

3 个指标性成分用于监控芪贞降糖颗粒浓缩工艺的研究

丁丽玉^{1a}, 张丹^{1b}, 许莹^{2a}, 胡佳亮^{2b}, 吴飞^{2a,2b}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, a. 药剂科, b. 内分泌科, 上海 200437;

2. 上海中医药大学, a. 中药学院, b. 中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203)

摘要:目的 探索 3 个主要成分作为指标监控芪贞降糖颗粒浓缩工艺稳定性的可行性。方法 选择枸橼酸、特女贞苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷 3 个主要成分作为高效液相色谱法(HPLC)检测指标, 分别在常压和减压条件下进行芪贞降糖颗粒提取液的浓缩, 测定不同温度下不同时间点样品中指标性成分的含量变化情况, 系统考察其热稳定性规律, 用于浓缩工艺的参数确定。结果 常压和减压条件下经过 8 h 浓缩后, 枸橼酸在温度 60~80℃ 范围内稳定性良好, 90℃ 条件下转移率下降约 15%。常压条件下经过 8 h 浓缩, 特女贞苷在温度 60~80℃ 范围内转移率下降不超过 13%, 在 90℃ 条件下转移率下降 25%; 减压条件下经过 8 h 浓缩, 特女贞苷在温度 60~80℃ 范围内转移率下降不超过 11%, 在 90℃ 条件下转移率下降约 20%。常压和减压条件下经过 8 h 浓缩后, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 60~90℃ 范围内稳定性良好。因此, 芪贞降糖颗粒的常压和减压浓缩温度均应控制不超过 80℃。3 批中试放大试验均验证了以上规律和工艺参数的可行稳定。结论 以枸橼酸、特女贞苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的热稳定性作为指标得到的浓缩工艺参数, 可用于芪贞降糖颗粒的制剂工艺质量控制。

关键词: 芪贞降糖颗粒; 浓缩; 稳定性; 转移率; 枸橼酸; 特女贞苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2016.10.009

Application of three main components to indicate the reliability of Qizhenjiangtang Granules concentration process

DING Liyu^{1a}, ZHANG Dan^{1b}, XU Ying², et al

(1a. Department of Pharmacy, 1b. Department of Endocrinology, Yueyang Hospital of Integrative Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. College of Chinese Material Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To explore the stability of Qizhenjiangtang Granules concentration process by using 3 main components as the index. **Methods** Citric acid, specnuezhenide and calycosin-7-glucoside were chosen as the detection indicators to display the thermal stability during the concentration process. The concentrated solution were prepared under both the atmospheric and vacuum conditions.

基金项目: 上海市卫计委中医医院中药制剂能力提升项目(ZY3-JSFC-2-2017); 上海市卫计委项目资助(ZY3-CCCX-3-5001); 上海市科委平台资助项目(15DZ2292000)

通信作者: 吴飞, 男, 副研究员, 研究方向: 中药制剂分析和药物分析, E-mail: a1983d3891h@126.com

择性不强, 适用范围广。

本研究建立了产后三泡的四方藤薄层色谱法和 HPLC 测定本品中岩白菜素的含量, 建立的质量标准可控制瑶药产后三泡的质量。

参考文献

- [1] 冯秋瑜, 李彤, 庞宇舟, 等. 金秀县瑶医药发展现状的调查报告[J]. 广西中医药大学学报, 2013, 16(3): 126-128.
- [2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 壮药质量标准(第 2 卷)[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011: 90.
- [3] 刘元, 宋志钊, 文志云. HPLC 测定翼茎白粉藤中岩白菜素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 79-80.

- [4] 梁威, 刘元, 宋志钊, 等. 瑶药瑞香通养助孕胶囊质量控制研究[J]. 广西科学, 2015, 22(6): 627-630.
- [5] 郭俊玮, 宋乐乐. 连桂清心片的薄层色谱鉴别[J]. 安徽医药, 2015, 19(10): 1873-1876.
- [6] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准(第 1 卷)[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2014: 114.
- [7] 潘保强. 四方藤化学成分研究[J]. 中草药, 1981, 12(6): 45.
- [8] 黄丽萍, 吴素芬, 张甦, 等. 岩白菜素镇痛抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(3): 24-25.
- [9] Oliveira CM, Nonato FR. Antinociceptive properties of bergenin[J]. Natural Product, 2011, 74(10): 2062-2068.

