有活血补血、调经止痛、舒筋活络等功效; 雷公藤^[4], 又名黄藤、黄腊藤, 为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根, 具有抗炎及免疫抑制等作用。经处方分析, 大血藤、鸡血藤能够降低雷公藤的毒性, 并提高雷公藤的免疫抑制作用; 绿原酸是三藤口服液的主要活性成分之一^[5-8]。

为进一步提高三藤口服液的质量标准, 课题组对其原质量标准进行了修订与提升, 增加了大血藤、鸡血藤药材的薄层鉴别, 并采用 HPLC 法对主要活性成分绿原酸进行含量测定, 所建立的方法简便、准确、重复性好, 为评价和控制三藤口服液的质量提供了科学依据。

[基金项目] 军队医疗机构制剂标准提高科研专项基金 (14ZJZ02-4, 14ZJZ04-1); 上海市科委科研专项基金 (15401972200)

[作者简介] 陈小玲, 本科. Email: ddehen0626@163.com

[通讯作者] 高守红, 硕士, 副主任药师. 研究方向: 药物分析与临床药学研究. Tel: (021)60748763; Email: gaoshouhong@126.com

1 仪器和试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 1260 型), 包含 G1311C 四元泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G4212B-DAD 二极管阵列检测器, 以及 Chemstation 色谱工作站。台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司, 5810R 型)。光电分析天平(德国 Sartorius 公司, CPA225D 型, 最大载重 220 g, 分度值 0.01 mg)。旋涡振荡混和器(海门市其林贝尔仪器制造公司, Vortex WL-901 型); 超声仪(上海科导超声仪器公司, SK7200H 型)。

1.2 试药 三藤口服液(长征医院药学部制剂室, 批号: 121218、131105、140715)。绿原酸(chlorogenic acid)对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110753-201415); 刺芒柄花素(formononetin)对照品(大连美仑生物技术有限公司, 批号: MB1977); 大血藤对照药材、鸡血藤对照药材, 均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、甲酸(德国 Merck 公司, 色谱纯); 水为娃哈哈纯净水。

2 薄层鉴别

2.1 大血藤 取三藤口服液 20 ml, 浓缩至干。加甲醇 5 ml 复溶, 作为供试品溶液。另取大血藤药材 1 g, 磨碎, 用甲醇超声提取 1 h, 浸泡过夜。用处方方法制备不含大血藤的三藤口服液, 并按照供试品溶液的制备方法处理, 得阴性对照品溶液。按照薄层色谱法(《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502^[3]) 试验, 取上述供试品溶液、对照药材及对照溶液、阴性对照溶液各 10 μ l, 分别点于同一硅胶 G 板上, 以乙酸乙酯-甲酸-水(16:3:6)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254 nm)下检视, 供试品色谱在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 结果见图 1。

2.2 鸡血藤 取三藤口服液 30 ml, 以二氯甲烷 20 ml 萃取 2 次, 合并萃取液。取有机相旋蒸浓缩至少量, 作为供试品溶液。另取鸡血藤药材, 用乙醇回流提取 1 h, 同法制成对照溶液。用处方方法制备不含鸡血藤的三藤口服液, 并按照供试品溶液的制备方法处理, 得阴性对照品溶液。按照文献[3]所示方法试验, 取上述供试品溶液及对照溶液各 10 μ l, 分别点于同一硅胶 G 板上, 以三氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(254 nm)下检视, 供试品色谱在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 结果见图 2。

