

三藤片质量控制

沈熊, 杨春欣, 梁健, 吕迁洲

(复旦大学附属中山医院药剂科, 上海 200032)

摘要 目的 建立三藤片的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法鉴别方中雷公藤、大血藤和鸡血藤,采用高效液相色谱(HPLC)法测定雷公藤甲素含量。结果 在TLC色谱中可以检出雷公藤、鸡血藤和大血藤的特征斑点,雷公藤甲素在0.816~8.160 μg范围内呈线性关系, $r=0.999$ ($n=5$),雷公藤甲素平均回收率97.19%,RSD为1.62%。结论 该方法简便可靠,重复性好,能有效控制该制剂质量。

关键词 三藤片;雷公藤甲素;质量标准;色谱法,薄层;色谱法,高效液相

中图分类号 R286;R927.1 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)11-1474-03

Study on Quality Standard of Santeng Tablets

SHEN Xiong, YANG Chun-xin, LIANG Jian, LV Qian-zhou (Department of Pharmacy, Zhongshan Affiliated Hospital to Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Objective To establish a quality standard for Santeng tablets. **Methods** *Tripterygium wilfordii*, *sargentgloryvine stem* and *caulis spatholobi* in the formula were indentified by thin layer chromatography(TLC) and the triptolide was determined by HPLC. **Results** The characteristic spots of *tripterygium wilfordii*, *caulis spatholobi* and *sargentgloryvine stem* can be detected by TLC. Triptolide presented a linear range from 0.816~8.160 μg, with correlation coefficient (r) as 0.999. The average recovery and RSD were 97.19% and 1.62%, respectively. **Conclusion** This method is simple, reliable and reproducible, and can be used for the quality control of the preparation.

KEY WORDS Santeng tablet; Triptolide; Quality standard; TLC; HPLC

三藤片为本院自制制剂(批准文号:沪药制字Z-05171114),临床应用已近20年,疗效确切,不良反应小。本品由雷公藤、大血藤、鸡血藤等组成,具有清热解毒、活血化淤功效,用于治疗结缔组织疾病、银屑病和急慢性湿疹等皮肤病。方中君药雷公藤(*tripterygium Wilfordii* Hook. F)为卫矛科木质藤本植物,是中药治疗风湿性关节炎的有效药物。雷公藤甲素(triptolide, TP)是从雷公藤中分离出来的一种环氧二萜类化合物,具有抗肿瘤和免疫抑制等多种临床疗效。为有效监控该制剂质量,笔者采用薄层色谱(TLC)法对雷公藤、大血藤和鸡血藤进行了定性鉴别研究;并以TP为含量测定指标,建立了测定TP含量的高效液相色谱(HPLC)方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相系统, Agilent

收稿日期 2012-03-16 修回日期 2012-05-31

基金项目 *上海市科学技术委员会2009中药现代化专项(09DZ1970500)

作者简介 沈熊(1973-),男,浙江慈溪人,主管药师,硕士,主要研究方向:药物新剂型新技术。电话:021-64041990-2181, E-mail: shen.xiong@zs-hospital.sh.cn。

通讯作者 吕迁洲(1956-),男,江苏扬州人,教授,主任药师,博士生导师,硕士,主要研究方向:临床药学和医院药学。电话:021-64041990-2188, E-mail: lv.qianzhou@zs-hospital.sh.cn。

ChemStation B.04.02 工作站。

1.2 试药 TP(批号:11723-200206),芒柄花素(批号:111703-200511),雷公藤次碱(批号:110752-200516),大血藤对照药材(批号:121353-200411),对照品和对照药材均由中国食品药品检定研究院提供,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。样品三藤片(本院自制,批号:20101101, 20101102, 20101103)。

2 TLC 鉴别

2.1 雷公藤 取样品10片,研细,用乙醚萃取2次,每次20 mL,合并乙醚液,回收至干,残渣用三氯甲烷1 mL溶解,加入中性氧化铝1.5~2.0 g搅拌均匀,挥干,上中性氧化铝柱(内径1.5 cm,长度15 cm,15 g),以石油醚50 mL洗脱,弃去,再分别以石油醚:乙酸乙酯(8:2)和(1:1)各50 mL洗脱,回收溶剂至干,用三氯甲烷1 mL溶解,作为供试品溶液。另取雷公藤次碱对照品加三氯甲烷溶解,制成0.4 mg·mL⁻¹对照品供试液。取缺雷公藤的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按照《中华人民共和国药典》2010年版一部“薄层色谱法”(附录VI B)实验,分别吸取上述3种溶液各2 μL,点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-三氯甲烷-甲醇-浓氨水(25:50:10:1)为展开剂展开。取出晾干,喷碘化铋钾液,供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上,日光下显相同