(收稿日期: 2016-05-24, 修回日期: 2016-07-26)

The concentration of the 3 components were determined at different time points and at different bath temperature, so as to select the suitable process parameter in this step. **Results** In both atmospheric and vacuum conditions, citric acid was stable between 60 °C and 80 °C and the transfer rate decreased by 15% at 90 °C in 8 hours. Calycosin-7-glucoside kept stable for 8 hours between 60 °C and 90 °C. In the atmospheric condition, the transfer rate of specnuezhenide decreased by no more than 13% between 60 °C and 80 °C while it decreased by 25% at 90 °C. In the vacuum condition, the transfer rate of specnuezhenide decreased by no more than 11% between 60 °C and 80 °C while it decreased by about 20% at 90 °C. So the concentration temperature should be controlled no more than 80 °C. The thermal stability of the 3 components and the optimal concentration parameters were validated by 3 batches of product via pilot magnification. **Conclusions** The parameters obtained from the stability study of citric acid, specnuezhenide and calycosin-7-glucoside are suitable for the quality control of Qizhenjiangtang Granules concentration process.

Key words: Qizhenjiangtang Granules; Concentration; Stability; Transfer rate; Citric acid; Specnuezhenide; Calycosin-7-glucoside

对于中药制剂来说,质量控制体系不仅应包括通过质量标准中的指标性成分的含量测定对制剂终端质量进行控制,还需要靠监督投料、控制生产工艺的办法控制质量^[1]。近年来中药制剂工艺控制领域已有越来越多的研究着眼于从控制制剂过程来保证终产品的质量^[2-3],主要着眼于热稳定性、酸碱稳定性、光稳定性、与质量关键属性相关的指标性活性成分^[4]。

芪贞降糖方由乌梅、灵芝、黄芪和女贞子4味中药组成,长期的临床应用表明其在改善患者胰岛素抵抗、调节糖代谢等方面疗效显著^[5-10]。在将之开发为颗粒剂的研究中,前期已经进行了正交工艺优选其提取工艺^[11]。本研究以处方中的3个水溶性良好的成分为指标,考察其在常压和减压浓缩工艺条件下的热稳定性规律,用于芪贞降糖颗粒的制备工艺确定和工艺稳定性的控制。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司), Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), FA2104N 型电子天平(0.1 mg, 上海精密科学仪器有限公司), TE214S 型电子天平(0.1 mg, 赛多利斯科学仪器有限公司), XP205 型电子天平(0.01 mg, 梅特勒-托利多仪器有限公司), R206 型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司), HWS26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司), PTHW 型电热套(巩义市予华仪器有限责任公司), TGL-18C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药 黄芪(批号:141210,产地甘肃),制乌梅(批号:140913,产地浙江),制女贞子(批号:141125,产地湖南),灵芝(批号:141105,产地山东),均购自上海康桥中药饮片有限公司。

枸橼酸(批号:100396-201302),毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201102),特女贞苷对照品

(批号:111926-201404),均购自中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法 按照已建立的高效液相色谱法(HPLC)进行样品中枸橼酸、特女贞苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定^[11]。

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取枸橼酸、特女贞苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量,分别加甲醇制成浓度为0.529 0、0.252 0、0.050 2 g · L⁻¹的溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取浓缩液样品,16 000 r · min⁻¹下高速离心10 min,取上清液,即得。

2.2 浓缩稳定性研究 前期通过正交试验确定了芪贞降糖颗粒的提取工艺为:加水10倍量,提取3次,每次提取1.5 h。按照提取工艺制备1倍处方量的提取液,供稳定性研究使用^[11]。

