

三叶青藤叶配方颗粒稳定性研究

谢平,陈丹*,熊朝栋,余文静,刘永静
(福建中医药大学药学院,福建福州350122)

摘要:目的 考察三叶青藤叶配方颗粒的稳定性,为三叶青藤叶配方颗粒的生产、包装、贮存提供科学依据及指导意见。方法 通过影响因素稳定性试验及常温3个月初步稳定性试验,按照已建立的质量标准方法和《中华人民共和国药典》(2015年版)规定,分别对三批样品进行鉴别、检查和含量测定。结果 三批三叶青藤叶配方颗粒的性状、薄层色谱鉴别、水分检查、总黄酮含量、效应组分群含量测定等检测项目均符合规定,在高温影响因素试验中,颗粒水分含量略有增加。结论 提示三叶青藤叶配方颗粒生产过程及设计包装时应注意控制颗粒吸潮,密封贮存,且存储条件宜阴凉干燥。

关键词:三叶青藤叶配方颗粒;稳定性试验;质量控制

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

文章编号:1000-338X(2020)06-0033-05

DOI:10.13260/j.cnki.jfjtc.012127

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg.)为葡萄科崖爬藤属植物,是我国特有的珍稀药用植物、民间常用药。研究表明三叶青具有抗肿瘤、抗炎、解热镇痛、抗病毒及免疫调节等药理作用^[1-3]。三叶青藤叶配方颗粒是以其饮片为原料经水煎煮、浓缩、喷雾干燥、制粒等工艺制备而成,即冲即饮,携带方便。药物稳定性研究是质量控制的主要组成部分,药物需要有一定的稳定性才能确保在生产、流通和贮藏中的质量。通过考察药物在各种环境因素如温度、湿度等的影响下随时间的变化规律,为药物的生产、包装、贮藏条件的确定提供科学依据,保障用药的安全有效^[4]。因此,实验根据“中药、天然药物稳定性研究技术指导原则”^[5],采用已建立的三叶青藤叶配方颗粒质量标准,以聚酰胺薄层色谱法鉴别三叶青藤叶配方颗粒,并对配方颗粒进行水分检查;采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法,以主要代表性成分异荜草苷为对照,测定其总黄酮含量;并以高效液相色谱法(HPLC法)同时测定三叶青藤叶配方颗粒中特征效应组分群含量^[6-8];通过影响因素试验及常温3个月初步稳定性试验,考察三叶青藤叶配方颗粒的稳定性。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters 2998 PDA 检测器、Empower 3 色谱工作站[沃特世科技(上海)有限公司];AR2140 万分之一电子天平、XS205 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);UV-4802 型双光束紫外可见分光

光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);TDL-40B 型低速离心机(上海安亭科学仪器厂);Yoko-PN 电动喷雾器(武汉药科新技术开发有限公司);ZF1- 型多功能紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.2 试药 三叶青藤叶饮片由福州集珍园生物科技有限公司提供,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室范世明高级实验师鉴定。三叶青藤叶配方颗粒(自制,批号:20160418、20160419、20160420);新绿原酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-16021806,含量≥98%);绿原酸对照品(批号:110753-201612,含量≥98%);荜草苷对照品(批号:111776-201302,含量≥98%);异荜草苷对照品(批号:111974-201401,含量≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;异荜草苷-2'-O-鼠李糖苷对照品(自制,含量≥98%);聚酰胺薄膜(浙江台州路桥四甲生化塑料厂);甲醇为色谱纯;36%乙酸等其余试剂为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 考察项目的确定 取三叶青藤叶配方颗粒三批,分别考察其外观性状、气味及色泽等;薄层色谱法鉴别,观察在对照品绿原酸、异荜草苷和异荜草苷-2'-O-鼠李糖苷显色斑点位置,供试品是否有相同颜色的荧光斑点出现;检查配方颗粒水分限量是否低于8%;主成分异荜草苷为对照,亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定配方颗粒总黄酮含量;HPLC法同时测定新绿原酸、绿原酸、荜草苷、异荜草苷和异荜草苷-2'-O-鼠李糖苷效应组分群含量;以三批样品实验数据为基础并结合药材含量及工艺收率综合分析制定含量限度。