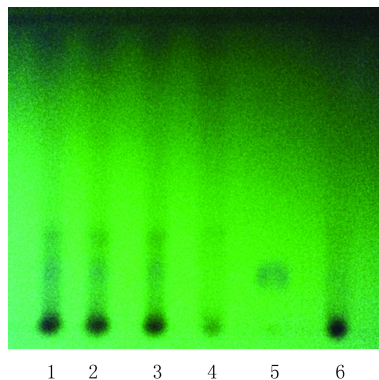


图 1 大血藤的薄层鉴别

1~3. 供试品(批号: 121218、131105、140715);
4. 大血藤对照药材; 5. 绿原酸对照品; 6. 阴性对照品

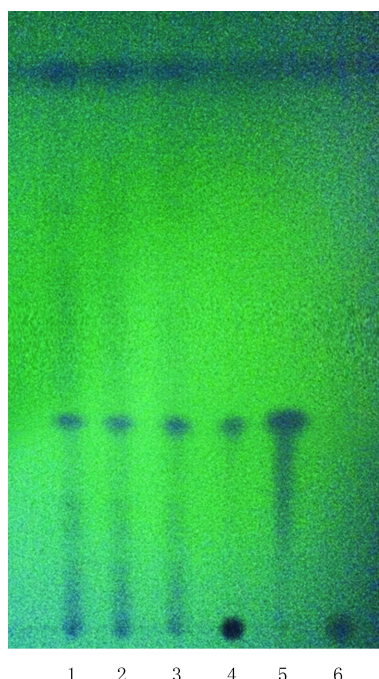


图 2 鸡血藤的薄层鉴别

1~3. 供试品(批号: 121218、131105、140715);
4. 鸡血藤对照药材; 5. 刺芒柄花素对照品; 6. 阴性对照品

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 以乙腈-水(0.1% 甲酸)(9:91, v/v)溶液为流动相, 等度洗脱; 检测波长为 330 nm; 流速 1.0 ml/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量为 20 μ l。

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸对照品 12.9 mg, 用纯甲醇定容于 10 ml 容量瓶中, 制成 1.29 mg/ml 的溶液, 混合均匀, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.2.2 供试品溶液 取三藤口服液适量, 13 400 r/min 离心 5 min 后, 精密量取上清液

1.0 ml,定容至 10 ml 容量瓶,摇匀,即得。

3.2.3 空白对照样品 精密量取不含对照品纯甲醇1.0 ml,定容至 10 ml 容量瓶,摇匀,即得。

3.2.4 阴性对照品溶液 用处方方法制备不含大血藤的三藤口服液,并按照供试品溶液的制备方法处理,即得阴性对照品溶液。

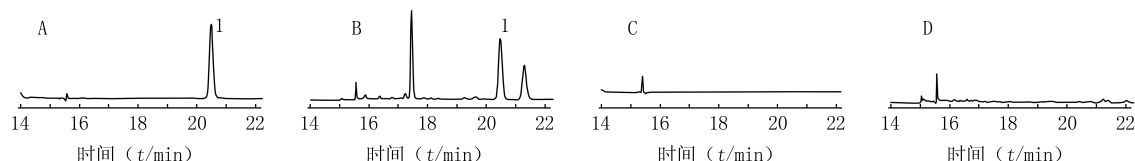


图3 三藤口服液 HPLC 图

A.绿原酸对照品;B.三藤口服液供试品(批号:140715);C.空白对照品;D.阴性对照品;l.绿原酸

完全。理论塔板数(以绿原酸计算) $>10\ 000$ 。

3.3.2 标准曲线的制备 取对照品溶液适量,加入甲醇稀释,分别配制成 2.70、6.75、13.50、33.75、67.50、135.00、202.50 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液,按上述色谱条件进行测定,以绿原酸浓度和峰面积进行 $1/X^2$ 的权重线性回归分析,得回归方程 $Y = 60.14 X - 6.37, r = 0.999\ 9$ 。结果表明绿原酸在 2.70~202.50 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好。

3.3.3 精密度试验 精密量取对照品溶液(33.75 $\mu\text{g/ml}$),按“3.1”项下色谱条件重复进样 6 次,绿原酸平均峰面积为 2 007.3, RSD 为 0.12%。结果表明仪器的精密度良好。

