

六味地黄苷糖片多指标成分的溶出度考察

胡军华¹, 王晓娇¹, 乔善义², 吴云¹, 黄文哲¹, 王振中^{1*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001;
2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

[摘要] **目的:**建立六味地黄苷糖片中多指标成分的溶出度测定方法,为该制剂的质量控制提供参考。**方法:**采用 HPLC 测定莫诺苷、马钱苷和芍药苷的含量,流动相水(A)-甲醇(B)-乙腈(C)梯度洗脱(0~10 min,76% A,20% B,4% C;10~30 min,76%~69% A,20%~27% B,4% C),检测波长 236 nm。采用小杯法,以水为溶出介质,对六味地黄苷糖片中莫诺苷、马钱苷和芍药苷进行溶出度测定。**结果:**莫诺苷、马钱苷和芍药苷的线性范围分别为 4.87~155.75,4.86~155.35,2.83~180.85 mg·L⁻¹,平均加样回收率分别为 99.88% (RSD 1.6%),101.10% (RSD 1.8%)和 100.20% (RSD 1.4%)。各成分在 90 min 内的累积溶出度均 >75%。**结论:**六味地黄苷糖片批内和批间样品中莫诺苷、马钱苷和芍药苷的累积溶出率差异较小。该溶出度测定方法简便准确、重复性好,适用于六味地黄苷糖片的质量控制。

[关键词] 六味地黄苷糖片; 溶出度; 莫诺苷; 马钱苷; 芍药苷

[中图分类号] R283.6;R944.5;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0015-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016130015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160512.1605.014.html>

[网络出版时间] 2016-05-12 16:05

Investigation of Dissolution of Three Components in Liuwei Dihuang Gantang Tablets

HU Jun-hua¹, WANG Xiao-jiao¹, QIAO Shan-yi², WU Yun¹, HUANG Wen-zhe¹, WANG Zhen-zhong^{1*}

(1. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process,
Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining *in vitro* dissolution of three components in Liuwei Dihuang Gantang tablets. **Method:** HPLC was adopted to determine contents of morroniside, loganin and paeoniflorin with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water for gradient elution and the detection wavelength at 236 nm. Taking water as dissolution medium, cup method was employed to determine *in vitro* dissolution of these three components. **Result:** The linear ranges of morroniside, loganin and paeoniflorin were 4.87-155.75, 4.86-155.35, 2.83-180.85 mg·L⁻¹ with average recoveries of 99.88% (RSD 1.6%), 101.10% (RSD 1.8%) and 100.20% (RSD 1.4%), respectively. The accumulation dissolution of each component in 90 minutes was more than 75%. **Conclusion:** Differences of the accumulation dissolution of morroniside, loganin and paeoniflorin in identical batch and different batches of samples are small. This established method is repeatable for quality control of Liuwei Dihuang Gantang tablets.

[Key words] Liuwei Dihuang Gantang tablets; dissolution; morroniside; loganin; paeoniflorin

[收稿日期] 20150831(008)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 胡军华,工程师,从事新药质量标准研究,Tel:13655139779,E-mail:hujunhua2001@163.com

[通讯作者] *王振中,博士,研究员级高级工程师,从事中药新药的研究与开发,Tel:0518-81152337,E-mail:kanionlunwen@163.com

六味地黄苷糖片是在传统六味地黄汤基础上,结合现代药理学、药效学活性评价,经现代分离技术提取纯化而得。该制剂的主要活性部位包括苷类、寡糖类和多糖类,其中苷类部位中可测定成分主要有马钱苷、莫诺苷和芍药苷^[1]。本品含大量糖类成分,黏性大,故仅依靠崩解时限检查作为六味地黄苷糖片在体内吸收的评定标准,显然是不够完善的,因为崩解仅仅是药物溶出的最初阶段,不能客观反映药物在体内溶出的全过程,而溶出度检查却包括了崩解及溶解过程,能客观地反映药物被吸收利用程度,所以目前越来越多的中药制剂参照溶出度的指导原则进行中药溶出度的研究^[2-8]。通过溶出度比较可较明显地区别不同厂家制剂的差异^[3],且溶出度研究已由单指标成分上升到目前的多指标成分研究^[8]。本实验以莫诺苷、马钱苷和芍药苷为指标成份^[3-11],采用 HPLC 研究六味地黄苷糖片的溶出度,建立各指标成分的溶出度测定方法,为该制剂的质量控制提供实验依据。

