

香平茶清排铅颗粒质量标准研究

邓朝晖,梁土金,胡文军(广州军区联勤部药品仪器检验所,广东广州 510500)

[摘要] 目的 建立香平茶清排铅颗粒的质量标准。方法 采用化学方法对香平茶清排铅颗粒中的维生素 C 进行鉴别;采用薄层色谱法(TLC)对该处方中的绿茶提取物、菊花提取物进行鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定处方中主要成分绿原酸和表儿茶素的含量。结果 化学方法可鉴别维生素 C;TLC 法可鉴别出处方中绿茶提取物、菊花提取物;HPLC 法测定绿原酸、表儿茶素的含量,线性良好,方法准确可靠,可以较好地控制该制剂的质量。结论 所建立的方法准确可靠、灵敏度高、专属性强,可有效控制香平茶清排铅颗粒的质量。

[关键词] 香平茶清排铅颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

[中图分类号] R944.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)01-0057-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.01.017

Study on quality standard of Xiangping chaqing paiqian granules

DENG Zhao-hui, LIANG Tu-jin, HU Wen-jun(Institute for Drug and Instrument Control of Guangzhou Military Area, Guangzhou 510500, China)

[Abstract] **Objective** To establish a quality standard for Xiangping chaqing paiqian granules. **Methods** Chemical methods were used to identify vitamin C in the granules. TLC methods were used to identify green tea extracts and chrysanthemum extracts. Chlorogenic acid and catechin were assayed by HPLC. **Results** Vitamin C could be identified by chemical method, and green tea extracts and chrysanthemum extracts could be identified by TLC. The content of chlorogenic acid and catechin could be assayed by HPLC. **Conclusion** The methods were proved to be reliable, good sensitivity and high specificity, which could be used in quality control of Xiangping chaqing paiqian granules.

[Key words] Xiangping chaqing paiqian granules; TLC; HPLC; quality standard

香平茶清排铅颗粒由绿茶提取物、菊花提取物、维生素 C、蔗糖等组成,具有促进排铅功效,临床上适用于血铅值 1 000 $\mu\text{g/L}$ 以下人群和高铅血症的排铅作用。为了有效控制该制剂的质量,本研究建立了化学方法鉴别处方中的维生素 C;TLC 鉴别绿茶提取物、菊花提取物;并采用高效液相色谱法测定绿原酸和表儿茶素的含量,为香平茶清排铅颗粒的质量控制提供了更全面的科学依据。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括四元泵、自动进样器、柱温箱、检测器、工作站)(美国安捷伦公司),UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本 SHIMADZU),XS105 型分析天平(梅特勒);绿原酸对照品(批号:110753-200413)、表儿茶素对照品(批号:878-200102)、木犀草素对照品(批号:111520-200201)均为中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯,冰醋酸为分析纯,其它试剂均为分析

纯。香平茶清排铅颗粒由解放军第 303 医院提供,批号分别为 110813、110814、110815。

2 方法与结果

2.1 维生素 C 的鉴别^[1] 取香平茶清排铅颗粒 1 g(约相当于维生素 C 0.1 g),加水 10 ml,振摇使溶解,过滤,取滤液 5 ml,作为供试品溶液。按处方制成缺维生素 C 的阴性对照样品,按供试品溶液的制备方法,制得阴性对照溶液。分别向供试品溶液及阴性对照溶液中加入硝酸银试液 1 ml,振摇,供试品溶液中生成黑色沉淀,阴性对照溶液则无明显变化。

2.2 菊花提取物中绿原酸的鉴别 取本品 5 g,研细,加石油醚(30~60 $^{\circ}\text{C}$) 10 ml,超声处理 20 min,弃去石油醚,药渣挥干,加稀盐酸 1 ml 与乙酸乙酯 20 ml,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。同法制成缺菊花提取物的阴性对照样品溶液。另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1 ml 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。分别吸取上述 3 种溶液各 1 μl ,点于同一聚酰胺薄膜上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(1

[作者简介] 邓朝晖(1968-),男,副主任药师。Tel: (020) 38198353, E-mail: dzhaohui99@163.com.

