

玳玳果黄酮降脂滴丸制备过程中药效组分群的整体迁移率

连贇芳^{1,2}, 陈丹^{2*}, 黄群², 黄娇², 谢平², 马国萍², 朱仙慕²

(1. 漳州片仔癀药业股份有限公司, 福建漳州 363000; 2. 福建中医药大学药学院, 福建福州 350122)

摘要: 目的 考察玳玳果黄酮降脂滴丸制备过程中药效组分群的整体迁移率。方法 建立 HPLC 特征图谱, 条件为 Lichrocart C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-乙腈-0.2% 冰醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 284 nm, 比较黄酮提取物与成品药效组分群的整体迁移情况, 再通过 Pearson 相关系数法评价 6 批样品药效组分群的整体迁移相似度。结果 在制备过程中, 药效组分群对应的 9 个共有峰迁移率为 75.46% ~ 96.56%, 特征药效成分新橙皮苷和柚皮苷的迁移率分别达 96.56% 和 96.36%; 6 批样品药效组分群的平均整体迁移相似度为 1.000。结论 优化后, 玳玳果黄酮降脂滴丸制备工艺基本保留了原料药的药效组分群。

关键词: 玳玳果黄酮降脂滴丸; 制备; 药效组分群; 整体迁移率; HPLC 特征图谱; Pearson 相关系数法

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1078-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.014

General mobility of active component group in lipid-lowering dripping pills of *Citrus aurantium* var *daidai* fruits flavonoids during preparation

LIAN Yun-fang^{1,2}, CHEN Dan^{2*}, HUANG Qun², HUANG Jiao², XIE Ping², MA Guo-ping², ZHU Xian-mu²

(1. Zhangzhou Pientzhuang Pharmaceutical Co., Ltd., Zhangzhou 363000, China; 2. Department of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

KEY WORDS: lipid-lowering dripping pills of *Citrus aurantium* L. var *daidai* Tanaka fruits flavonoids; preparation; active component group; general mobility; characteristic HPLC chromatogram; Pearson correlation coefficient method

玳玳 *Citrus aurantium* L. var *daidai* Tanaka 为芸香科柑橘亚属植物, 主要分布于福建闽北地区, 部分生长于浙江、四川等地, 可用其替代枳壳入药, 具有行滞化痰、理气宽中的功效^[1-2]。课题组前期研究证实^[3-9], 玳玳果主要含有黄酮、挥发油、生物碱等成分, 其中黄酮含量不仅显著高于同科属其他植物, 而且为该药材降血脂、降胆固醇、抗氧化活性的有效部位。

玳玳果黄酮降脂滴丸由玳玳果黄酮降脂提取物及辅料聚乙二醇制备而成, 本实验将建立其 HPLC 特征图谱, 评价滴丸生产过程中药效组分群的整体

迁移率, 以确保其质量稳定, 并为相关生产工艺优化及改进提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, 配置 Waters 2996 光电二极管阵列检测器、Empower 3 (2998) 色谱工作站; AR2140 电子天平 (万分之一)、XS205 电子天平 (十万分之一) (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); KQ3200 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 玳玳果由福建恒馨天然香料有限公司提供, 经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室范

收稿日期: 2017-08-04

基金项目: 福建省战略性新兴产业发展专项产业技术开发项目 (闽发改高技 [2011] 1598); 福建省医学创新项目 (2016-CX-45); 福建省科技计划项目 (2010Y2004)

作者简介: 连贇芳 (1988—), 女, 硕士, 助理工程师, 从事中药制剂与质量分析评价研究。Tel: 15605963397, E-mail: 429354514@qq.com

* 通信作者: 陈丹 (1961—), 女, 博士, 教授, 从事中药制剂与质量分析评价研究。Tel: 13515026709, E-mail: gscd2@163.com