2.2.1 常压浓缩稳定性研究 将3次提取液合并混匀,量取800 mL提取液8份,置于烧杯中,密封,分别置于60、70、80、90 °C恒温水浴中保温,每个温度平行处理2份,定时取样(取样前以水补足总体积),共考察8 h,即时间点分别为0、1、2、3、4、6和8 h。按照“2.1”项下操作,分别测定样品中枸橼酸、特女贞苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的转移率,3个指标成分的常压浓缩8 h稳定性结果分别见图1~3。

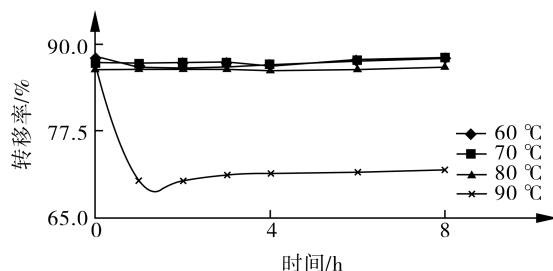


图1 枸橼酸常压浓缩工艺热稳定性曲线

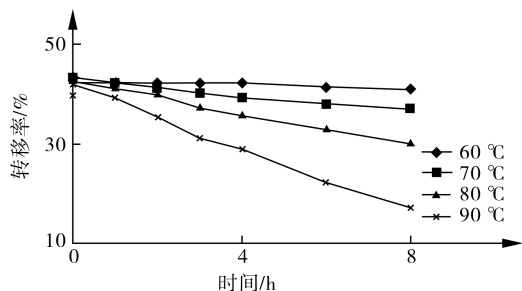


图2 特女贞苷常压浓缩工艺热稳定性曲线

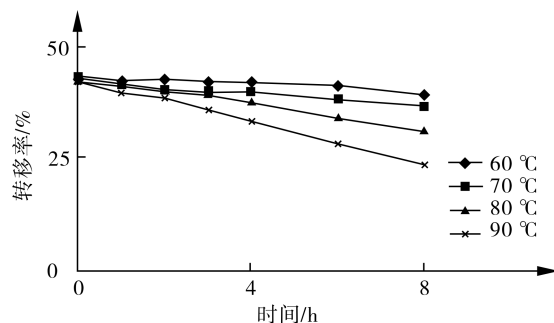


图5 特女贞苷减压浓缩工艺热稳定性曲线

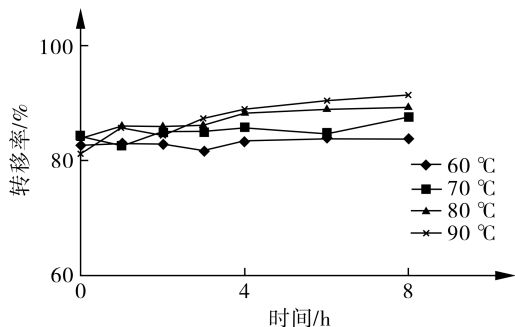


图3 毛蕊异黄酮葡萄糖苷常压浓缩工艺热稳定性曲线

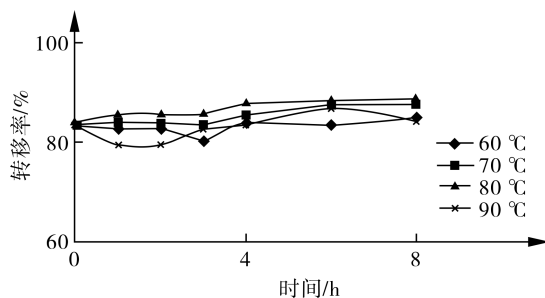


图6 毛蕊异黄酮葡萄糖苷减压浓缩工艺热稳定性曲线

由图1可见,在温度不高于80 °C时,经过8 h常压浓缩后枸橼酸含量保持稳定,而在90 °C条件下,转移率下降15%。由图2可见,特女贞苷的转移率随浓缩时间不断下降:经过8 h常压浓缩后,在60 °C和70 °C条件下下降均不超过5%,下降趋势较缓,而在80 °C和90 °C条件下,分别下降13%和25%。由图3可见,毛蕊异黄酮葡萄糖苷在常压浓缩温度60~90 °C之间保持稳定,随浓缩时间延长,转移率未有下降,稳定性良好。