1 材料

2695-2487 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司),AE-240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国密理博公司),8CZ-8M 型溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司)。六味地黄苷糖片(江苏康缘药业股份有限公司,批号 20110301,20110302,20110501,20110502,20110901,20110902,20111001,20111201,20111202,20111203),莫诺苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 MUST-10023100),马钱苷、芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 11164-201005,110736-200732),水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相水(A)-甲醇(B)-乙腈(C)梯度洗脱(0~10 min,76% A,20% B,4% C;10~30 min,76%~69% A,20%~27% B,4% C),检测波长 236 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。理论板数按芍药苷峰计算均>3 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取莫诺苷、马钱苷、芍药苷对照品适量,加水溶解并稀释成质量浓度分别为 100,100,50 mg·L⁻¹ 的混合溶液,摇匀,即得。

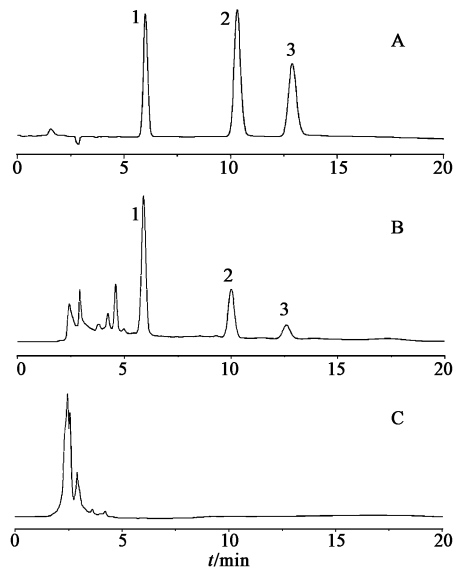
2.3 供试品溶液的制备 取本品 10 片,精密称定,

研细,精密称取约 0.2 g,置 10 mL 量瓶中,加水适量,超声处理(250 W,50 Hz)5 min,放冷,用水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 莫诺苷、马钱苷来源于酒萸肉;芍药苷来源于牡丹皮。按照处方工艺,制备缺酒萸肉和牡丹皮的阴性样品,按 2.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 将各阴性样品溶液注入液相色谱仪,结果在与对照品色谱峰相应的位置无色谱峰,说明该方法专属性良好,见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 莫诺苷; 2. 马钱苷; 3. 芍药苷

图 1 六味地黄苷糖片 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Liuwei Dihuang Gantang tablets

2.5.2 线性关系考察 分别精密称取莫诺苷、马钱苷、芍药苷适量,加甲醇配成质量浓度分别为 311.6,310.7,361.7 mg·L⁻¹ 的混合对照品浓溶液,依次稀释得系列混合对照品溶液,按 2.1 项下条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程依次为 $Y = 22\ 686.5 X + 2\ 479.9$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 29\ 893.3 X + 2\ 907.1$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 22\ 950.9 X - 6\ 103.0$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围分别为 4.87~155.75, 4.86~155.35, 2.83~180.85 mg·L⁻¹。

2.5.3 精密度试验 精密吸取莫诺苷、马钱苷、芍药苷混合对照品溶液各 10 μL,按 2.1 项下条件连续进样 6 次,结果莫诺苷、马钱苷、芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.7%,0.3%,0.7%。

2.5.4 稳定性试验 精密称取六味地黄苷糖片

(批号 20110301) 0.2 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 h 按 2.1 项下条件测定, 结果莫诺昔、马钱苷、芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.6%, 0.7%。表明供试品溶液室温放置 36 h 内稳定。

2.5.5 重复性试验 精密称取六味地黄苷糖片(批号 20110301) 0.2 g, 按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 结果莫诺昔、马钱苷、芍药苷平均质量分数分别为 3.458, 1.261, 1.371 mg·g⁻¹; RSD 分别为 0.7%, 0.6%, 0.6%。

