

莲白消癌丸定性定量研究

刘雅敏*, 王晨平, 苏鹏, 李洁

(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

[摘要] 目的: 建立莲白消癌丸的质量控制方法。方法: 采用薄层色谱法对方中的人参、重楼、黄芪、半枝莲进行鉴别, 采用高效液相色谱法测定人参皂苷 Rg_1 的含量。结果: 在选定的薄层色谱条件下, 可检出人参、重楼、黄芪、半枝莲的特征斑点; 在选定的高效液相色谱条件下人参皂苷 Rg_1 同其它干扰成分达到较好的分离, 平均回收率为 99.2%, RSD 为 1.4%。结论: 所建立的方法简便、专属、重复性好, 能有效控制该制剂的质量。

[关键词] 莲白消癌丸; 薄层色谱; 高效液相色谱; 人参; 重楼; 黄芪; 半枝莲; 人参皂苷 Rg_1

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0048-03

莲白消癌丸以原剂型汤剂改为浓缩丸, 由人参、重楼、黄芪、甘草、半枝莲、蜈蚣、蛤蚧等近 20 种药材提取精制而成, 具有抗肿瘤的功效, 方中的人参、黄芪、甘草、三七、重楼等都含有皂苷类成分, 且结构相近, 给分离检测某单一皂苷成分^[1]带来干扰; 另外, 方中的许多动物药也给此制剂的质量标准的研究制定带来困难。为了控制该制剂的质量, 建立了人参、重楼、黄芪、半枝莲的薄层鉴别方法和人参皂苷 Rg_1 含量的高效液相测定方法, 为有效控制该制剂的质量提供了参考。

1 仪器与试药

岛津 LC-10AD 型高效液相色谱仪; 超声振荡仪 (KQ-500DE 型, 昆山市超声仪器有限公司); 薄层层析硅胶 G, 青岛海洋化工厂产品; 定量毛细管, 美国 Drummond 产品; 人参皂苷 Rg_1 , 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 110703-200424) 产品; 人参皂苷 Re, 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 110754-200320) 产品; 重楼对照药材, 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 121157-200402) 产品; 重楼皂苷, 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 111590-200402) 产品; 重楼皂苷, 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 111591-200402) 产品; 重楼药材, 购于郑州市药材公司; 黄芪对照药材, 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 110912-200509) 产品;

黄芪甲苷, 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 110904-200511) 产品; 野黄芩苷, 中国药品生物制品检定所(供含量测定用, 批号: 110842-200504); 莲白消癌丸(自制, 批号: 070510, 070527, 070612); 乙腈, 天津四友产品, 色谱纯; 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 人参的薄层色谱鉴别 取莲白消癌丸 10 g, 研碎, 精密称定, 石油醚 50 mL 提取 3 h, 弃石油醚液, 滤渣连同滤纸筒放入具塞锥形瓶中, 加水饱和正丁醇 50 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 取续滤液 25 mL, 用 1% NaOH 萃取 1 次(15 mL), 弃碱液, 挥干溶剂, 5 mL 70% 乙醇溶解, 上中性氧化铝柱(4 g, 内径 1 cm), 用 70% 乙醇 16 mL 洗脱, 洗脱液在 50℃ 水浴上挥干溶剂, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 作为供试品溶液^[2-3]; 另分别取处方中缺人参的其它药材, 同法制成阴性对照溶液; 取人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 对照品, 加甲醇制成每 1 mL 各含 2 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)10:1 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105℃ 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视。结果, 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, 而阴性对照无干扰。TLC 见图 1。

2.2 重楼的薄层色谱鉴别 取莲白消癌丸 10 g, 同 2.1 项下步骤得续滤液 25 mL, 用氨水萃取 1 次(15

[收稿日期] 2009-09-03

[通讯作者] * 刘雅敏, Tel: 13373959481

mL), 弃碱液, 挥干溶剂, 5 mL 40% 甲醇溶解, 上中性氧化铝柱(4 g, 内径 1 cm), 分别用 40% 甲醇 12 mL, 60% 甲醇 12 mL 洗脱, 洗脱液在 50 ℃ 水浴上挥干溶剂, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 作为供试品溶液; 另分别取处方中缺重楼的其它药材, 同法制成阴性对照溶液; 取重楼对照药材 0.5 g, 加乙醇 10 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 滤液作为重楼对照药材溶液; 取重楼皂苷对照品和重楼皂苷对照品适量, 用甲醇制成每 1 mL 各含 0.4 mg 的溶液, 作为重楼皂苷、重楼皂苷混合标准品溶液。参照药典中重楼薄层色谱法实验^[4], 吸取上述 4 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(15:5:1)的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果, 供试品色谱中, 在与对照药材和标准品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 而阴性对照无干扰。

