

白芪龙胶囊的质量标准研究

马睿,代龙*,孙明江,刘玉军
(山东中医药大学,济南 250355)

[摘要] 目的:研究并建立白芪龙胶囊的质量控制方法。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中白花蛇舌草、天龙、黄芪、茯苓等进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)对黄芪中的黄芪甲苷进行含量测定,并制定合理的含量限度。结果:TLC法可专属地鉴别白花蛇舌草、天龙、黄芪和茯苓,且特征斑点圆整清晰,阴性对照无干扰;含量测定结果显示,黄芪甲苷在 1.354~10.832 μg 线性关系良好, $r=0.9998(n=5)$,平均加样回收率为 99.59% (RSD 1.25%, $n=6$)。结论:所建立的方法简便可行,专属性高,重复性好,可有效控制白芪龙胶囊的质量。

[关键词] 白芪龙胶囊;质量标准;天龙;黄芪甲苷

[中图分类号] 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0052-04

Studies on Quality Standard of Baiqilong Capsules

MA Rui, DAI Long*, SUN Ming-jiang, LIU Yu-jun
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To study and establish the quality control methods for Baiqilong capsules. **Method:** The method of TLC was used to identify *Hedyotis diffusa*, *Gekko swinhoana*, *Radix Astragali* and *Poria cocos*. The content of astragaloside IV was determined by HPLC. **Result:** Four herbal drugs were well identified by TLC, the spots were clear, round and without interference. Quantitative analysis of HPLC showed that the linear range of astragaloside IV was 1.354~10.832 μg . The average recovery of astragaloside IV was 99.59%, and the RSD was 1.25% ($n=6$). **Conclusion:** The method set up is simple and feasible, and could effectively control the quality of Baiqilong capsules.

[Key words] Baiqilong capsules; quality control; *Gekko swinhoana*; astragaloside IV

白芪龙胶囊系国家科技部“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2009ZX09103-411),由白花蛇舌草、黄芪等 5 味中药经独特的仿生酶解工艺及先进的专利纯化技术加工而成,其中以白花蛇舌草、天龙(壁虎)为君,法半夏和茯苓为臣,黄芪为佐,具有

清热解毒,散结消瘀,健脾化痰之功效,用于非小细胞肺癌(NSCLC)、肝癌等多种恶性肿瘤的治疗,亦可配合放疗、化疗及手术后辅助治疗,均取得了满意效果。为有效控制产品质量,充分保证临床疗效,特对制剂的质控标准进行了详细研究,采用 TLC 对白花蛇舌草等 4 味进行了定性鉴别,采用 HPLC 对方中黄芪甲苷进行了含量测定。

1 仪器与试剂

LC-10A 型高效液相色谱仪,包括 Alltech 2000ES ELSD 检测器、CLASS-VP 工作站(日本岛津公司);UV1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);AB135-S 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

[收稿日期] 20100830(003)

[基金项目] 科技部“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-411)

[第一作者] 马睿,在读硕士,从事中药制剂工艺及质量标准的研究, Tel: 0531-82960689, E-mail: mary19870123@sina.com

[通讯作者] *代龙,教授,从事中药新药开发及新制剂技术的研究, Tel: 0531-82960689, E-mail: dailongdailong@263.net

对照品及对照药材均购自中国药品生物制品检定所,白花蛇舌草对照药材(批号 121183-200402),茯苓对照药材(批号 121117-200403),亮氨酸对照品(批号 110876-200204),甘氨酸对照品(批号 110735-200102),L-谷氨酸对照品(批号 111576-200201),黄芪甲苷对照品(批号 110781-200613);白芪龙胶囊(批号 20100301,20100302,20100401,自制);乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别^[1]

2.1.1 白花蛇舌草 取本品内容物 2 g,研细,置索氏提取器中,加石油醚(30~60℃)回流提取至提取液近无色,药渣挥去残留石油醚,加甲醇 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 20 mL 使溶解,水液加盐酸调 pH 1~2,乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯液,浓缩至 1 mL,作为供试品溶液。另取白花蛇舌草对照药材 2 g,同法制成对照药材溶液。再取阴性样品(缺白花蛇舌草的样品),按照供试品溶液的制备方法进行制备,即得阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 1 μL,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 36% 乙酸为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

2.1.2 天龙 取本品内容物 0.2 g,研细,加稀乙醇 20 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液加盐酸 20 mL,100℃加热回流 1 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取亮氨酸、甘氨酸和谷氨酸对照品,加 70% 甲醇制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的混合溶液,作为对照品溶液。再取阴性样品(缺天龙的样品),按照供试品溶液的制备方法进行制备,即得阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 1 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-冰乙酸-水(4:1:1)为展开剂,二次展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,加热至斑点显色清晰。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。