世明高级实验师鉴定为正品。玳玳果黄酮降脂提取物(自制^[8-9],总黄酮含有量76.27%);玳玳果黄酮降脂滴丸(自制^[10],提取物:聚乙二醇=1:4,批号20130807、20130808、20130809、20130810、20130811、20130812)。柚皮苷(批号110722-201111)、新橙皮苷(批号111857-201001)对照品(中国食品药品检定研究院)。甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取柚皮苷、新橙皮苷对照品适量,甲醇溶解并分别稀释至0.061 5、0.075 1 mg/mL,即得。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 提取物 精密称取提取物约100.0 mg置于25 mL量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取5.0 mL置于25 mL量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 滴丸 取干燥至恒重的滴丸20丸,研细,精密称取粉末约100.0 mg,置于25 mL量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 色谱条件 Lichrocart C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相甲醇-乙腈-0.2%冰醋酸,梯度洗脱(程序见表1);体积流量1.0 mL/min;检测波长284 nm;柱温25 ℃;进样量20 μL。理论塔板数按新橙皮苷峰计,应不低于3 000。

表1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution programs

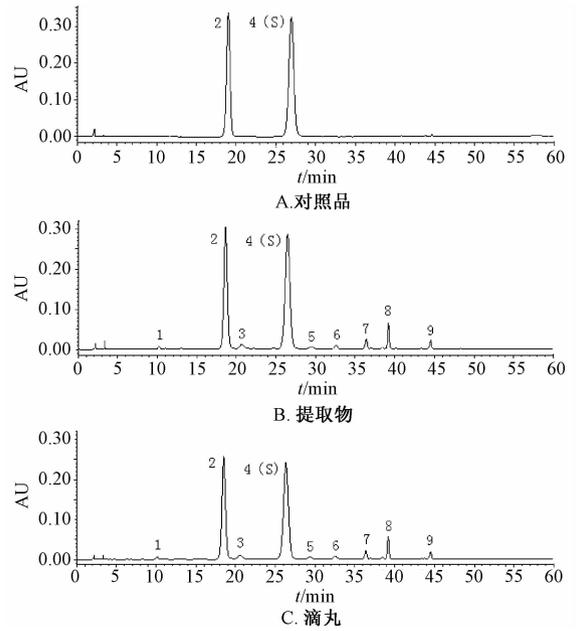
时间/min	甲醇/%	乙腈/%	0.2%冰醋酸/%
0	2	18	80
25	2	18	80
50	2	35	63
55	2	48	50
60	2	18	80

2.4 方法学考察

2.4.1 色谱柱及对照峰选择 精密吸取供试品溶液20 μL注入液相色谱仪,记录60 min色谱图,考察DicmaDiamonsil C₁₈、Elite C₁₈、Lichrocart C₁₈色谱柱,发现DicmaDiamonsil C₁₈分析柱保留时间延后,Elite C₁₈柱分离效果不够稳定,故选择Lichrocart C₁₈色谱柱。同时,新橙皮苷色谱峰在供试品色谱图上保留时间适中,而且它又是玳玳果总黄酮提取物的主要特征药效成分,色谱峰面积最大,与相邻峰分离良好,故选择其作为对照峰(S)。

2.4.2 系统适用性试验 精密吸取对照品、供试品溶液各20 μL,在“2.3”项色谱条件下测定,

结果见图1,其中1~9号色谱峰为共有峰,均分离良好。



2. 柚皮苷 4. 新橙皮苷
2. naringin 4. neohesperidin

图1 各成分HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of various constituents

2.4.3 精密度试验 取同一供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样测定,结果见表2、3,均符合相关规定(相对保留时间RSD < 1.05%,峰面积比值RSD < 1.96%)。

表2 相对保留时间精密度试验结果

Tab.2 Results of precision tests for relative retention time

峰号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
1	0.397	0.393	0.388	0.388	0.387	0.387	0.390	1.05
2	0.713	0.711	0.709	0.708	0.707	0.709	0.709	0.31
3	0.795	0.795	0.796	0.794	0.794	0.797	0.795	0.15
4(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.118	1.119	1.124	1.122	1.123	1.125	1.122	0.25
6	1.251	1.257	1.261	1.268	1.268	1.262	1.261	0.52
7	1.652	1.663	1.670	1.677	1.678	1.674	1.669	0.60
8	1.834	1.848	1.856	1.871	1.871	1.861	1.857	0.77
9	2.098	2.116	2.126	2.145	2.145	2.132	2.127	0.85