:15:1:1:2)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性对照无此斑点。结果见图1。

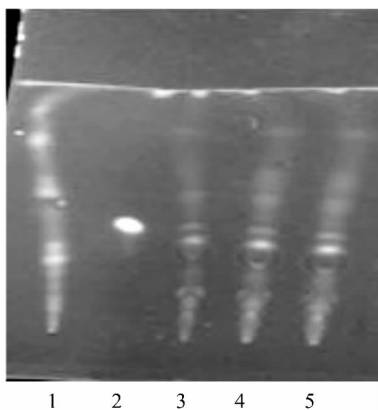


图1 绿原酸的薄层色谱图
1-阴性对照;2-绿原酸对照品;3、4、5-供试品。

2.3 菊花提取物中木犀草素的鉴别 取本品5 g,研细,加石油醚(30~60℃)10 ml,超声处理20 min,弃去石油醚,药渣挥干,加稀盐酸1 ml与乙酸乙酯20 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。同法制成成缺菊花提取物的阴性对照样品溶液。另取木犀草素对照品,加甲醇制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照无干扰,结果见图2。

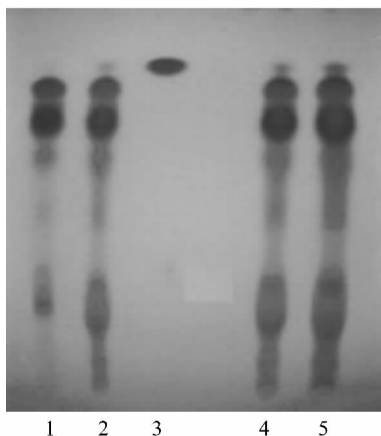


图2 木犀草素的薄层色谱图
1-阴性对照;3-木犀草素对照品;2、4、5-供试品。

2.4 绿茶提取物的鉴别 取本品5 g,研细,加水25 ml,振摇使溶解,加氨试液调节pH为11,超声处理30 min,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次25 ml,合并乙酸乙酯提取液,水浴蒸干,残渣加甲醇0.5 ml使溶解,作为供试品溶液。同法制成成缺绿茶提取物的阴性对照样品溶液。另取表儿茶素对照品,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-丙酮-甲酸(5:2:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铁试液。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照无干扰,结果见图3。

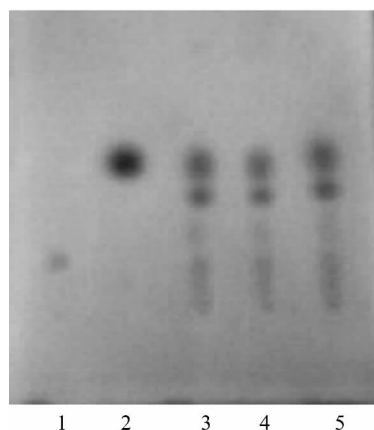


图3 表儿茶素的薄层色谱图
1-阴性对照;2-表儿茶素对照品;3、4、5-供试品。

2.5 含量测定^[2,3] 以绿原酸、表儿茶素作为香平茶清排铅颗粒的含量指标。

2.5.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Eclipse C₁₈ (4.6 mm×250 mm 5 μm);流动相为甲醇-乙腈-0.15%冰醋酸(7:6:87);检测波长278 nm;流速1 ml/min;柱温30℃;进样量10 μl。色谱图见图4。阴性对照无干扰,绿原酸和表儿茶素色谱峰的理论塔板数均不低于3 000。

2.5.2 对照品溶液 分别取绿原酸对照品、表儿茶素对照品适量,精密称定,加50%乙醇制成每1 ml各含0.06、0.05 mg的混合溶液,作为对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液 取装量差异项的内容物,研细,取约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加50%乙醇25 ml,密塞,称定重量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)45 min,放冷,再称定重量,用50%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

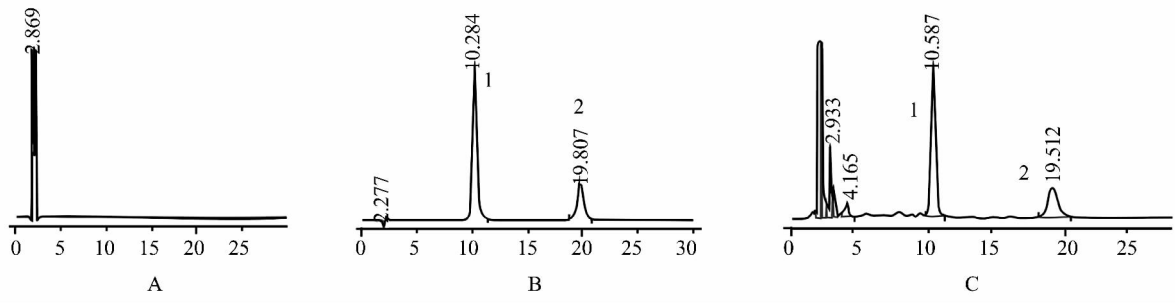


图4 香平茶排铅颗粒的薄层色谱图

A-阴性对照; B-对照品; C-供试品; 1-绿原酸; 2-表儿茶素。

2.5.4 阴性对照溶液 按处方比例制备缺菊花提取物、绿茶提取物的阴性样品,按供试品溶液的制备方法,制备阴性对照溶液。

2.5.5 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2、4、6、8、10、15、20 μl ,依次注入液相色谱仪,依法测定,结果以进样量(X)为横坐标,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得绿原酸的标准曲线为: $Y = 84.262X - 18.918$, $r = 0.9999$; 表儿茶素的标准曲线为: $Y = 32.552X + 1.115$, $r = 0.9996$ 。结果表明,绿原酸在进样量 0.12744 ~ 1.2744 μg 、表儿茶素在进样量 0.114124 ~ 1.1412 μg 范围内,线性关系良好。

