

利肝隆片的质量标准研究

崔晓丽¹, 索伟², 张桂芹¹, 何秀莲¹, 许立峰¹, 郭海平¹

(1. 承德市药品检验所, 河北 承德 067000; 2. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000)

利肝隆片载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第 2 册, 由板蓝根、五味子、黄芪等 8 味药组成, 具有疏肝解郁、清热解毒之功效, 临床主治急、慢性肝炎, 迁延性肝炎, 慢性活动性肝炎, 对血清谷丙转氨酶、麝香草酚浊度、黄疸指数均有显著降低作用。原标准已不能满足对质量控制的要求, 为此本研究增订了五味子和黄芪的薄层色谱定性鉴别。另外五味子中木脂素成分具有保肝降酶、增强肝脏解毒之功能, 用于预防肝损伤和治疗急、慢性肝炎, 五味子甲素是其有效成分之一, 故用反相高效液相色谱法对该制中五味子甲素进行了定量分析研究。

1 仪器与试药

岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪; SPD-10Avp 紫外检测器; N2000 色谱工作站(浙江大学工程信息研究所); AG135 天平(瑞士)。对照品: 五味子甲素(批号 0761-200107)、黄芪甲苷(批号 0781-200109)均购自中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。利肝隆片及各阴性对照样品均由承德天原药业有限公司提供。

2 薄层色谱鉴别

2.1 五味子的薄层色谱鉴别: 取本品 10 片, 除去糖衣, 研细, 取 3 g 置锥形瓶中, 加正己烷 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液低温蒸干, 残渣加醋酸乙酯 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取五味子甲素对照品, 加醋酸乙酯制成 0.5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。按处方比例取不含五味子的阴性对照样品, 同供试品溶液制备法制成阴性对照液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VB)试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以甲苯-醋酸乙酯(9:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 而阴性对照液在相应的位置上无干扰。见图 1。

2.2 黄芪的薄层色谱鉴别: 取本品 10 片, 除去糖衣, 研细, 取 3 g, 加甲醇 40 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 加乙醚提取 2

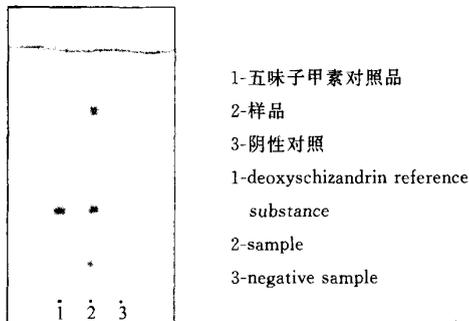


图 1 利肝隆片中五味子的 TLC 图

Fig. 1 TLC Chromatograms of Fructus Schisandrae in Liganlong Tablet

次, 每次 20 mL, 弃去乙醚液, 再加水饱和的正丁醇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并提取液, 加正丁醇饱和的氨试液 40 mL, 摇匀, 取正丁醇液, 加正丁醇饱和的水 20 mL 洗涤, 弃去水液, 取正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取黄芪甲苷对照品加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。按处方比例取不含黄芪的阴性对照样品, 同供试品溶液制备法制成阴性对照液。依照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VB)试验, 吸取供试品溶液及阴性对照液各 5 μ L, 对照品溶液 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 氯仿-甲醇-水(10:6:2)在 10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 日光下显相同的棕褐色斑点; 紫外光灯(365 nm)下显相同的橙黄色荧光斑点, 而阴性对照液在相应的位置上无干扰。见图 2。

3 五味子甲素的测定

3.1 色谱条件: C₁₈ 色谱柱: 迪马公司钻石 TM(200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-乙腈-0.4% 磷酸溶液(70:10:21); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 216 nm; 进样量: 10 μ L。理论板数按五味子甲素峰计算应不低于 3 000。

3.2 溶液的制备

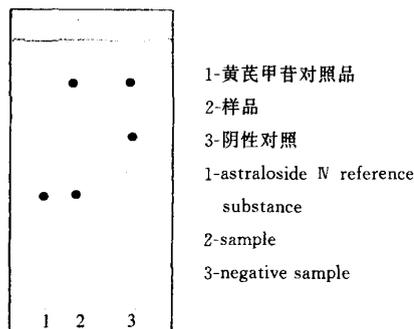


图 2 利肝隆片中黄芪的 TLC 图

Fig. 2 TLC Chromatograms of Radix Astragali in Liganlong Tablet

3.2.1 对照品溶液的制备:取五味子甲素对照品适量,精密称定,加甲醇制成 20 μg/mL 的溶液,摇匀,即得。

3.2.2 供试品溶液的制备:取本品 20 片,除去糖衣,研细,取 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加正己烷 25 mL,浸泡过夜,滤过,滤渣用正己烷 15 mL 分 3 次洗涤,洗涤液滤过,合并滤液,低温蒸干,残渣加甲醇溶解,移至 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