3.3.4 重复性试验 取供试品溶液,按“3.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“3.1”项下色谱条件进样,测定峰面积并计算含量,结果 6 份供试品溶液中绿原酸含量分别为 10.60、10.78、10.60、10.80、10.80、10.53 $\mu\text{g/ml}$,平均值为 10.69 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 1.16%,表明该方法重复性良好。

3.3.5 稳定性试验 取供试品溶液,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、6、12、24 h 时测定绿原酸色谱峰峰面积, RSD 为 0.93% ($n=3$),结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.3.6 加样回收率试验 取三藤口服液 5.0 ml 6 份(批号:140715),精密加入相当于样品含量 100% 的绿原酸对照品,然后按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,按“3.1”项下色谱条件进行测定,计算加样回收率,得绿原酸平均回收率为 96.93%, RSD 为 1.54%,结果见表 1。

3.3.7 样品含量测定 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批制备 3 份,按“3.1”项下色谱条件测定 3 批样品中绿原酸的含量,结果见表 2。

3.3 方法学考察

3.3.1 系统适用性试验 依照上述色谱条件进样,记录色谱图(图 3)。由图 3 可见,绿原酸的保留时间约为 20.5 min,阴性空白色谱图在绿原酸位置处无干扰峰,绿原酸与其相近的其他峰分离完全(分离度 >1.5),即本试验条件下绿原酸与其他组分分离

表 1 绿原酸加样回收率试验($n=6$)

样品量 (v/ml)	实际含绿 原酸量 (m/mg)	加入绿 原酸量 (m/mg)	测得 总量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
5.00	0.534	0.530	1.044 2	97.02	96.93	1.54
5.00	0.534	0.520	1.042 5	96.83		
5.00	0.534	0.520	1.042 8	98.62		
5.00	0.534	0.510	1.041 6	98.35		
5.00	0.534	0.520	1.040 6	96.27		
5.00	0.534	0.550	1.045 8	94.51		

表 2 三藤口服液中绿原酸含量测定结果($n=3$)

批号	绿原酸含量($\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
121218	135.21
131105	124.12
140715	106.86

4 讨论

4.1 薄层鉴别方法的改进 三藤口服液制剂原有的质量控制方法仅包括雷公藤药材的薄层鉴别,鉴别过程需要进行中性氧化铝柱色谱吸附,并使用毒性较大的三氯甲烷进行洗脱,且操作过程烦琐。经本课题组改进,现对大血藤和鸡血藤分别进行薄层鉴别,鉴别药材品种多,操作相对简便,重现性好。

4.2 HPLC 条件的选择

4.2.1 流动相的选择 分别考察了乙腈-水(0.1%甲酸)、乙腈-水(0.2%甲酸)、乙腈-水(0.5%甲酸)、乙腈-水(0.2%冰醋酸)作为流动相。结果表明,乙腈-水(0.2%甲酸)周围略有干扰峰,乙腈-水(0.5%甲酸)、乙腈-水(0.2%冰醋酸)分离度不如乙腈-水(0.1%甲酸),而流动相为乙腈-水(0.1%甲酸)时,绿原酸分离效果好,峰形和响应满足分析要求。

(下转第 384 页)

者以 N-5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 基因多态性常见, 后者主要是叶酸、维生素 B₁₂、维生素 B₆ 缺乏^[5]。

空腹情况下, 血浆中同型半胱氨酸的正常浓度为 5~15 μmol/L, 高于此范围便称为高同型半胱氨酸血症 (high homocysteine, hHcy), 15~30 μmol/L 为轻度, 30~100 μmol/L 为中度, 高于 100 μmol/L 为重度。Eikelboom 等^[6] 的研究表明, 高同型半胱氨酸血症可引起内皮功能受损、血栓形成、胆固醇和三酰甘油合成代谢的紊乱以及单核细胞的活化, 从而参与硬化性疾病, 包括肾小球硬化的发生与发展。可见, 血浆中同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 升高与心血管系统疾病、神经系统疾病、糖尿病、肾病等多种疾病息息相关, 这与近年来的研究结果不谋而合。