2.2.2 减压浓缩稳定性研究 用减压旋转蒸发装置模拟提取液在生产过程中的减压浓缩状态^[11]。将3次提取液合并混匀,量取800 mL提取液8份置于圆底烧瓶中,分别置于60、70、80、90 °C的旋蒸减压浓缩,每个温度平行处理2份,定时取样(取样前将馏出液补回样品溶液并混匀,以水补足总体积取样),共考察8 h,即时间点分别为0、1、2、3、4、6和8 h。按照“2.1”项下操作,分别测定样品中枸橼酸、特女贞苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷转移率,3个指标成分的减压浓缩8 h稳定性结果分别见图4~6。

由图4可见,不高于80 °C时,枸橼酸经过8 h减压浓缩后含量相对稳定,90 °C条件下,转移率下降15%。由图5可见,特女贞苷的转移率随时间温度变化:经过8 h减压浓缩后,在60 °C、70 °C和80 °C条件下下降趋势较缓,转移率分别下降3%、5%和11%,90 °C条件下,转移率下降约20%。由图6可见,在60~90 °C的减压浓缩温度范围内,毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量未随时间下降,稳定性良好。

2.3 浓缩稳定性研究结论 经过以上稳定性研究可知,芪贞降糖颗粒的3个指标性活性成分中,毛蕊异黄酮葡萄糖苷的稳定性最佳,在60~90 °C范围内,在常压和减压浓缩条件下,8 h内均保持基本稳定。在常压和减压浓缩条件下,枸橼酸在60~80 °C范围内能保持基本稳定,而90 °C下则稳定性不佳。在常压和减压浓缩条件下,特女贞苷随着温度的升高稳定性变差,在60~80 °C范围内经过8 h浓缩后转移率均下降不大,而90 °C下则稳定性不佳,所以常压和减压浓缩温度均不宜超过80 °C。为保证以上3个指标成分尤其是热敏性成分特女贞苷的转移率,故在芪贞降糖颗粒浓缩过程中温度须控制不超过80 °C。将以上参数用于中试放大研究,以验证此结论的可行性。3批中试产品的浓缩转移率见表1。3批次中试生产的减压浓缩温度均控制在80 °C以下,浓缩过程经历时长约12~18 h,从表1可以发现3个指标性成分转移率下降趋势一

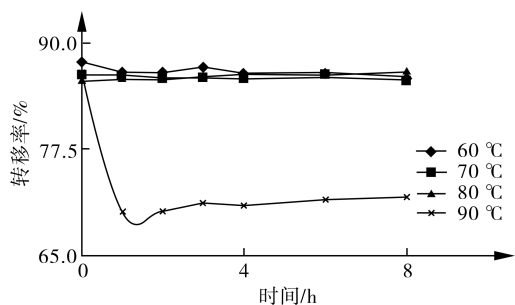


图4 枸橼酸减压浓缩工艺热稳定性曲线

致,下降率不高。历经超过 12 h 的浓缩步骤后 3 个成分较稳定,验证此减压浓缩工艺可以应用于芪贞降糖颗粒的中试放大生产。

表 1 中试产品浓缩工艺中 3 个指标成分转移率结果/%			
批号	枸橼酸 转移率	特女贞苷 转移率	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 转移率
160602	65.4	31.2	72.5
160614	71.9	39.4	76.2
160615	74.1	38.8	70.5
均值	70.5	36.5	73.1

3 讨论

中药制剂的制备过程包括提取、分离、浓缩、干燥和成型等阶段,多数需经水、醇溶剂的热处理,各阶段都可能发生一些物理、化学变化,导致制剂中有效成分的降解和损失^[12]。在制剂各环节中,由于浓缩环节对工艺参数的稳定性控制要求最高,且相对耗时最长,所以此环节的质量控制最为重要^[2]。