2.4.4 重复性试验 取同一批样品(批号20130810)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样测定,结果见表4、5,均符合相关规定(相对保留时间RSD < 1.95%,峰面积比值RSD < 2.63%)。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,于0、2、4、6、8、12 h在“2.3”项色谱条件下进样测定,结果见表6、7,均符合相关规定(相对保留时间RSD < 1.02%,峰面积比值RSD < 2.58%)。

表3 峰面积比值精密度试验结果

Tab. 3 Results of precision tests for peak area ratio

峰号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
1	0.010 5	0.010 4	0.010 5	0.010 7	0.010 8	0.010 7	0.010 6	1.46
2	0.772 6	0.776 2	0.779 6	0.777 3	0.775 5	0.779 5	0.776 8	0.34
3	0.044 3	0.043 9	0.043 1	0.042 9	0.042 1	0.042 1	0.042 6	1.96
4(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
5	0.020 8	0.020 4	0.020 8	0.020 1	0.020 1	0.020 6	0.020 5	1.57
6	0.017 2	0.017 7	0.017 7	0.017 2	0.017 2	0.017 9	0.017 7	1.73
7	0.037 9	0.037 4	0.038 2	0.039 0	0.038 1	0.037 8	0.038 1	1.41
8	0.074 3	0.074 7	0.076 1	0.078 6	0.076 3	0.076 1	0.076 0	1.81
9	0.025 9	0.026 3	0.025 9	0.026 3	0.027 2	0.026 4	0.026 4	1.81

表4 相对保留时间重复性试验结果

Tab. 4 Results of reproducibility tests for relative retention time

峰号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
1	0.401	0.389	0.387	0.389	0.389	0.392	0.391	1.30
2	0.712	0.705	0.703	0.703	0.700	0.705	0.705	0.57
3	0.788	0.784	0.781	0.780	0.774	0.779	0.781	0.61
4(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.111	1.114	1.114	1.112	1.108	1.107	1.111	0.27
6	1.259	1.288	1.306	1.312	1.327	1.314	1.301	1.85
7	1.641	1.680	1.698	1.700	1.702	1.698	1.686	1.40
8	1.820	1.890	1.910	1.916	1.913	1.910	1.893	1.95
9	2.188	2.167	2.220	2.240	2.261	2.271	2.224	1.84

表5 峰面积比值重复性试验结果

Tab. 5 Results of reproducibility tests for peak area ratio

峰号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
1	0.010 9	0.010 8	0.010 5	0.011 0	0.010 9	0.010 4	0.010 5	2.30
2	0.774 1	0.777 8	0.778 0	0.772 1	0.768 5	0.768 3	0.773 1	0.56
3	0.046 2	0.048 3	0.048 4	0.045 3	0.046 3	0.047 1	0.046 9	2.63
4(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
5	0.020 4	0.020 4	0.019 7	0.020 1	0.020 1	0.020 4	0.020 2	1.38
6	0.017 3	0.018 0	0.018 1	0.017 2	0.017 5	0.018 3	0.017 7	2.60
7	0.038 1	0.038 4	0.038 2	0.037 9	0.038 1	0.038 3	0.038 2	0.47
8	0.079 0	0.079 9	0.080 0	0.080 3	0.080 5	0.080 3	0.080 0	0.67
9	0.027 4	0.027 5	0.027 0	0.026 9	0.027 1	0.026 7	0.027 1	1.12

表6 相对保留时间稳定性试验结果

Tab. 6 Results of stability tests for relative retention time

峰号	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	平均值	RSD/%
1	0.397	0.387	0.388	0.388	0.387	0.387	0.389	1.02
2	0.713	0.709	0.709	0.708	0.708	0.708	0.709	0.27
3	0.795	0.795	0.795	0.794	0.796	0.798	0.795	0.17
4(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.118	1.124	1.123	1.124	1.124	1.125	1.123	0.23
6	1.251	1.260	1.264	1.266	1.265	1.259	1.261	0.44
7	1.652	1.670	1.670	1.675	1.675	1.670	1.669	0.51
8	1.834	1.855	1.859	1.865	1.866	1.854	1.856	0.63
9	2.098	2.123	2.130	2.137	2.138	2.124	2.125	0.69