2.2 性状 三叶青藤叶配方颗粒应为黄棕色至深棕色颗粒,气香,色泽均匀。

2.3 三叶青藤叶配方颗粒薄层色谱法鉴别

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取绿原酸对照品

收稿日期:2020-08-02

基金项目:福建省科技指导性项目(2019Y0037);福建省中医药科技项目(2017FJZY202);福建省科技计划项目(2010Y2004);中管局中药分析学重点学科校管课题(X2014096-学科)

作者简介:谢平(1993—),男,硕士研究生,主要从事中药制剂与质量分析评价。

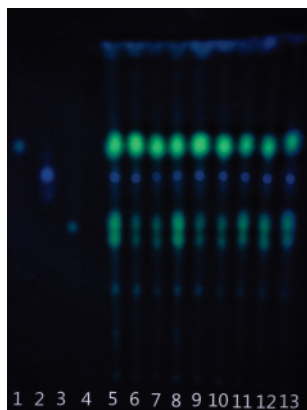
通信作者:陈丹(1961—),女,药理学博士,教授。

E-mail:2536282060@qq.com

适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 绿原酸的溶液,摇匀,即得;精密称取异荭草苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 异荭草苷的溶液,摇匀,即得;精密称取异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷的溶液,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液制备 三叶青藤叶饮片供试品溶液的制备,称取三叶青藤叶饮片粉末 1 g,加水适量提取 1 h,滤过,滤液蒸干,加甲醇 25 mL 超声溶解,即得。三叶青藤叶配方颗粒供试品溶液的制备,称取三叶青藤叶配方颗粒 0.5 g,加甲醇 25 mL 超声溶解,即得。

2.3.3 薄层色谱法鉴别 分别吸取绿原酸对照品溶液、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷对照品溶液、异荭草苷对照品溶液、三批三叶青藤叶配方颗粒供试品溶液、三叶青藤叶饮片对照溶液各 2 μ L,点于同一聚酰胺薄膜上,以 36%乙酸为展开剂,饱和 20 min 后展开,取出,晾干,喷以 3%三氯化铝乙醇溶液,于 105 $^{\circ}$ C 加热 5 min,置于 365 nm 紫外灯下检视^[8]。观察在对照品斑点出现的相应位置,供试品溶液是否有相同颜色的荧光斑点出现。结果见图 1。



注:1 异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷对照;2 绿原酸对照;3 异荭草苷对照;4 阴性对照;5~7 三批三叶青藤叶配方颗粒;8~10 三批三叶青藤叶中间体;11~13 三批三叶青藤叶饮片。

图 1 三叶青藤叶配方颗粒、中间体、饮片薄层色谱图

2.4 水分检查 精密称取三叶青藤叶配方颗粒 2.0 g,平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中,厚度不超过 5 mm,每批平行测定 3 份,按《中华人民共和国药典(四部)》(2015 年版)通则“0832 水分测定法”的第二法(烘干法)^[9]测定,计算供试品中含水量。

2.5 三叶青藤叶配方颗粒总黄酮含量测定

2.5.1 对照品溶液制备 精密称取异荭草苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.193 2 mg 异荭草苷的溶液,摇匀,即得。

2.5.2 供试品溶液的制备 精密称取三叶青藤叶

配方颗粒约 0.2 g,置 25 mL 量瓶中,加 30%甲醇超声溶解,放置至室温后,用 30%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5.3 标准曲线制备及线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇至 6 mL,精密加入 5%亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,再精密加入 10%硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,精密加入 4%氢氧化钠试液 10 mL,加水稀释至刻度,摇匀放置 15 min,以空白溶剂及显色剂为参比,在 500 nm 波长处测定吸光度,以浓度 $C(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线^[8]。实验结果表明:异荭草苷在 7.73 ~ 61.82 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $A = 1.41 \times 10^{-2}C - 4.3 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9999$)。

2.5.4 样品含量测定 精密称取配方颗粒 0.2 g,按“2.5.2”“2.5.3”项下同法操作、显色,在 500 nm 波长处测定供试品溶液吸光度,计算总黄酮含量。