传统思路认为,浓缩阶段所选择的指标性成分应为复方中君药或臣药所含的与临床适应证、提取工艺相关的指标性成分^[13],且尽量选择定量控制更加准确的测定方法用于监测。所以本研究初步选择君药乌梅、佐使药黄芪和女贞子的指标成分作为监控指标,以 HPLC 法进行含量测定,而不选择臣药灵芝药材所对应的多糖含量(UV 法测定)作为监控指标。以此考察浓缩过程中药液的稳定性,对芪贞降糖颗粒的浓缩工艺过程进行有效的控制。

从目前生产企业使用的设备情况来看,药液浓缩一般都是在减压状态下进行。但是在一些药品标准中,药液的浓缩却显示是在常压状态下进行^[14]。所以本研究在设计的时候就将常压稳定性纳入考察的范围,以利于全面探索 3 个化合物的热稳定性规律。

本研究分别在减压和常压条件下,系统全面地考察了乌梅、黄芪和女贞子 3 味常用中药的指标性成分枸橼酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和特女贞苷的热

稳定性规律,指出了水提取溶液中 3 个成分的浓缩热稳定性规律,不仅用于本处方的工艺控制,还可作为其他采用类似工艺的处方中此类成分的研究提供重要的借鉴。但也要考虑到,化学成分的热稳定性规律一方面取决于化合物本身的结构,另一方面也受溶液环境和其他共存成分的影响,本研究得出的 3 个成分的热稳定性规律在某种程度上与本处方组成和提取工艺密切相关。

参考文献

[1] 万仁甫,肖宏浩,曾一心. 中成药质量标准局限性探讨[J]. 中国执业药师,2010,7(10):31-34.

[2] 王瀛峰,冯怡,阮克锋,等. 以三七益肾颗粒中热敏性成分指示浓缩工艺可靠性的研究[J]. 中国新药杂志,2015,24(19):2266-2270.

[3] 范文成,王岳,韩月芝,等. 不同提取浓缩干燥工艺对穿心莲内酯类成分的影响[J]. 中国药业,2014,23(2):54-55.

[4] 刘小红,刘建群. 中药热敏活性成分研究进展[J]. 亚太传统医药,2014,10(20):37-40.

[5] 范朝华,杨宏杰,张丹,等. 芪贞降糖方改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗临床研究[J]. 浙江中医杂志,2011,46(10):715-716.

[6] 张丹,郑敏,范朝华,等. 芪贞降糖颗粒对糖调节异常患者的临床研究[J]. 海南医学,2011,22(12):49-50.

[7] 张丹,杨宏杰,郑敏,等. 芪贞降糖颗粒对糖调节异常患者的临床干预研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(7):1744-1745.

[8] 张丹,杨宏杰,郑敏,等. 酸甘化阴法对 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗作用的研究[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(9):671-674.

[9] 张丹,杨宏杰,郑敏,等. 酸甘化阴法治疗 2 型糖尿病患者临床疗效及机制研究[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(11):2136-2138.

[10] 张丹,杨宏杰,詹可一. 芪贞降糖方治疗 2 型糖尿病 30 例[J]. 陕西中医,2009,30(8):992-993.

[11] 丁丽玉,张丹,许莹,等. 正交试验法优选芪贞降糖颗粒提取工艺[J]. 安徽医药,2016,20(7):1241-1245.

[12] 李华锋. 影响中药制剂稳定性的因素及稳定化方法[J]. 中国中医药咨讯,2012,4(3):317.

[13] 周刚,何燕萍. 中药复方新药研发中质量标准研究需关注的问题[J]. 中国中药杂志,2014,39(17):3389-3391.

[14] 李蒙蒙. 略谈中成药质量标准制法项中存在的若干问题及其改进建议[J]. 中国药品标准,2005,6(6):28-31.

(收稿日期:2016-05-04,修回日期:2016-07-11)