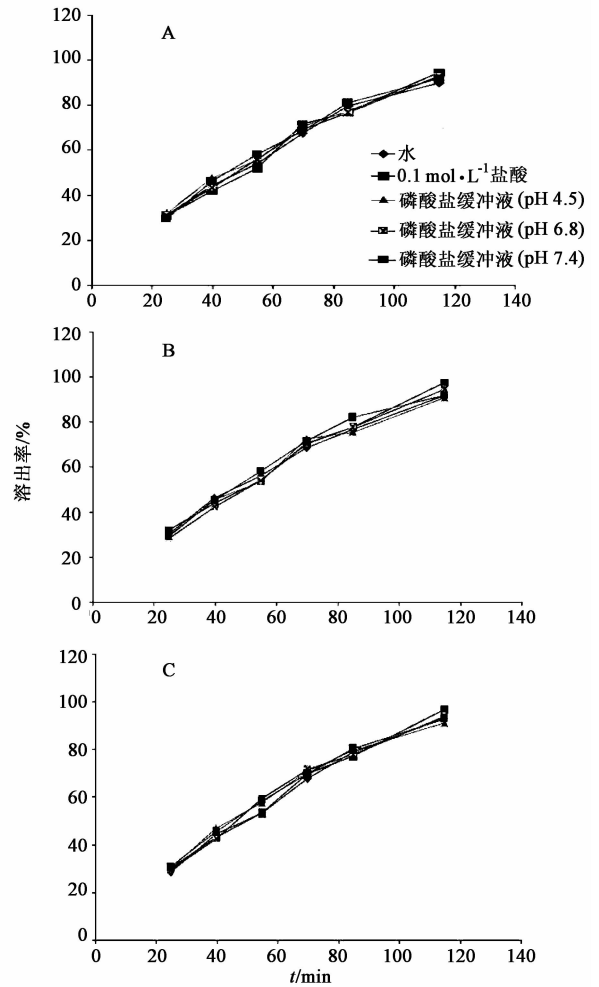
2.5.6 回收率试验 精密称取六味地黄苷糖片(批号 20110301) 0.1 g, 共 6 份, 置 10 mL 量瓶中, 各加入莫诺昔、马钱苷、芍药苷混合对照品溶液适量, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 计算莫诺昔、马钱苷、芍药苷的加样回收率分别为 99.89%, 101.10%, 100.20%; RSD 分别为 1.6%, 1.8%, 1.4%。见表 1。结果表明该方法准确性良好。

表 1 六味地黄苷糖片中莫诺昔、马钱苷、芍药苷的加样回收率试验
Table 1 Recovery tests of three components in Liuwei Dihuang Gantang tablets

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
莫诺昔	0.357 56	0.373 92	0.725 44	98.38	99.88	1.6
	0.357 90	0.373 92	0.735 89	101.09		
	0.355 14	0.373 92	0.732 15	100.83		
	0.368 97	0.373 92	0.732 97	97.35		
	0.351 33	0.373 92	0.730 11	101.30		
	0.353 41	0.373 92	0.728 54	100.32		
马钱苷	0.130 39	0.124 28	0.256 41	101.40	101.10	1.8
	0.130 51	0.124 28	0.253 63	99.07		
	0.129 50	0.124 28	0.257 74	103.19		
	0.134 55	0.124 28	0.257 73	99.11		
	0.128 12	0.124 28	0.253 12	100.58		
	0.128 87	0.124 28	0.257 17	103.23		
芍药苷	0.141 76	0.144 68	0.289 11	101.85	100.20	1.4
	0.141 90	0.144 68	0.286 15	99.70		
	0.140 80	0.144 68	0.284 73	99.48		
	0.146 29	0.144 68	0.288 17	98.06		
	0.139 29	0.144 68	0.286 45	101.71		
	0.140 12	0.144 68	0.285 33	100.37		

2.6 溶出介质考察 分别取六味地黄苷糖片(批号 20110301) 各 1 片, 分别投入 5 个容器内, 照 2010

年版《中国药典》二部附录 X C 第三法, 分别以水, 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸, 磷酸盐缓冲液(pH 4.5), 磷酸盐缓冲液(pH 6.8), 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) 5 种介质各 100 mL 为溶出介质, 结果发现六味地黄苷糖片中莫诺昔、马钱苷和芍药苷在 5 种介质中溶出结果基本一致, 见图 2。故确定溶出介质为水。



A. 莫诺昔; B. 马钱苷; C. 芍药苷

图 2 不同溶出介质对六味地黄苷糖片中各成分溶出的影响 (n=6)
Fig. 2 Effect of different dissolution medium on dissolution of each component in Liuwei Dihuang Gantang tablets (n=6)

2.7 溶出度均一性考察^[5] 分别取六味地黄苷糖片(批号 20110301) 各 1 片, 分别投入 6 个容器内, 按 2010 年版《中国药典》二部附录 X C 第三法, 以水 100 mL 为溶出介质, 溶出介质温度 (37 ± 0.5) °C, 转速 75 r·min⁻¹, 分别于 30, 45, 60, 75, 90, 120 min 取溶液 5 mL (并及时在溶出杯中补充等温水 5 mL), 过滤, 续滤液作为供试品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 绘制溶出曲线, 见图 3。结果表明 90 min 后 3 种成分溶出速率变缓, 累积溶出率均 > 75%, 综合考虑将取样时间定为 90 min。