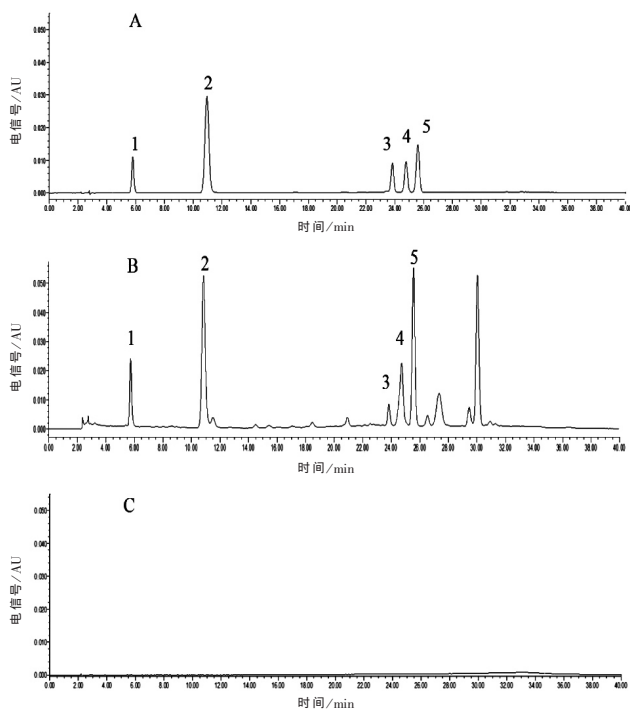
2.6 HPLC 法同时测定三叶青藤叶配方颗粒中 5 个效应组分含量

2.6.1 混合对照品溶液制备 精密称取新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷对照品适量,加适量甲醇超声溶解,放置室温,用甲醇制成新绿原酸质量浓度为 0.093 0 mg/mL、绿原酸质量浓度为 0.205 0 mg/mL、荭草苷质量浓度为 0.046 0 mg/mL、异荭草苷质量浓度为 0.105 0 mg/mL、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷质量浓度为 0.189 0 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.6.2 供试品溶液制备 精密称取三叶青藤叶配方颗粒约 0.2 g,置 25 mL 容量瓶中,加 30%甲醇超声溶解,放置至室温后,用 30%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.6.3 色谱条件与系统适用性试验及测定法 色谱柱 250-4 Lichrocart C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相 甲醇(A)-0.5%甲酸水溶液(B),梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 20% A; 10 ~ 15 min, 20% A \rightarrow 25% A; 15 ~ 20 min, 25% A \rightarrow 33.5% A; 20 ~ 23 min, 33.5% A; 23 ~ 30 min, 33.5% A \rightarrow 40% A; 30 ~ 40 min, 40% A \rightarrow 20% A); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 340 nm; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μL ^[8]。新绿原酸、绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷对照品在规定的色谱条件下,各色谱峰分离度(R) > 1.5,理论塔板数按绿原酸计不得低于 3 000。分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪中,测量色谱峰面积,外标法计算各效应组分含量。结果见图 2。

2.6.4 标准曲线制备与线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,30%甲醇稀释至刻度,摇



注:A 混合对照品;B 供试品;C 阴性对照。1 新绿原酸;2 绿原酸;3 荭草苷;4 异荭草苷;5 异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷。

图 2 三叶青藤叶配方颗粒高效液相色谱图

匀。分别精密吸取对照品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪中, 以浓度 C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标进行线性回归, 绘制标准曲线。实验结果表明: 新绿原酸在 2.325 ~ 93.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围呈良好线性关系, 回归方程为 $y = 2.0176 \times 10^4 x + 5.1472 \times 10^3$, $r = 0.9999$; 绿原酸在 5.125 ~ 205.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围呈良好线性关系, 回归方程为 $y = 2.2214 \times 10^4 x + 9.6010 \times 10^3$, $r = 0.9999$; 荭草苷在 1.150 ~ 46.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围呈良好线性关系, 回归方程为 $y = 2.2644 \times 10^4 x + 2.5663 \times 10^3$, $r = 0.9999$; 异荭草苷在 2.625 ~ 105.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围呈良好线性关系, 回归方程为 $y = 2.7577 \times 10^4 x + 1.9052 \times 10^3$, $r = 0.9999$; 异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷在 4.725 ~ 189.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围呈良好线性关系, 回归方程为 $y = 1.6289 \times 10^4 x + 3.7324 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。