2.1.3 黄芪 取本品内容物 4 g,研细,加甲醇 50 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 20 mL 使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用 1% 氢氧化钠溶液充分洗

涤 2 次,每次 30 mL,弃去碱液,正丁醇液蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,通过 D101 型大孔树脂(内径为 1.5 cm,柱高为 10 cm),以水 30 mL 洗脱,弃去水液,再用 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 70% 乙醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取黄芪甲苷对照品,加甲醇制成每 1 g·L⁻¹ 的溶液,作为对照品溶液。再取阴性样品(缺黄芪的样品),按照供试品溶液的制备方法进行制备,即得阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液(放置至室温)为展开剂,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105℃加热至斑点显色清晰。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。

2.1.4 茯苓 取本品内容物 3 g,研细,加乙醚 50 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液挥干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取茯苓对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。再取阴性样品(缺茯苓的样品),按照供试品溶液的制备方法进行制备,即得阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(10:1:0.2)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,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[2-4] 依利特 ODS 柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm),流动相乙腈-水(32:68);ELSD 检测,放大系数 2,漂移管温度 101℃,载气(空气)流量 2.7 L·min⁻¹,流动相流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃。理论板数按黄芪甲苷峰计算不低于 4 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷对照品 6.77 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得黄芪甲苷对照品储备液。精密量取上述对照品储备液 4 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得黄芪甲苷对照品溶液(0.270 8 g·L⁻¹)。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物,研细,取约 4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,

摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,蒸干,残渣加水 20 mL 使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤 2 次,每次 40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇使溶解,并定量转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密量取黄芪甲苷对照品溶液(1.354 g·L⁻¹)0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mL 于 1 mL 量瓶中,分别加甲醇稀释至刻度,得浓度为 0.135 4,0.270 8,0.541 6,0.812 4,1.083 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液,按照 2.2.1 色谱条件,分别进样 10 μL 进行测定。以黄芪甲苷进样量的对数为横坐标(X),峰面积积分值的对数为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 1.314 7 X + 5.1929$ ($r = 0.999 8$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在 1.354 ~ 10.832 μg 线性关系良好。

2.2.5 专属性试验 取黄芪以外的其余药味,按照制备工艺制成不含黄芪的空白制剂,然后按照供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。按照 2.2.1 色谱条件进行测定,进样量 20 μL,结果在黄芪甲苷对照品相同保留时间处无干扰峰,表明其余药味对黄芪甲苷的测定无干扰,结果见图 1。

2.2.6 精密度试验 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液(0.270 8 g·L⁻¹),按照 2.2.1 色谱条件进行测定,重复测定 6 次,进样量 20 μL。结果黄芪甲苷峰面积积分值 RSD 1.02% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取上述供试品溶液(批号 20100301)分别于配制后的 2,4,6,8,10,12 h 测定黄芪甲苷峰面积,进样量 20 μL。结果黄芪甲苷峰面积积分值 RSD 0.75% ($n = 6$),表明供试品溶液在 12 h 内具有良好的稳定性。

2.2.8 重复性试验 取同一批次白芪龙胶囊(批号 20100301)内容物,共 6 份,分别按 2.2.4 方法制得供试品溶液,照 2.2.1 色谱条件进行测定,进样量 20 μL。结果制剂中黄芪甲苷的平均含量为 0.162 mg/粒,RSD 1.51% ($n = 6$),表明本含量测定方法重复性较理想。

2.2.9 加样回收试验 取已知含量的白芪龙胶囊(批号 20100301,黄芪甲苷含量 0.162 mg/粒)内容物,约 2 g,共 6 份,精密称定,分别精密加入黄芪甲苷对照品溶液(0.042 6 g·L⁻¹)25 mL 和甲醇各 25 mL,称定质量,其余按 2.2.3 方法操作,制得供试品