表7 峰面积比值稳定性试验结果

Tab. 7 Results of stability tests for peak area ratio

峰号	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	平均值	RSD/%
1	0.010 5	0.010 5	0.010 8	0.010 8	0.010 8	0.010 4	0.010 6	1.79
2	0.772 6	0.777 9	0.780 9	0.780 9	0.779 1	0.775 6	0.777 8	0.42
3	0.044 3	0.044 8	0.044 7	0.042 0	0.042 9	0.043 2	0.043 7	2.58
4(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
5	0.022 9	0.022 9	0.023 3	0.021 3	0.021 5	0.021 4	0.022 7	1.68
6	0.016 1	0.017 1	0.016 5	0.016 3	0.016 5	0.016 3	0.016 5	2.09
7	0.037 9	0.038 0	0.039 5	0.038 2	0.038 7	0.039 5	0.038 6	1.88
8	0.074 3	0.075 3	0.076 5	0.075 6	0.076 6	0.076 6	0.075 8	1.22
9	0.025 9	0.025 7	0.025 9	0.025 3	0.025 8	0.026 3	0.025 8	1.26

2.5 特征图谱相似度数据处理方法 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”软件评价相似度,采用中位数法(时间窗宽度0.5 min)生成对照特征图谱,以新橙皮苷色谱峰(S)为特征峰图谱的对照峰。

2.6 滴丸对照特征图谱的建立 取干燥至恒重的滴丸6批,按“2.2”项下方法操作,在“2.3”项色谱条件下进样测定,记录60 min色谱图,确定共有峰。然后,分析对照色谱图、各批供试品HPLC色谱图,确定滴丸HPLC特征图谱主要物质群中的特征峰及其归属^[3],结果见表8~10,均符

合相关规定。

表8 特征峰分析

Tab. 8 Analysis of characteristic peaks

特征峰	滴丸
特征共有峰/个	9
共有特征峰峰面积占总峰面积比例/%	97.92
非共有峰峰面积占总峰面积比例/%	2.08
归属/特征峰峰号	柚皮苷/2
占总峰面积比例/%	37.97
峰面积比值范围	0.616 7~0.925 1
归属/特征峰峰号	新橙皮苷/4(S)
占总峰面积比例/%	48.55
峰面积比值	1.000 0

表9 共有峰相对保留时间

Tab. 9 Relative retention time of common peaks

峰号	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
1	0.389	0.385	0.385	0.388	0.387	0.388	0.387	0.43
2	0.701	0.703	0.706	0.709	0.709	0.710	0.706	0.52
3	0.783	0.785	0.792	0.796	0.798	0.800	0.792	0.88
4(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
5	1.113	1.118	1.122	1.124	1.125	1.125	1.121	0.43
6	1.323	1.286	1.271	1.259	1.255	1.252	1.274	2.11
7	1.717	1.687	1.676	1.666	1.661	1.658	1.677	1.32
8	1.973	1.890	1.866	1.847	1.838	1.832	1.874	2.81
9	2.220	2.166	2.135	2.113	2.102	2.094	2.138	2.23

表10 共有峰峰面积比值

Tab. 10 Peak area ratios of common peaks

批次	峰号								
	1	2	3	4(S)	5	6	7	8	9
1	0.010 9	0.773 5	0.033 6	1.000 0	0.019 5	0.017 6	0.037 3	0.080 2	0.026 7
2	0.010 8	0.775 0	0.033 3	1.000 0	0.020 4	0.016 3	0.038 1	0.078 8	0.028 1
3	0.010 9	0.775 3	0.035 5	1.000 0	0.020 0	0.016 3	0.038 6	0.076 4	0.025 8
4	0.010 7	0.769 1	0.034 5	1.000 0	0.020 5	0.016 2	0.038 6	0.076 6	0.027 2
5	0.010 6	0.768 7	0.033 8	1.000 0	0.020 5	0.016 8	0.038 6	0.076 9	0.026 4
6	0.010 1	0.763 9	0.031 8	1.000 0	0.020 0	0.017 1	0.038 0	0.077 0	0.027 6
平均值	0.010 7	0.770 9	0.033 8	1.000 0	0.020 2	0.016 7	0.038 2	0.077 7	0.027 0
范围	0.007 5~	0.616 7~	0.023 6~	1.000 0	0.014 1~	0.011 7~	0.026 7~	0.054 4~	0.018 9~
	0.013 9	0.925 1	0.043 9		0.026 2	0.021 7	0.049 7	0.101 0	0.035 0