2.3 黄芪的薄层色谱鉴别 取莲白消癌丸 10 g, 同 2.1 项下步骤, 石油醚 30 mL 提取 3 h, 残渣加水饱和和正丁醇 45 mL, 超声 30 min, 放置过夜, 取续滤液 25 mL, 50 ℃ 水浴挥干溶剂, 5 mL 甲醇溶解, 上中性氧化铝柱(4 g, 内径 1 cm), 用 40% 甲醇 15 mL 洗脱, 洗脱液在 50 ℃ 水浴上挥干溶剂, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 作为供试品溶液^[5~6]; 另分别取处方中缺黄芪的其它药材, 同法制成阴性对照溶液; 取黄芪对照药材 2 g, 加乙醇 30 mL, 加热回流 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 0.3% 氢氧化钠溶液 15 mL 使溶解, 滤过, 滤液用稀盐酸调节 pH 值至 5~6, 用乙酸乙酯 15 mL 振摇提取, 分取乙酸乙酯液, 用铺有适量无水硫酸钠的滤纸过滤, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液; 取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 4 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)的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视。结果, 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, 而阴性对照无干扰。

2.4 半枝莲的薄层色谱鉴别 取本品 10 g, 研细, 加水 40 mL 溶解, 用水饱和的正丁醇萃取 3 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇萃取液, 过滤, 取续滤液置 50 ℃ 水浴上挥干, 残渣加甲醇 5 mL 溶解, 作为供试品溶

液; 另分别取处方中缺半枝莲的其它药材, 同法制成阴性对照溶液; 取野黄芩苷对照品加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-水(20:2:1.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果, 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, 而阴性对照无干扰。

2.5 人参皂苷 Rg₁ 的含量测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为汉邦 ODS-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液采取梯度洗脱, 检测波长为 203 nm, 柱温为室温, 流速为 1.0 mL · min⁻¹。参照文献^[7~9], 通过试验研究, 确立了以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相的梯度洗脱。见表 1。

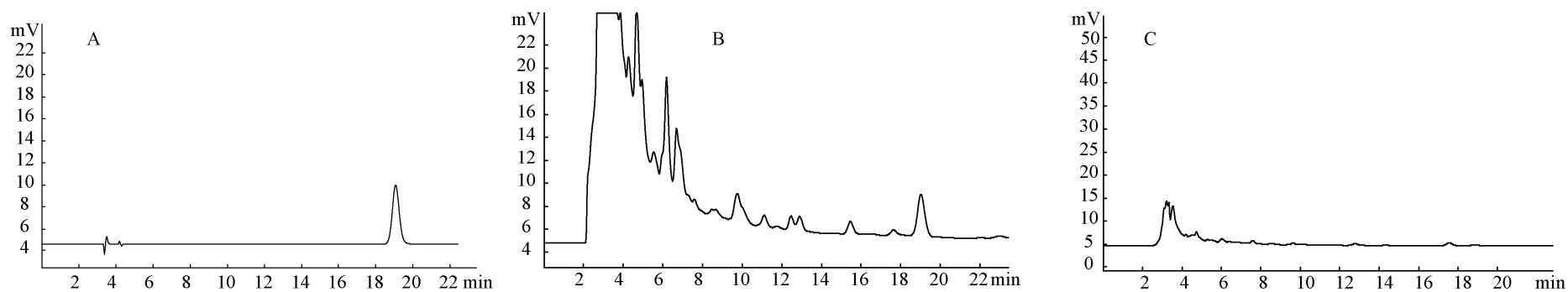
表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	乙腈 (%)	0.2% 的磷酸水 (%)
0 ~35	19	81
35 ~55	19 ~29	81 ~71
55 ~70	29	71
70 ~100	19 ~29	71 ~60

2.5.2 供试品溶液和阴性对照溶液的制备 参照文献^[7~9], 得出本试验供试品溶液的制备方法。取本品 40 丸, 研细, 取 5 g 精密称定, 石油醚 50 mL 提取 3 h, 弃石油醚液, 滤渣连同滤纸筒放入具塞锥形瓶中, 加水饱和和正丁醇 50 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 取续滤液 25 mL, 用 1% NaOH 萃取 1 次(15 mL), 弃碱液, 挥干溶剂, 5 mL 70% 乙醇溶解, 上中性氧化铝柱(4 g, 内径 1 cm), 用 70% 乙醇 100 mL 洗脱, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液。另取处方中缺人参的其它药材, 同法制成阴性对照溶液。**2.5.3 对照品溶液的制备** 精密称取人参皂苷 Rg₁ 对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.5.4 空白实验 分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定。结果, 供试品与对照品的色谱峰保留时间一致, 而阴性对照无干扰, 说明方中其它药材对人参皂苷 Rg₁ 的测定无干扰。HPLC 见图 1。