2.5.6 重复性试验 取同一批号样品(批号:110813) 0.2 g,精密称定,共取 6 份,按 2.5.3 项下方法制备样品溶液,按 2.5.1 项下的色谱条件,测得绿原酸的平均含量为 6.916% (mg/g),RSD 为 0.32%; 表儿茶素的平均含量为 5.967% (mg/g),RSD 为 0.92%。表明测定方法重复性良好。

2.5.7 稳定性试验 取供试品溶液(批号:110813),在 0、1、2、5、11、19、29、38 h 分别进样 10 μl ,记录峰面积,绿原酸、表儿茶素峰面积的 RSD 分别为 0.30%、1.63%。表明供试品溶液在 38 h 内稳定。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批香平茶清排铅颗粒样品(批号:110813,绿原酸含量 6.940 mg/g,表儿茶素含量为 5.934 mg/g) 约 0.1 g (6 份),分别加入绿原酸对照品、表儿茶素对照品适量,按 2.5.3 项下制备供试品溶液,按 2.5.1 项下的色谱条件,测得其含量,计算回收率,结果见表 1、表 2。

2.5.9 样品测定 取香平茶清排铅颗粒样品 3 批,按 2.5.3 项下的方法制备样品溶液,测定其含量,按外标法计算样品中绿原酸及表儿茶素的含量,结果见表 3。

3 讨论

表1 绿原酸的回收率试验结果

称样量 (g)	绿原酸含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.104 4	0.724 5	0.849 6	1.586 5	101.46		
0.101 2	0.702 3	0.849 6	1.572 5	102.42		
0.104 3	0.723 8	0.849 6	1.592 7	102.27		
0.102 5	0.711 4	0.849 6	1.570 2	101.08	101.87	0.58
0.103 0	0.714 8	0.849 6	1.577 4	101.53		
0.104 5	0.725 2	0.849 6	1.595 4	102.42		

表2 表儿茶素的回收率试验结果

称样量 (g)	表儿茶素含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.104 4	0.619 5	0.570 6	1.160 0	94.72		
0.101 2	0.600 5	0.570 6	1.132 5	93.23		
0.104 3	0.618 9	0.570 6	1.154 3	93.82		
0.102 5	0.608 2	0.570 6	1.140 2	93.22	93.66	0.93
0.103 0	0.611 2	0.570 6	1.148 3	94.13		
0.104 5	0.620 1	0.570 6	1.150 0	92.87		

表3 三批样品含量测定结果

批号	绿原酸含量 (mg/g)	RSD (%)	表儿茶素含量 (mg/g)	RSD (%)
110813	6.94	0.2	5.93	1.0
110814	6.84	0.2	6.02	0.8
110815	6.89	0.3	5.95	0.3

3.1 因无菊花提取物对照药材,故选择提取物中的有效成分绿原酸作为薄层鉴别指标。分别以冰醋酸、乙酸乙酯-甲酸-水(1:1:1)、三氯甲烷-乙酸乙酯-丙酮-甲酸(5:2:2:1)、甲苯-乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(1:15:1:1:2)上层溶液为展开系统,在聚酰胺薄膜上展开,结果显示,甲苯-乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(1:15:1:1:2)上层溶液展开,斑点无拖尾及干扰, R_f 值较合适。故选该溶液为展开剂,在聚酰胺薄膜上展开,在紫外光灯 365 nm 波长处检视。

3.2 因无茶叶提取物对照药材,故选择提取物中的有效成分表儿茶素作为薄层鉴别指标。样品处理时,根据表儿茶素的理化性质,考察了 pH 值对提取

的影响。将提取液 pH 值分别调为 11 和 1, 超声处理 30 min, 用乙酸乙酯提取, 结果显示 pH 为 11 时杂质斑点比较少, 故选择用氨试液调节 pH 为 11, 超声 30 min, 再用乙酸乙酯萃取。

3.3 含量测定中供试品溶液制备方法的选择 分别比较了 50% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、乙醇溶剂对绿原酸及表儿茶素的提取效果, 结果发现 50% 乙醇提取效果最好。用 50% 乙醇超声 30、45、60 min, 结果显示超声处理 45 min 时已提取完全, 故选择用 50% 乙醇超声处理 45 min 作为样品的提取溶剂。

