

复方冬凌草含片的质量标准研究

冀春茹 袁珂 胡润淮 敬林林* 曹振玉* (河南中医学院 郑州 450003)

摘要 采用 TLC 法对复方冬凌草含片中冬凌草、甘草、桔梗、薄荷进行定性鉴别;并应用薄层扫描法对冬凌草中冬凌草甲素的含量进行测定。该法简便易行,重现性好,结果可靠,可作为该制剂的质量控制标准。

关键词 复方冬凌草含片 冬凌草甲素 TLC 质量标准 含量测定

Study on Quality Standards of Compound *Rabdosia Rubescens* Buccal Tablets

Ji Chunru, Yuan Ke, Hu Runhuai, Jing Linlin, Cao Zhenyu

(Henan College of TCM, Zhengzhou, 450003)

Abstract: Using the TLC method, a qualitative analysis of *rabdosia rubescens*, *glycyrrhiza uralensis*, *platycodon grandiflorum* and *Mentha haplocalyx* Briq in the compound *rabdosia rubescens* buccal tablets was carried out and the content of oridonin in *Rabdosia rubescens* was determined by a method of TLC-scanning, which was proved to be easy to carry out and reliable, and which can be used for the quality control standard of this preparation.

Key words: compound *rabdosia rubescens* buccal tablets, Oridonin, TLC, quality standards, determination of content

* 本院中药系毕业实习生

复方冬凌草含片为我院研制的一种中药新药,由冬凌草、甘草、桔梗、薄荷4味药组成,具有疏风散热、解毒利咽、消肿止痛之功能,对治疗急性咽喉炎具有良好的疗效。据文献报道^[1~3],冬凌草除具有清热解毒、消肿利咽的作用外,还具有较强的抗肿瘤作用,并对癌前病变发展有明显的抑制作用。为了控制制剂质量,我们采用薄层层析法对冬凌草、甘草、桔梗、薄荷进行定性鉴别,并应用薄层扫描法对主药冬凌草中的有效成分冬凌草甲素进行含量测定。

1 仪器与试剂

CS-9301 双波长薄层扫描仪(日本岛津);微量分析天平(EETTLER AE 240 瑞士);三用紫外线分析仪(江苏省江阴市申港电光仪器厂生产);点样定量毛细管(Drummond Scientific CO USA);薄层自动铺板器(重庆南岸新力实验电器厂);硅胶 GF₂₅₄及硅胶 G(青岛海洋化工厂生产);冬凌草甲素(含量为98.46%);对照品(由中国科学院昆明植物研究所提供);甘草酸单铵盐、薄荷脑对照品(由中国药品生物制品检定所提供)。

冬凌草为唇形科植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的干燥叶及地上部分;甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根及根茎;桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* 的干燥根;薄荷为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq 的干燥地上部分。(上述对照药材均由河南中医学院王中会副教授鉴定)。其它试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 冬凌草的鉴别 取本品10片,研细后每次用20ml 乙醚冷浸5次,每次30min,过滤,合并滤液置蒸发皿中在水浴上挥干,残渣用甲醇溶解,定容至2ml 作为供试品溶液。另取冬凌草甲素对照品,加甲醇配成每1ml 含5mg 的溶液,作为冬凌草甲素对照品溶液。再取冬凌草药材1.5g,研细,按供试品溶液的制备方

法制成对照药材溶液。按复方冬凌草含片的处方,从中除去被检药材冬凌草,模拟工艺按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。分别吸取上述溶液各6 μ l,点于同一硅胶 G 板上(10cm \times 20cm),以氯仿-甲醇(10:1)为展开剂展开,展开前饱和1h。取出,晾干,喷以50%硫酸溶液,用电吹风加热至斑点清晰,板放凉后,置紫外灯(365nm)下观察,供试品色谱中,在与对照品色谱及对照药材色谱的相应位置上,显相同的亮黄绿色斑点,而阴性对照品于相应位置不产生斑点,结果见图1。

2.2 甘草的鉴别 取本品5片,研细后加入10倍量水煎煮1h,过滤,滤液加浓硫酸放置过滤,将不溶物水洗至中性,烘干,用50%乙醇溶解不溶物,定容至1ml 作为供试品溶液。另取甘草酸单铵盐对照品,加50%乙醇配成1ml 含3mg 的溶液,作为对照品溶液。再取甘草药材1g,研细,按供试品溶液的制备方法制成对照药材溶液。按缺味配制的模拟制剂,照供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。分别吸取上述溶液各4 μ l,点于同一硅胶 GF₂₅₄板上(10cm \times 20cm),以正丁醇-冰醋酸-水(4:1:2)为展开剂展开,展开前饱和30min。取出,晾干,置紫外灯(254nm)下观察,供试品色谱中,在与对照品色谱及对照药材色谱的相应位置上,显相同的紫红色斑点,而阴性对照品于相应位置不产生斑点,结果见图2。