2.7 常温留样试验 取三叶青藤叶配方颗粒三批, 室温条件下放置, 于 0、1、2、3 月取样考察稳定性。结果表明: 三叶青藤叶配方颗粒各项考察指标未见明显变化, 即性状、鉴别、水分检查均符合规定, 且与 0 月比较, 含量测定结果均高于各批次平均含量的 90%, 提示三叶青藤叶配方颗粒常温下质量稳定。水分及含量测定结果见表 1。

2.8 影响因素试验

2.8.1 高温试验 取三叶青藤叶配方颗粒三批, 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 10 d, 于 0、5、10 天取样考察。实验

结果表明: 三叶青藤叶配方颗粒各项考察指标未见明显变化, 即性状、鉴别、水分检查均符合规定, 且与 0 天比较, 含量测定结果均高于各批次平均含量的 90%, 提示三叶青藤叶配方颗粒高温条件下质量稳定。水分及含量测定结果见表 1。

2.8.2 高湿试验 取三叶青藤叶配方颗粒三批, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 75% 条件下放置 10 d, 分别于 0、5、10 天取样考察。实验结果表明: 三叶青藤叶配方颗粒性状、鉴别等各项考察指标均符合规定, 与 0 天相比, 含量测定结果高于各批次平均含量的 90%; 其中配方颗粒的水分测定结果有所增加 (仍在规定范围内), 出现吸湿增重。提示三叶青藤叶配方颗粒在高湿条件下质量较稳定, 在生产、设计包装、贮存时应注意配方颗粒的吸潮问题。水分及含量测定结果见表 1。

3 讨论

3.1 聚酰胺薄膜既能分离水溶性物质, 也可以分离脂溶性物质, 与各极性分子产生强弱不同的氢键吸附能力, 使之分离。采用聚酰胺薄膜, 选择三叶青藤叶配方颗粒的主要效应组分绿原酸、异荭草苷、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷为对照, 同时与三叶青藤叶对照药材饮片对照, 鉴别配方颗粒, 以 36% 乙酸为展开剂时分离效果较好, 斑点分离效果最佳, 阴性对照无干扰。

3.2 依据课题组研究建立的三叶青藤叶配方颗粒总黄酮含量测定法, 选取其中含量较高且较容易获得的效应组分代表异荭草苷为对照指标, 采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法, 在供试品溶液和对照品溶液显色后的最大吸收波长 500 nm 处测定, 从整体上定量控制其有效部位总黄酮含量。另外, 采用 HPLC 法同时测定三叶青藤叶配方颗粒 5 个效应组分含量, 从多指标层面定量控制配方颗粒质量。经方法学考察, 含量测定的准确度、精密性、灵敏度良好, 为配方颗粒质量标准含量测定法及其稳定性考察奠定了准确的分析方法基础。

3.3 将三叶青藤叶配方颗粒样品在常温、或暴露在空气中接受高温、高湿环境的考验, 考察各项评价指标的变化, 为贮藏、工艺稳定提供参考。结果提示影响因素试验中, 湿度是影响三叶青藤叶配方颗粒稳定性的主要因素之一, 高湿环境下, 配方颗粒出现吸湿, 水分含量有所增加; 同时提示需关注制备工艺过程的中间体喷雾干燥粉, 避免出现吸潮; 另外, 温度, 尤其在高温下对配方颗粒绿原酸及新绿原酸的含量也稍有影响。因此, 为确保该配方颗粒在生产、流通和贮藏中的质量稳定, 提示本品包装应密封保存, 存储条件宜阴凉干燥。