3.4 含量测定中流动相的选择 分别用: ① 甲醇-乙腈-0.5% 冰醋酸 (5:6:89); ② 甲醇-乙腈-0.25% 冰醋酸 (5:6:89); ③ 甲醇-乙腈-0.15% 冰醋酸 (5:6:89); ④ 甲醇-乙腈-0.10% 冰醋酸 (5:6:89); ⑤ 甲醇-乙腈-0.15% 冰醋酸 (7:6:87) 为流动相, 考察绿原酸、表儿茶素峰型及分离度试验, 结果发现 ①②③④ 对绿原酸峰型没有太大影响, ①②

表儿茶素出峰拖尾, ④ 表儿茶素峰前延, 最终选用 ⑤ 甲醇-乙腈-0.15% 冰醋酸 (7:6:87) 作为液相色谱的流动相。

3.5 检测波长的选择 经紫外扫描发现, 绿原酸在 264 nm 及 327 nm 波长处都有吸收峰, 最大吸收波长为 327 nm; 表儿茶素的最大吸收波长为 278 nm, 但表儿茶素在 327 nm 波长处没有吸收, 故选择 278 nm 作为绿原酸及表儿茶素的共同检测波长。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版. 二部 [S]. 2010: 901.
- [2] 李 珏, 贾 飞, 吴永江. 高效液相色谱法测定盐酸罗格列酮片的含量及有关物质 [J]. 药实践杂志, 2012, 30(1): 49.
- [3] 张 蜀, 邓 红, 林华庆, 等. 青荔颗粒的制备及质量标准的初步研究 [J]. 广东药学院报, 2010, 26(3): 252.

[收稿日期] 2012-06-25

[修回日期] 2012-09-28

(上接第 26 页)

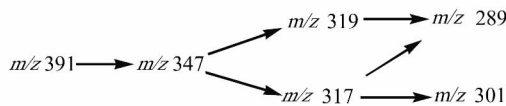


图 6 m/z 391 负离子模式下的裂解碎片结构树

4 讨论

利用电喷雾离子阱质谱, 根据软电离模式下能产生多级离子碎片的特点, 可以推测高喜树碱类衍生物母核裂解方式和碎片离子结构。高喜树碱类衍生物中, 七元内酯环、共轭的吡啶环结构及 20 位的乙基等容易发生断裂, 产生一系列碎片离子。其中正负离子模式下产生的碎片还存在一定的差异, 部分裂解规律和喜树碱类的相似^[8]。

正离子模式下, 七元内酯环中的羰基和其相连的亚甲基容易一起丢失, 20 位的羟基也易以水的形式丢失; C、D 环中的内酰胺结构容易分别失去 CO、[NH] 等碎片离子; 20 位的乙基不能像喜树碱类一样和临位的羰基发生麦氏重排, 而是直接丢失后使 20 位 C 和内酯环开裂形成的游离羟基成五元杂环。

负离子模式下, 内酯环中羰基和相邻的 O 容易以 CO₂ 的形式一起丢失; C、D 环中的内酰胺结构容易失去一分子的 CO 碎片离子; 20 位的乙基则是以 C₂H₄ 或者 C₂H₆ 的形式断裂丢失。

总之, 本研究采用电喷雾离子阱裂解方式对高喜树碱类化合物母核的质谱裂解方式做了初步的分析, 为高喜树碱及其衍生物的结构修饰与代谢研究提供了非常有用的信息。

【参考文献】

- [1] Hsiang YH, Hertzber R, Hecht S, et al. Camptothecin induced protein-linked DNA breaks vis mammalian DNA topoisomerase I [J]. J Biol Chem, 1985, 260: 14837.
- [2] Ganguly A, Das BB, Sen N, Leishman' topoisomerase I: an ideal chimera for unraveling the role of the small subunit of unusual bisubunit topoisomerase I from Leishmania donovani [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6286.
- [3] 谭慧心. 拓扑异构酶抑制剂研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 436.
- [4] 杨 松, 张万年. 高喜树碱——极具开发价值的拓扑异构酶抑制剂 [J]. 药学报, 2004, 39(5): 396.
- [5] 缪震元, 张万年, 游 亮, 等. 7-芳杂环高喜树碱的合成与抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(2): 105.
- [6] Yeh TK, Li CM, Chen CP, et al. Antitumor activities and pharmacokinetics of silatecans DB-67 and DB-91 [J]. Pharmacol Res, 2010, 61: 108.
- [7] Lavergne O, Harnett J, Rolland A, et al. BN 80927: a novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1999, 9: 2599.
- [8] 李 柯, 钟大放. 电喷雾离子阱质谱分析喜树碱及其衍生物 [J]. 质谱学报, 2003, 24(增刊): 37.

[收稿日期] 2011-04-09

[修回日期] 2012-06-30