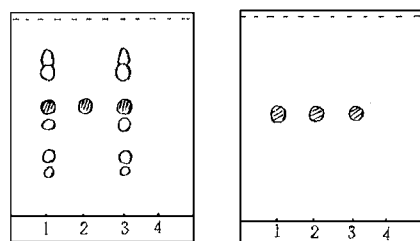


图1 冬凌草的 TLC 图谱

图2 甘草的 TLC 图谱

1. 样品

1. 甘草酸单铵盐对照品

2. 冬凌草甲素对照品

2. 样品

3. 冬凌草对照药材

3. 甘草对照药材

4. 阴性对照品

4. 阴性对照品

2.3 薄荷的鉴别 取本品10片,研细,置一小烧杯中,上方盖一放有冰块的培养皿,在95℃水浴中加热0.5h,取出放置室温后,取下培养皿,用乙醚:甲醇(3:1)4ml将培养皿上的白色升华物溶解,移至小烧杯中,25℃挥尽乙醚,用甲醇定容至1ml作为供试品溶液。另取薄荷脑对照品1mg用甲醇溶解定容至1ml作为对照品溶液。按缺味配制的模拟制剂,照供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。分别吸取上述溶液各4 μ l,点于同一硅胶G薄层板上(10cm \times 20cm),以苯:乙酸乙酯(19:1)为展开剂展开,取出,晾干,喷以20%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点清晰,放凉后观察,供试品色谱中,在与对照品色谱的相应位置上,显相同的紫红色斑点,而阴性对照品于相应位置上不产生斑点,结果见图3。

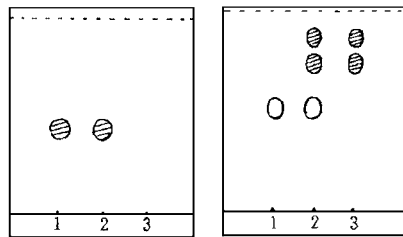


图3 薄荷的 TLC 图谱

1. 样品
2. 薄荷脑对照品
3. 阴性对照品

2.4 桔梗的鉴别 取本品5片,研细,放入小烧杯中,每次用2%硫酸溶液30ml至电炉上加热回流2次,每次30min。过滤,滤液加10%氢氧化钠溶液调pH至5,后用乙醚萃取2次,每次30ml。分取乙醚层挥干乙醚,加甲醇溶解定容至1ml作为供试品溶液。另取桔梗药材1g,研细,按供试品溶液的制备方法制成对照药材溶液。按缺味配制的模拟制剂,照供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。分别吸取上述溶液各4 μ l,点于同一硅胶G薄层板上(10cm \times 20cm),以正己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(3:2:1)为展开剂展开,取出,晾干,喷以20%硫酸乙醇溶液,于105℃烘至斑点清

晰,放凉后观察,供试品色谱中,在与对照药材色谱的相应位置上,显相同的黄色斑点,而阴性对照品于相应位置上不产生斑点,结果见图4。

3 含量测定

3.1 薄层层析条件及薄层扫描条件 吸附剂:硅胶G-0.3% CMC-Na(3:1)搅拌均匀后涂布于(10cm \times 20cm)玻璃板上,厚度为0.5mm,室温置干后于105℃活化1h置干燥器中备用。展开剂:氯仿-甲醇(10:1),展开方式:上行,展距18cm。显色剂:50%硫酸乙醇液,喷湿润,100~105℃烘烤5~6min,至斑点清晰,取出,放凉后,在紫外灯(365nm)下定位, R_f 值在0.55左右。

采用反射法双波长锯齿扫描法,狭缝0.4mm \times 0.4mm,线性参数SX=3,扫描宽度14mm,灵敏度中等,测定波长 $\lambda_s=246$ nm,参比波长 $\lambda_R=300$ nm。

3.2 对照品溶液及样品溶液的制备 精密称取冬凌草甲素对照品4.75mg,置1ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,为4.75mg/ml。精密称取本品6.02g,研细后加甲醇150ml置索氏提取器中提取至近无色(10h),将提取液浓缩至干,残渣用甲醇溶解并转移至5ml容量瓶中用甲醇定容至刻度。