2.7 整体迁移率的评价 提取物、滴丸特征图谱中各检测出9个共有峰,比较两者对应的共有峰面积,并进行相对量化分析,两者供试品溶液的质量浓度均配制成相当于含提取物0.8 mg/mL,再分别计算将提取物投料制成滴丸的工艺过程中各药效组分群的迁移率,结果见表11。

表 11 共有峰面积整体迁移率

Tab. 11 General mobilities of common peak areas

峰号	折算峰面积		整体迁移率/%
	提取物	滴丸	
1	107 657	81 429	75.64
2	7 348 934	7 081 316	96.36
3	492 031	470 076	95.54
4	9 599 673	9 269 331	96.56
5	245 152	235 409	96.03
6	187 389	163 375	87.19
7	364 721	352 138	96.55
8	754 727	727 464	96.39
9	251 760	239 272	95.04

注:整体迁移率=(滴丸各成分折算峰面积/提取物各成分折算峰面积)×100%

2.8 相似度分析 应用SPSS 18.0软件,对6批提取物及滴丸的9个共有峰折算峰面积进行线性回归分析,通过Pearson相关系数来评价滴丸制备过程中各药效组分的保留相关性,结果见表12。由表可知,提取物与滴丸中药效组分群整体迁移率的相似度极高,表明后者在整体上较好保留了前者的药效组分群。

表 12 整体迁移率相似度

Tab. 12 Similarities of general mobilities

批号	20130807	20130808	20130809	20130810	20130811	20130812	平均值
相似度	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000

3 讨论

中药有效部位提取物是药效组分群的集合体,利用固体分散体技术制备中药滴丸时,常采用加热熔融法混匀药物与基质。玳玳果黄酮降脂滴丸在制备过程中受药液温度、药物与基质比例、基质种类等因素的影响,可能会导致药效成分的损失。因

此,本实验基于HPLC特征图谱,考察滴丸制备过程中药效成分的整体迁移率,以确保其降脂药效。

经方法学考察发现,提取物和滴丸HPLC特征图谱中各共有峰的相对峰面积及相对保留时间均有良好的精密度、重复性及稳定性,可用于评价滴丸制备过程中药效组分群整体迁移率。然后,通过简单数据量化关系及Pearson相关系数分析,发现各药效组分群的整体迁移率均>75%,其中特征药效成分新橙皮苷和柚皮苷均>96%;6批玳玳果黄酮降脂滴丸药效组分群整体迁移率的相似度为1.000,表明基本保留了其提取物的整体药效组分群,可为相关生产工艺的改进提供科学依据。

参考文献:

- [1] 新安,王一仁. 饮片新参[M]. 上海:上海千顷堂书局出版社,1936:128.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:446.
- [3] Zeng L J, Chen D, Huang Q D, et al. Isolation of a new flavanone from Daidai fruit and hypolipidemic activity of total flavonoids extracts [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29 (16): 1521-1528.
- [4] 刘永静,陈丹,邱红鑫,等. 玳玳黄酮有效部位提取物降血脂作用的研究[J]. *中国中医药科技*, 2013, 20(6): 622-623.
- [5] 邱红鑫,陈丹,刘永静,等. 玳玳果黄酮滴丸对高脂血症大鼠的降血脂作用研究[J]. *中国现代应用药学*, 2011, 28(7): 597-601.
- [6] 邱红鑫,陈丹,刘永静,等. 玳玳果滴丸的制备工艺优选[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(5): 357-361.
- [7] 连赟芳,陈丹,廖淑彬,等. 玳玳果黄酮降脂滴丸的肠吸收动力学特性[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(20): 1744-1749.
- [8] 刘永静,陈丹,黄庆德,等. 玳玳果中总黄酮研究提取工艺[J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(21): 1826-1828.
- [9] 陈丹,刘永静. 一种玳玳果总黄酮有效部位的制备方法:中国, CN201010556341.9[P]. 2011-05-18.
- [10] 连赟芳,陈丹,廖淑彬,等. 玳玳果黄酮降脂滴丸大鼠体内口服生物利用度及药动学研究[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(13): 1171-1176.