颜色的斑点,而阴性对照无斑点。结果见图 1。

2.2 大血藤^[1] 取样品 10 片,研细,加甲醇 50 mL,超声处理 60 min,滤过,滤液蒸干,残渣加 2% 氢氧化钠溶液 10 mL 使溶解,用盐酸调节 pH 至 2,用乙醚振荡提取 3 次,每次 10 mL,合并乙醚液,挥干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取大血藤对照药材 5 g,同法制成对照药材溶液。再取缺大血藤的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照《中华人民共和国药典》2010 年版一部薄层色谱法(附录 VI B)实验,吸取上述两种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-丙酮-甲酸(10:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 三氯化铁乙醇溶液,置紫外光灯(波长 365 nm)下检视。供试品色谱中,与对照药材色谱相应的位置上,紫外光下显相同颜色的荧光斑点,而阴性对照在相同位置无此斑点存在。结果见图 1。

2.3 鸡血藤^[2] 取样品 10 片,研细,加入乙醇 100 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,加入硅胶 1 g 拌匀,挥干溶剂,置硅胶柱(100~200 目,5 g,内径为 2.0 cm,干法装柱)上,依次用石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)30 mL、甲醇-三氯甲烷(1:9)60 mL 洗脱,收集甲醇-三氯甲烷(1:9)洗脱液,蒸干,残渣加三氯甲烷 0.5 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取芒柄花素对照品,加甲醇制成每毫升含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。再取缺鸡血藤的阴性样品,按供

试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按照《中华人民共和国药典》2010 年版一部薄层色谱法(附录 VI B)实验,吸取供试品溶液 5~10 μ L、对照品溶液 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(20:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(波长 254 nm)下检视。供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,而阴性对照在相同位置无此斑点存在。结果见图 1。

3 定量测定

3.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zobrax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m);流动相:甲醇-0.05% 三氟乙酸(50:50);检测波长:221 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:0.8 mL \cdot min⁻¹;进样量:10 μ L;依照上述色谱条件测定,理论板数以 TP 计不低于 3 000,TP 与其他组分均能达到基线分离。阴性样品溶液在 TP 对照品相同保留时间位置上未见色谱峰,说明无干扰,结果见图 2。

3.2 对照品溶液的制备 称取 TP 对照品 10.2 mg,置 25 mL 量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度,配成每毫升甲醇中含 TP0.408 mg 溶液,即得。

3.3 供试品溶液的制备 取片剂适量,研细,混匀,取 1 g,精密称定,加乙酸乙酯 200 mL,水浴回流 2 h,滤过,残渣用乙酸乙酯洗涤 2 次,每次 10 mL,合并提取液及洗液,回收乙酸乙酯至 1~2 mL,上中性氧化铝柱(100~200 目,3 g,内径 1.5 cm,长约 5 cm),以乙酸乙酯-石油醚(1:9)80 mL 淋洗,弃去淋洗液,再以乙酸

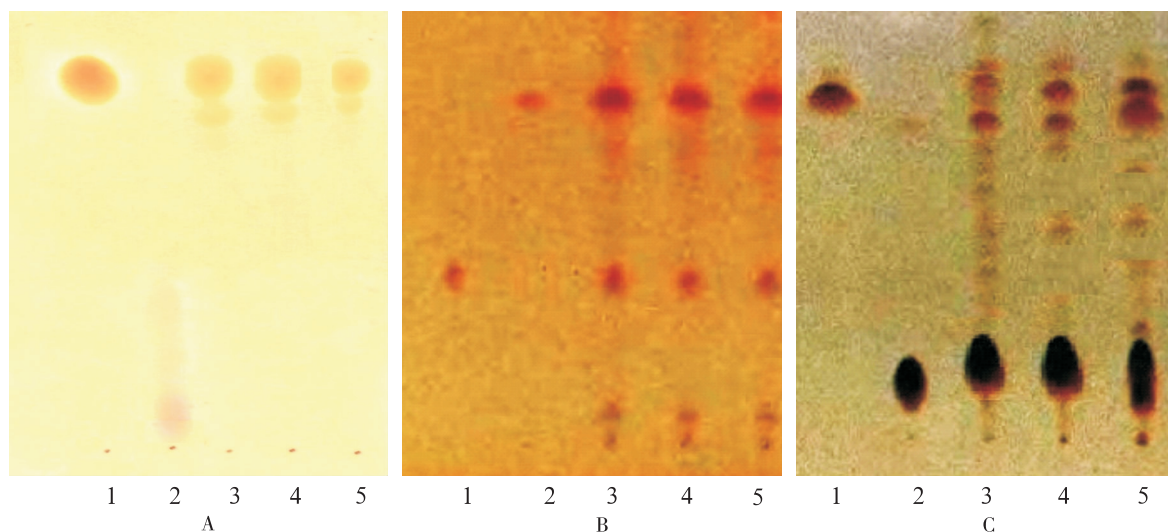


图 1 三藤片中雷公藤(A)、大血藤(B)、鸡血藤(C)薄层色谱图

1. 对照品溶液;2. 阴性对照品溶液;3~5. 供试品溶液

Fig. 1 TLC of *Tripterygium Wilfordii* (A), *sargentgloryvine stem* (B), and *caulis spatholobi* (C) in *santeng* tablet