3.3 标准曲线的绘制 用定量毛细管吸取上述对照品溶液2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 μ l点于同一块硅胶G薄层板上,以展开剂展开,取出,晾干,喷以显色剂,烘烤后出现亮黄绿色斑点,放置30min后进行扫描。以冬凌草甲素(μ g)为横坐标,以斑点峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线,求得回归方程 $Y=161.66x+88.21$,相关系数 $r=0.999$ ($n=5$)。结果表明冬凌草甲素在9.5~47.5 μ g范围内,浓度与其峰面积积分值呈一不通过原点的直线,故用外标两点法定量。

3.4 稳定性试验 在同一硅胶G薄层板上,点冬凌草甲素对照品溶液4 μ l,展开,显色后,分别于30,60,90,120min进行扫描,结果

图4 桔梗的 TLC 图谱

1. 阴性对照品
2. 样品
3. 桔梗对照药材

2h 内斑点面积积分值基本不变, $\bar{x} = 1947.103$, $RSD = 1.27\%$ 。

3.5 精密度及重现性试验 用定量毛细管吸取对照品溶液 $4\mu\text{l}$ 点相同浓度的5个点于同一块薄层板上, 展开, 显色, 扫描, 结果斑点积分面积值平均值 $\bar{x} = 1987.845$, $RSD = 2.40\%$, 说明精密度尚好。

同一展开后的样品斑点连续5次扫描测定, 结果斑点面积积分值平均值 $\bar{x} = 1972.058$, $RSD = 0.59\%$, 说明重现性好。

3.6 样品的含量测定 吸取样品溶液 $6\mu\text{l}$ 点于硅胶 G 薄层板上, 随行点对照品溶液 $2\mu\text{l}$ 和 $4\mu\text{l}$, 进行展开, 显色, 扫描, 用外标两点法计算出样品中冬凌草甲素的含量, 平均含量 0.084 , 变异系数 1.56 。

3.7 加样回收率试验 精密称取 6g 研细的复方冬凌草含片, 精密加入一定量冬凌草甲素对照品, 处理方法同样品溶液的制备, 测定其回收率, 共测4次, 结果平均回收率为 98.03% , RSD 为 2.50% 。

4 讨论

4.1 展开剂选用氯仿-甲醇(10:1)能达到较好的分离效果, 排除色素的干扰。

4.2 由于显色剂是50%的硫酸, 所以显色后烘烤时易使薄板炭化变黑, 使显色斑点被掩盖, 故加粘合剂铺板时所配 CMC-Na 的浓度不宜超过 0.3% 。

4.3 用4个阴性对照品溶液进行的空白对照试验中, 空白样品都没有出现相应的斑点, 这

说明其鉴别可靠, 具有专属性。

4.4 在冬凌草和甘草的鉴别中, 样品与对照药材的斑点相同, 而阴性对照品则无斑点。这是因为冬凌草的鉴别是通过显色后在紫外灯 365nm 下观察荧光的办法。而冬凌草中的主要成分都显示荧光, 其它药材中的成分在此条件下却不显荧光, 故缺冬凌草的阴性对照品就无荧光斑点, 而对照药材与样品的斑点相同; 甘草的鉴别则是用荧光板来观察成分掩盖荧光后的暗斑的办法。由于采用本法处理样品、对照药材及阴性对照品只能将甘草酸单铵盐提出, 故样品与对照药材中的斑点相同, 并只出现一个暗斑, 而阴性对照品则无暗斑。

4.5 薄荷的鉴别则是利用升华法, 故缺薄荷的阴性对照品中不会出现斑点。

4.6 采用薄层扫描法对复方冬凌草含片中的冬凌草甲素进行了测定。实验结果表明, 该法简便易行, 重现性好, 结果可靠, 可作为控制其质量的标准。

参考文献

- 1 王庆端, 王绵英, 华海婴, 等. 不同地区冬凌草有效成分抗肿瘤作用研究. 河南医科大学学报, 1987, 22(1): 33
- 2 王绵英, 张覃沐. 冬凌草甲素对几种肿瘤细胞 M 期作用机制的探讨. 癌症, 1984, 3(2): 84
- 3 河南省医学科学研究所肿瘤药理研究组. 冬凌草抗肿瘤及其药理作用的研究. 河南医学院学报, 1975, 10(2): 9