2.5.5 线性关系考察 精密称取人参皂苷 Rg₁ 对照品 17.10 mg, 用甲醇定容至 100 mL, 制成含人参皂苷 Rg₁ 0.171 0 mg · mL⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶



A. 人参皂苷 Rg₁ 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照

图 1 高效液相色谱

液。精密吸取对照品溶液 2, 8, 10, 12, 20 μL 进样。按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为: $Y = 2.93 \times 10^5 X - 3.81 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。结果表明人参皂苷 Rg₁ 在 0.342 ~ 3.42 μg 范围内进样量与峰面积具有良好的线性关系。

2.5.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积积分值。结果, RSD 为 0.96%, 表明仪器精密度良好。

2.5.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 进样 10 μL , 测定峰面积积分值。结果, RSD 为 2.6%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.5.8 重复性试验 取同一批样品 6 份, 按“2.5.2”项下方法制成供试品溶液, 按上述色谱条件测定。结果, 人参皂苷 Rg₁ 平均含量为 0.653 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.39%, 表明本法重复性良好。

2.5.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批(批号: 070510) 样品粉末各 6 份(含量为 0.653 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); 分别精密加入 0.03 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品 50 μL , 依法测定, 计算回收率, 结果表明, 本法具有良好的回收率, 见表 2。

表 2 加样回收率试验 ($n=6$)

样品中含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率	RSD (%)
1.633	1.500	3.150	101.1	99.5	1.4
1.633	1.500	3.129	99.7		
1.627	1.500	3.106	98.6		
1.631	1.500	3.091	97.3		
1.632	1.500	3.120	99.2		
1.630	1.500	3.142	100.8		

2.5.10 样品含量测定 取 3 批样品, 分别按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 并按上述色谱条件进行测定, 计算样品中人参皂苷 Rg₁ 的含量。结果 3 批样品中人参皂苷 Rg₁ 的含量分别为 0.654, 0.651, 0.653 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

因方中含有大量动物药, 脂溶性成分较多, 不仅

给人参皂苷 Rg₁ 含量测定带来干扰, 也使人参、重楼、黄芪等薄层色谱的斑点分离较差, 故本实验采用石油醚脱脂; 另外, 方中还含有人参、黄芪、重楼、甘草、三七等其有效成分为皂苷类成分的中草药, 且三七中的皂苷类成分与人参中所含的皂苷类成分结构很相近, 从而使人参的薄层鉴别和高效液相检测困难, 本实验采用中性氧化铝分离纯化, 不同洗脱液洗脱的方法来减少三七、黄芪、甘草中的皂苷类成分的相互干扰, 取得满意的结果。

在人参含量测定中, 采用梯度洗脱的方法, 并在流动相中加入磷酸, 使人参的色谱峰形良好, 基线平稳, 避免了梯度洗脱时的基线漂移。经过对莲白消癌丸中人参含量所作的一系列精密度实验, 稳定性实验, 重复性实验, 加样回收率实验以及对 3 批次的自制样品中人参皂苷 Rg₁ 的含量测定, 可得知本实验方法具有药典中采用的 HPLC 法同样的精密度高, 重复性好等特点。因此可作为生产中质量控制的检测方法。

[参考文献]

- [1] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社.
- [2] 秦海林, 赵天增, 高令杰. 人参皂甙与黄芪甲甙的薄层色谱分析[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 226.
- [3] 张玉斌, 李其凤. 参芪养生膏的质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(1): 9.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 183.
- [5] 林巧玲, 肖志勇. 乌鸡白凤颗粒中黄芪等药材的薄层鉴别方法研究[J]. 广东药学院学报, 2002, 18(3): 174.
- [6] 刘梅秀. 黄芪口服液薄层色谱鉴别法研究[J]. 时珍国医国药, 1994, 6(1): 23.
- [7] 伏东宁, 李祥永. 强心灵丸中人参皂苷 Rg₁ 和 Re 含量的高效液相色谱研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11): 1094.
- [8] 廖红娟. 人参再造丸含量测定中样品制备方法的改进[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(2): 216.
- [9] 隋金婷. HPLC 法测定乌鸡白凤丸(水蜜丸) 中人参皂甙 Rg₁、Re 的含量[J]. 黑龙江医学, 2003, 27(6): 480.