1. reference;2. negative control without *Tripterygium Wilfordii* Hook. F;3-5. test samples

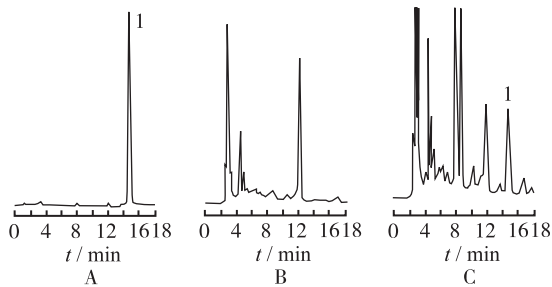


图2 3种溶液 HPLC 图

A. 对照品; B. 阴性样品; C. 供试品; 1. TP

Fig. 2 HPLC chromatograms of three solutions tablet sample

A. regerence; B. negative sample; C. sample solution; 1. Triptolide

乙酯-石油醚(9 : 1)200 mL 洗脱, 收集洗脱液并回收至干, 加甲醇适量使溶解, 置 5 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 经孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

3.4 阴性样品溶液的制备 按处方比例及制备工艺, 制成未加入雷公藤药材的阴性样品, 照供试品溶液的制备方法, 取阴性样品 1.0 g, 制成阴性样品溶液。

3.5 线性范围考察 精密吸取上述对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μL, 进样, 按上述色谱条件测定其峰面积值。以峰面积值(X)对进样量(Y, μg)进行回归, 得回归方程为 Y=36 200X+5 220, r=0.999 (n=5), 表明 TP 进样量在 0.816 ~8.160 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系。

3.6 精密度实验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL, 于同日内连续进样 6 次, 记录峰面积, TP 的 RSD 为 0.22% (n=6)。连续 3 d 内(每日 2 次)进行测定, 记录峰面积, TP 的 RSD 为 0.98% (n=6)。

3.7 稳定性实验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 12, 24, 48, 72 h 进样 10 μL, 记录峰面积, TP 的 RSD 为 0.58%, 表明处理后的样品溶液室温放置 3 d 稳定性良好。

3.8 重复性实验 取同一批样品(批号: 20101103)6 份, 按“3.3”项方法制备, 再按“3.1”项色谱条件测定, TP 的 RSD 为 1.20%。

3.9 加样回收率 精密称取适量已知含量的样品(批

号: 20101103, 含量 2.07 mg · g⁻¹)6 份, 分别加入一定量对照品溶液, 按“3.3”项方法制备, 测定, TP 平均回收率 94.15%, RSD 为 1.62%, 结果见表 1。

表 1 TP 加样回收实验结果 (n=6)

Tab.1 Result of recovery test

取样量/ g	样品含量	加入量	测得量	回收率/ %
	mg			
1.000 8	2.071 7	2.040 0	4.092 5	99.06
0.998 9	2.067 7	2.040 0	4.023 2	95.86
1.000 5	2.071 0	2.040 0	4.084 5	98.70
1.000 3	2.070 6	2.040 0	4.032 2	96.16
1.000 2	2.070 4	2.040 0	4.068 9	97.97
0.999 6	2.069 2	2.040 0	4.015 6	95.41

3.10 样品测定 取 3 批样品, 按“3.3”项方法制备, 再按“3.1”项色谱条件测定, 以外标法计算片剂中 TP 含量, 3 批片剂含量分别为 2.22, 2.30, 2.07 mg · g⁻¹。

4 讨论

对于雷公藤的鉴别, 笔者察了不同提取方法和展开系统, 最终确定用乙醚提取, 中性氧化铝柱预处理, 环己烷-三氯甲烷-甲醇-浓氨水为展开系统, 可以得到较好的结果。参考《中华人民共和国药典》2010 版 I 部方法, 确定大血藤和鸡血藤的鉴别方法。

含量测定供试品溶液的制备, 三藤片是中药复方制剂, 其中的杂质对所测成分 TP 有一定的干扰^[3]; 而雷公藤成分复杂, TP 的含量较低。采用乙酸乙酯提取, 中性氧化铝柱对样品预处理, 可以有效去除色素、杂质及辅料对测定的影响, 得到较好的分离和纯化。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 19, 180.

[2] 乔化民, 乔艳, 陈岳祥, 等. 不同水浴回流时间对粉背雷公藤茎枝中雷公藤甲素含量测定的影响[J]. 医药导报, 2010, 29(6): 788-790.

[3] 张涛, 金描真, 方成玲. HPLC 法测定抗哮喘滴丸中雷公藤甲素的含量[J]. 安徽医药, 2011, 15(7): 830-831.

DOI 10.3870/yydb.2012.11.028