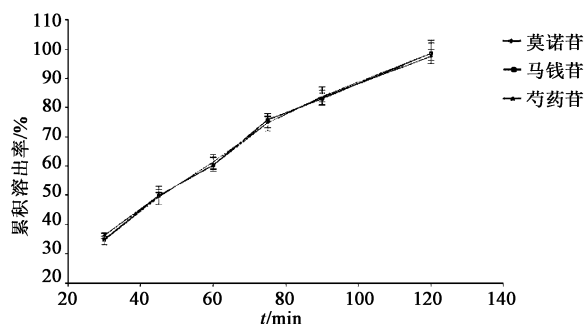


图 3 六味地黄苷糖片中各成分的溶出曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 3 Dissolution curves of three components in Liuwei Dihuang Gantang tablets ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.8 样品溶出度的测定取 10 批六味地黄苷糖片,按 2.7 项下方法进行溶出度试验,于 90 min 时取样,按 2.1 项下条件测定,计算每片中各成分的溶出率,结果见表 2。

表 2 六味地黄苷糖片中各成分的溶出度测定 ($n=6$)

Table 2 Dissolution of three components in Liuwei Dihuang Gantang tablets ($n=6$) %

批号	莫诺昔		马钱昔		芍药昔	
	溶出率	RSD	溶出率	RSD	溶出率	RSD
20110301	95.97	1.9	94.67	2.1	95.31	1.5
20110302	94.35	1.4	95.12	1.1	93.57	1.8
20110501	93.64	2.1	92.37	2.0	90.58	1.7
20110502	87.95	1.9	88.65	1.5	85.32	0.6
20110901	96.84	1.0	95.67	1.1	95.44	1.9
20110902	97.10	1.2	96.38	1.6	96.81	1.3
20111001	92.08	1.4	91.57	1.9	91.58	0.9
20111201	95.63	2.3	94.52	1.6	96.32	2.0
20111202	100.60	1.4	101.50	2.1	99.85	1.4
20111203	92.71	0.9	91.55	1.1	91.74	1.4

3 讨论

预试验选择了 6 种流动相系统进行考察,结果表明当流动相为甲醇-水时,3 个定量组分无法达到最佳基线分离,将流动相中加入少量乙腈作为改性剂后,可明显改善分离效果,增大甲醇用量,3 个定量组分保留时间缩短,在此基础上对流动相进行了优化,最后甲醇-水-乙腈系统可使分析时间和分离度同时达到最佳。

通过紫外扫描显示,莫诺昔、马钱昔和芍药昔对

照品溶液的最大吸收波长分别为 (242 ± 2) , (238 ± 2) , (233 ± 2) nm,在这 3 个波长下进行样品检测,比较得到的色谱图,结果显示检测波长 236 nm 下基线较稳定,各色谱峰理论塔板数均较高。此外,还比较了转速 50,75,100 $r \cdot \min^{-1}$ 的溶出曲线,结果后二者的溶出曲线无明显差异,故转速选择 75 $r \cdot \min^{-1}$ 。10 批样品中莫诺昔、马钱昔和芍药昔的溶出率 85.32% ~ 101.50%,表明建立的溶出度测定方法可靠、稳定,且 10 批样品批间一致性较好,制剂质量稳定。

[参考文献]

- [1] 王晓燕,孙磊,乔善义.六味地黄苷糖中糖苷部位的化学成分研究[J].中国中药杂志,2012,37(17):2576-2580.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.二部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:85.
- [3] 李丽莉,林雀跃,黄捷.44 个不同厂家复方丹参片的体外溶出度比较[J].药物分析杂志,2013,33(6):1054-1066.
- [4] 夏忠玉,何庆,孙国兵.颠茄分散片的制备及溶出度测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(13):29-31.
- [5] 孙妍,姚琳,孟庆杰.小儿清肺分散片溶出度测定方法的建立[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(9):25-27.
- [6] 王秀秀,李智慧,石森林,等.桂枝茯苓浓缩丸多指标成分体外溶出度研究[J].中华中医药学刊,2014,32(12):2875-2877.
- [7] 孙妍,姚琳,李金山,等.小儿清肺分散片中黄芩苷溶出度测定方法[J].吉林中医药,2015,35(3):297-300.
- [8] 陈威,尹长江,刘翠哲,等.测定栀子金花丸中三种成分的含量及栀子苷的溶出度[J].天津药学,2015,27(3):4-6.
- [9] 钟世红,古锐,王铃鑫,等.HPLC 同时测定独一味中 7 种成分含量[J].中国中药杂志,2014,39(22):4373-4378.
- [10] 赖宏强,胡悦,李孝栋.基于吸波面积法对川芎组片整体成分溶出度的考察及其体内外相关性的研究[J].药学学报,2015,50(6):788-792.
- [11] 魏农农,王霞,苏敏.药物溶出度试验方法研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(10):1119-1124.

[责任编辑 刘德文]