因此, 为了降低丙戊酸钠致高同型半胱氨酸血症的风险, 建议长期服用丙戊酸钠的患者应定期监测血同型半胱氨酸水平, 早发现、早干预。现有研究^[7] 表明, 适当补充叶酸、维生素 B₁₂ 以降低同型半胱氨酸, 可能对在服用丙戊酸钠的癫痫患者有益。

【参考文献】

- [1] 杨宝峰. 药理学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 137.
- [2] 何思陆. 丙戊酸钠致不良反应 39 例文献分析[J]. 中国药房, 2010, 21(40): 3827-3828.
- [3] Sener U, Zorlu Y, Karaguzel O, et al. Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B₁₂, folic acid and vitamin B₆ [J]. Seizure, 2006, 15(2): 79-85.
- [4] Ni GZ, Qin JM, Fang ZY, et al. Increased homocysteine levels in valproate-treated patients with epilepsy: a meta-analysis [J]. BMJ Open, 2014, 4(7): e004936-e004936.
- [5] 田丽, 张哲成. 高同型半胱氨酸血症与神经系统疾病[J]. 医学综述, 2007, 13(10): 749-751.
- [6] Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiologic evidence[J]. Ann Intern Med, 1999, 131(5): 363-375.
- [7] 和梅, 王欣. 叶酸联用维生素 B₁₂ 对丙戊酸钠治疗的癫痫患者血同型半胱氨酸水平的影响[J]. 黑龙江医药科学, 2016, 39(2): 53-54.

【收稿日期】 2016-12-30 【修回日期】 2017-06-12
【本文编辑】 李睿旻

(上接第 352 页)

4.2.2 色谱柱的选择 选用 Agilent、Sepax、Dikma 公司生产的不同品牌的 3 根色谱柱 (规格均为 4.6 mm×250 mm, 5 μm) 进行考察, 结果见表 3, 最终确定 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱作为检测色谱柱, 其分离效果好且稳定性和重现性好。

表 3 不同厂家色谱柱考察结果

公司	色谱柱型号	柱号	效果
Agilent	Zorbax SB-C ₁₈	990967-902	分离度好, 且峰形较好
Sepax	HP-SCX	120365-4625	响应偏低
Dikma	Diamonsil C ₁₈	99903	响应偏低

4.2.3 柱温的考察 分别考察 25、30、35、40 °C 4 个不同柱温, 结果发现随着柱温升高, 待测物的保留时间提前, 分离度下降。25 °C 时的出峰时间略晚, 35、40 °C 时的分离效果不如 30 °C, 因此选择柱温 30 °C 作为检测温度。

本课题组建立的三藤口服液质量控制方法简便、稳定、重复性好, 为评价和控制三藤口服液的质量提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] 黄立峰, 宋洪涛. 目前形势下医院制剂在大型军队医院中的存在与发展[J]. 解放军药学报, 2006, 22(1): 77-79.
- [2] 林厚文, 沈阳, 沈利民, 等. 三藤口服液的研制及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(8): 698.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 20, 194.
- [4] 高华. 最新国家药品标准实施手册[M]. 北京: 社会科学文献出版社, 2004: 1188-1189.
- [5] 丁越, 张永, 丁文平, 等. HPLC 测定大血藤药材中绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 99-102.
- [6] 刘宇文, 殷红妹, 邹耀华. HPLC 同时测定大血藤中红景天苷和绿原酸的含量[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(10): 947-949.
- [7] Cai Y, Zhang Z, Jiang S, et al. Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination[J]. J Hazard Mater, 2014, 268(6): 1-5.
- [8] Francisco V, Costa G, Figueirinha A, et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor-κB pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(1): 126-134.

【收稿日期】 2017-02-28 【修回日期】 2017-04-24
【本文编辑】 李睿旻