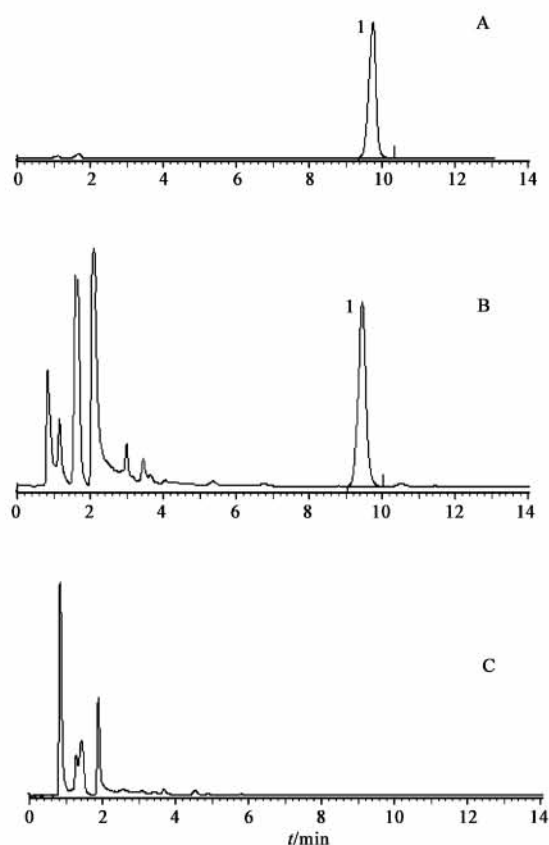


图 1 白芪龙胶囊 HPLC

A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照溶液;1. 黄芪甲苷溶液,照 2.2.1 色谱条件进行测定,进样量 20 μL,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 黄芪甲苷加样回收试验($n = 6$)

称样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
2.023 1	0.936 4	1.982 6	98.23	99.59	1.25
1.992 8	0.922 4	1.996 5	100.85		
2.132 0	0.986 8	2.043 8	99.25		
2.067 0	0.956 7	2.001 9	98.14		
2.008 3	0.929 6	1.996 3	100.16		
1.998 3	0.924 9	1.999 8	100.93		

2.2.10 样品含量测定 取 3 批样品分别制得供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液 10,20 μL,供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,按照 2.2.1 色谱条件进行测定,每批样品测定 3 份,采用外标两点法对数方程计算黄芪甲苷含量,结果见表 2。

根据上述结果及药典中黄芪药材的黄芪甲苷含量低限(≥0.04%),确定本制剂的黄芪甲苷含量低限为 0.06 mg/粒[200 g 药材 × 0.04% × 70% (转移

率)/1 000粒 = 0.056 mg/粒],3批制剂的含量均在低限以上,表明所制定的黄芪甲苷含量限度(≥ 0.06 mg/粒)是合理的。

表2 白芪龙胶囊中黄芪甲苷测定($n=3$)

批号	黄芪甲苷平均含量/mg/粒	RSD/%
20100301	0.163	0.69
20100302	0.114	0.48
20100401	0.148	0.81

3 讨论

3.1 白花蛇舌草 TLC 鉴别 白花蛇舌草为方中君药,文献报道其抗肿瘤成分主要为总黄酮和多糖类,故制剂制备工艺中对白花蛇舌草分别进行乙醇提取和水煎煮提取。供试品溶液制备中,以黄酮作为定性鉴别的目标成分,采用聚酰胺薄膜进行展开,分别比较了36%乙酸、18%乙酸、甲醇-水(1:1)和氯仿-甲醇(7:3)的展开效果,发现36%乙酸的分离效果最佳,斑点圆整,分离度好。

3.2 薄层鉴别的耐用性试验 考察了不同展开条件:薄层板(自制、购买)、点样方式(手动点样、自动点样仪)、展开温度(冰箱8℃、室温18~25℃)及展开湿度(相对湿度20%、75%)对展开效果的影响,发现不同薄层板、点样方式及展开湿度均不影响4个定性鉴别目标成分的分离度,但是展开温度对黄芪甲苷的分离度有一定影响,故文中限定展开剂“放置至室温”后再行展开。

3.3 指标成分的选择 纵观全方,可定量控制的化

学成分较少,黄芪为方中要药,其中所含黄芪甲苷代表性强,HPLC测定条件成熟,对其进行含量测定对于有效控制本品质量有一定参考价值,因此选择了黄芪甲苷作为含量测定的指标成分。

3.4 含量测定供试品溶液提取方法的优选 根据黄芪甲苷的性质,分别比较了甲醇超声提取和回流提取的提取效果,发现2种提取方法相差不大,选择了操作简便、提取杂质相对较少的超声提取法。超声时间分别考察了10、20、30、40、50、60 min,结果以甲醇为提取溶剂,超声处理30 min的效果较好。

3.5 含量测定色谱条件的优选 参照文献方法,采用HPLC-ELSD法测定制剂中黄芪甲苷的含量,对流动相(乙腈:水)进行了不同比例的考察,发现当二者比例为32:68时,色谱峰分离效果最佳,峰形对称,可达基线分离,且阴性对照无干扰,故选择乙腈-水(32:68)。

[参考文献]

- [1] 常新全,丁丽霞.中药活性成分分析手册[M].北京:学苑出版社,2002:699,1619,2042.
- [2] 中国药典.一部[S].2010:284,403,781.
- [3] 李磊,李志军,周玉新,等.HPLC测定排氟片中黄芪甲苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):37.
- [4] 孙健,刘泓,范斌.HPLC-ELSD法测定祝艾康胶囊中黄芪甲苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(4):60.

[责任编辑 蔡仲德]