表 1 三叶青藤叶配方颗粒常温、高温、高湿稳定性试验水分及总黄酮和效应组分群含量考察结果

批号	时间	水分/ %	总黄酮/ %	新绿原酸/ (mg/g)	绿原酸/ (mg/g)	荭草苷/ (mg/g)	异荭草苷/ (mg/g)	异荭草苷-2'-O- 鼠李糖苷/(mg/g)	
20170722	常温	0月	4.39	60.13	1.099	2.687	0.472	1.393	2.113
		1月	4.52	58.23	1.054	2.430	0.583	1.397	2.170
		2月	4.66	60.00	1.082	2.599	0.554	1.383	2.169
		3月	4.83	57.32	1.062	2.593	0.524	1.344	2.102
	高温	0天	4.39	60.13	1.099	2.687	0.472	1.393	2.113
		5天	4.32	59.43	0.963	2.669	0.475	1.378	2.165
		10天	4.48	58.25	0.989	2.701	0.480	1.482	2.283
	高湿	0天	4.39	60.13	1.099	2.687	0.472	1.393	2.113
		5天	5.78	55.86	1.139	2.814	0.528	1.457	2.268
		10天	5.88	54.30	0.997	2.689	0.540	1.442	2.202
20170723	常温	0月	3.25	64.22	0.942	3.302	0.375	1.485	3.997
		1月	3.45	62.23	0.926	3.111	0.334	1.384	3.581
		2月	3.59	63.12	0.921	3.082	0.341	1.400	3.621
		3月	3.79	61.25	0.878	2.780	0.307	1.403	3.557
	高温	0天	3.25	64.22	0.942	3.302	0.375	1.485	3.997
		5天	3.34	64.04	0.869	3.387	0.394	1.563	4.181
		10天	3.56	62.56	0.851	3.267	0.385	1.531	4.099
	高湿	0天	3.25	64.22	0.942	3.302	0.375	1.485	3.997
		5天	5.55	57.44	0.880	3.251	0.370	1.475	3.964
		10天	5.83	57.32	0.856	3.388	0.339	1.422	3.928
20170724	常温	0月	3.28	59.24	0.803	2.345	0.269	1.039	2.714
		1月	3.55	60.21	0.847	2.335	0.269	1.039	2.712
		2月	3.67	57.25	0.821	2.346	0.275	1.027	2.783
		3月	3.98	55.32	0.759	2.551	0.277	1.002	2.715
	高温	0天	3.28	59.24	0.803	2.345	0.269	1.039	2.714
		5天	3.48	58.82	0.743	2.304	0.274	1.059	2.798
		10天	3.52	56.31	0.725	2.319	0.278	1.075	2.824
	高湿	0天	3.28	59.24	0.803	2.345	0.269	1.039	2.714
		5天	5.46	56.94	0.793	2.330	0.268	1.034	2.760
		10天	5.92	57.70	0.731	2.245	0.276	1.077	2.795

注:标准如下:水分限量为 8%,总黄酮含量限度为 50.0%,效应组分群含量限度为新绿原酸 0.66 mg/g、绿原酸 1.95 mg/g、红草苷 0.26 mg/g、异荭草苷 0.91 mg/g、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷 2.06 mg/g。

参考文献

- [1] 蔡伟炜,陈丹,范世明,等. 中药三叶青化学成分及药理作用研究进展[J]. 天津药学,2014,26(1):38-41.
- [2] 林婧,纪明妹,黄泽豪,等. 三叶青的化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(8):658-663.
- [3] 廖淑彬,蔡伟炜,陈丹,等. 闽产三叶青地上部分提取物体内抗炎镇痛作用研究[J]. 中国现代应用药学,2017,34(3):319-324.
- [4] 陈金凤,杨东亮,朱青梅,等. 复方芍红颗粒的稳定性研究[J]. 中国医药导报,2017,14(6):151-155.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2006:209-216.
- [6] 陈丹,蔡伟炜,范世明. 三叶青地上部分总黄酮的提纯方法:CN 201410648201.2[P]. 2015-03-25.
- [7] 谢平,陈丹,黄娇,等. 三叶青藤茎叶药材饮片质量控制研究[J]. 福建医科大学学报,2017,51(5):291-297.
- [8] 谢平,陈丹,洪丽婷,等. 三叶青藤叶配方颗粒的质量标准研究及其 5 种有效成分的含量测定[J]. 中国药房,2020,31(8):939-944.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:8,57,103-104.