3.2.3 阴性对照溶液的制备:按处方比例取不含五味子的阴性对照样品,同供试品溶液制备制成阴性对照液。

3.3 干扰性试验:取对照品溶液、供试品溶液和缺五味子阴性对照液,各进样 10 μL 进行分析,结果供试品色谱中在与对照品色谱保留时间相同的位置上有色谱峰,而阴性对照在相同的位置上无色谱峰。见图 3。

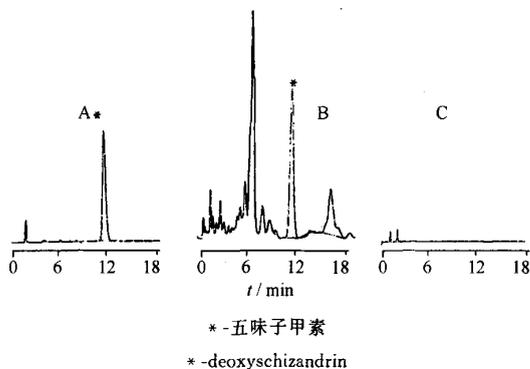


图 3 五味子甲素对照品(A)、利肝隆片(B)、缺阴性对照(C)的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of deoxyschizandrin reference substance (A), Liganlong Tablet (B), and negative sample (C)

3.4 线性关系考察:精密吸取五味子甲素对照品溶液(质量浓度为 20.04 μg/mL) 2、5、10、20、25、40、50 μL,分别注入高效液相色谱仪进行测定。以峰面

积积分值对进样量进行线性回归,得回归方程 $Y=3302.688.44 X+15232.77$, $r=0.9999$ 。五味子甲素在 0.040 08~1.002 μg 与峰面积呈良好线性。

3.5 精密度试验:取五味子甲素对照品溶液及供试品溶液进行试验,进样 10 μL,分别连续进样 5 次,五味子甲素峰面积值的 RSD 分别为 0.08%、0.89%。

3.6 稳定性试验:取供试品溶液(批号 040301),在配制后 0、4、9、14、19、23 h 各进样 10 μL,测定五味子甲素峰面积积分值,计算。结果其 RSD 为 1.73%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.7 重现性试验:取同一批(批号 040301)样品 9 份,制备供试品溶液,测定,计算,结果五味子甲素的质量分数的 RSD 为 1.81%。

3.8 加样回收率试验:精密称取含五味子甲素 0.034 97 mg/片的样品 2 g(批号 040301) 9 份,分别加入 1.95 mg/mL 五味子甲素对照品溶液(80、100、120 μL,测定,结果平均回收率为 95.58%,RSD 为 2.74%。

3.9 样品测定:分别取 3 批利肝隆片各 20 片,除去糖衣,精密称定质量,计算平均片重为 0.396 6 g,制备供试品溶液,另取五味子甲素对照品溶液,进样,测定,按外标法计算质量分数,结果见表 1。

表 1 利肝隆片中五味子甲素的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of deoxyschizandrin in Liganlong Tablet (n=3)

| 批号 | 五味子甲素/(mg·片 ⁻¹) |
|--------|-----------------------------|
| 040301 | 0.035 59 |
| 040402 | 0.034 14 |
| 040403 | 0.034 18 |

4 讨论

4.1 检测波长的选择:对五味子甲素的甲醇溶液在 200~250 nm 波长进行扫描,图谱显示在 216 nm 处有最大吸收,故选定为测定波长。

4.2 测定方法的选择:取样品 3 g,①加正己烷浸一夜,然后索氏提取 6 h;②加正己烷浸一夜;③加正己烷超声处理 30 min;④甲醇回流提取 2 h。分别按 3.2 项下的方法处理和测定,流动相选用甲醇-水(68:32,70:30,72:28,75:25)进行分析,进样 10 μL,结果④法提取液杂质峰太多,不能与主峰分离,①、②、③法比较,①、②法均比③法提取完全,但②法操作简单,故提取方法选②法;流动相为甲醇-水(68:32)时,供试品主峰与杂峰得到基本分离,又参照文献报道并改进流动相为甲醇-乙腈-0.4%磷酸溶液(70:10:21)后,供试品的主峰与杂峰得到很好分离。