

论 著
(药学研究)

复方猕猴桃根颗粒质量标准提高的研究

汤 昊, 唐安福, 贡 磊, 龚光明

【摘要】 目的 建立复方猕猴桃根颗粒的质量控制标准。 **方法** 对制剂处方中猕猴桃根、太子参、半枝莲、椿皮共 4 味药进行薄层色谱(TLC)鉴别,同时采用高效液相色谱法(HPLC)对方中野黄芩苷进行含量测定,其中色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4%冰醋酸水溶液(35:65);检测波长为 335 nm;柱温为 35 ℃;流速为 1.0 mL/min;进样量为 10 μL。 **结果** 薄层色谱中斑点清晰,专属性强;野黄芩苷在 9.2~46.0 μg/mL 范围内有良好的线性关系,平均回收率为 101.53%(RSD=2.71%)。 **结论** 定性鉴别方法简便,重现性好,定量方法准确可靠,可作为复方猕猴桃根颗粒的质量控制标准。

【关键词】 复方猕猴桃根颗粒;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法

【中图分类号】 R927.11 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)02-0163-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.02.011

Study on improvement of quality standard of Fufang Mihoutao Granule

TANG Hao, TANG An-fu, GONG Lei, GONG Guang-ming

(Department of Pharmaceutical Preparation, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To establish the quality standard of Fufang Mihoutao Granule. **Methods** A thin layer chromatography (TLC) method was used for qualitative identification of the Radix Actinidiae Chinensis, Radix Pseudostellariae, Herba Scutellariae Barbatae, Cortex Ailanthi. The content of scutellarin was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and a mobile phase of Methanol-Glacial acetic acid (35:65). Flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 35 ℃. The detection wavelength was 335 nm and sample loop volume was 10 μL. **Results** TLC spots were clear, with strong specificity. The linear relationship of scutellarin content was good in the range of 9.2-46.0 μg/mL. The average recovery was 101.53% (RSD=2.71%). **Conclusion** The TLC method is simple and reproducible, while the quantitation method accurate and reliable. It can be used as the quality standard of Fufang Mihoutao Granule.

【Key words】 Fufang Mihoutao Granule; quality standard; TLC; HPLC

0 引言

复方猕猴桃根颗粒处方来源于东部战区总医院(原南京军区南京总医院),由猕猴桃根、白英、黄

药子等共十五味中药组成,具有清热解毒,活血散结的功效,可用于胃癌、肠癌、食道癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等。该制剂所含药味种类繁多,成分复杂,为更好地控制制剂质量,保证临床疗效^[1-2],进一步完善其质量标准^[3-5],本实验采用 TLC 鉴别法对方中猕猴桃根、太子参、半枝莲、椿皮 4 味药进行鉴别,同时采用 HPLC 法对半枝莲中野黄芩苷进行含量测定。

基金项目:全军医疗机构制剂标准提高科研专项课题(14ZJZ16-3)

作者单位:210002 南京,东部战区总医院(原南京军区南京总医院)
制剂科(汤 昊、唐安福、贡 磊、龚光明)

通信作者:龚光明, E-mail: gongspharm@126.com

1 材料与方法

1.1 仪器与试药 Waters 1525 高效液相色谱仪, DAD 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);FA1104 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ-500DE 型超声机(昆山市超声仪器有限公司);调温电热器(南通市通州申通电热器厂)。

对照药材太子参(1004-9601)、半枝莲(121293-200402)、椿皮(121481-200501)和对照品野黄芩苷(110781-200613)均购自中国食品药品检定研究院, 猕猴桃根(20070801)购自南京医药股份有限公司; 复方猕猴桃根颗粒(批号: 140925、141211、150228、160220、170212)由本科配制。

甲醇(美国天地)为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 鉴别

1.2.1.1 猕猴桃根 取颗粒, 研细后称取 30 g, 加 150 mL 乙醇, 回流 2 次, 每次 1 h, 过滤, 取滤液, 蒸干, 残渣加 30 mL 水溶解, 用 1,2-二氯乙烷振摇提取 2 次(每次 20 mL), 合并提取液, 蒸干后加 1 mL 甲醇溶解, 作为供试品溶液。另取猕猴桃根对照药材 2 g, 粉碎后加约 300 mL 水煎煮 6 h, 过滤, 滤液浓缩至 20 mL, 加 60 mL 乙醇, 静置过夜。过滤, 取滤液, 蒸干, 残渣加 30 mL 水和 150 mL 乙醇, 加热回流 2 次, 每次 1 h, 照上述供试品溶液制备方法, 制成对照药材溶液。再按处方比例称取缺猕猴桃根的处方饮片, 制备复方猕猴桃根颗粒阴性样品, 按上述供试品溶液制备方法, 制成阴性对照溶液。照薄层色谱法试验^[6], 吸取上述 3 种溶液各 20 μ L 进行点样, 展开剂为二氯甲烷-甲醇-氨水(24:4:0.4), 展开后取出, 晾干, 并喷以 5% 磷钼酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 下烘约 5 min。

1.2.1.2 太子参 取颗粒, 研细后称取 30 g, 加 150 mL 乙醇回流 2 次, 每次 1 h, 过滤, 取滤液, 蒸干, 加 50 mL 水溶解, 再加 2 mL 盐酸(pH \approx 2), 加热回流 1 h, 过滤, 取滤液, 加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 弃去石油醚, 水层用正丁醇振摇提取 3 次(每次 15 mL), 合并提取液, 蒸干, 残渣加 1 mL 甲醇溶解, 作为供试品溶液。另取太子参对照药材 1 g, 粉碎后加约 300 mL 水煎煮 4 h, 过滤, 取滤液, 浓缩至 50 mL, 加 2 mL 盐酸(pH \approx 2), 后同上述供试品溶液制备方法, 制成对照药材溶液。再按处方比例称取缺太子参的处方饮片, 制备复方猕猴桃根颗粒阴性样品, 按上述供试品溶液制备方法, 制成阴性对照溶液。照薄层色谱法试验^[6], 吸取上述 3

种溶液各 20 μ L 进行点样, 展开剂为环己烷-丙酮-乙酸乙酯(5:2:1), 展开后取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 下烘约 5 min。

1.2.1.3 半枝莲 取颗粒, 研细后称取 30 g, 加 100 mL 乙醚冷浸 12 h, 弃去乙醚, 残渣加 150 mL 甲醇回流 1 h, 过滤, 取滤液, 蒸干, 残渣加 30 mL 水溶解, 用乙酸乙酯振摇提取 3 次(每次 20 mL), 合并提取液, 蒸干, 残渣加 2 mL 甲醇溶解, 作为供试品溶液。另取半枝莲对照药材 1 g, 粉碎后加约 300 mL 水煎煮 4 h, 过滤, 滤液浓缩至 20 mL, 加 60 mL 乙醇, 放置 2 h, 过滤, 滤液挥去乙醇, 加水至 30 mL, 用乙酸乙酯振摇提取 3 次(每次 20 mL), 合并提取液, 蒸干, 残渣加 1 mL 甲醇溶解, 制成对照药材溶液。再按处方比例称取缺半枝莲的处方饮片, 制备复方猕猴桃根颗粒阴性样品, 按上述供试品溶液制备方法, 制成阴性对照溶液。照薄层色谱法试验^[6], 吸取上述 3 种溶液各 20 μ L 进行点样, 展开剂为甲苯-甲酸乙酯-甲酸(3:3:1), 展开后取出, 晾干, 喷以 2% 三氯化铁乙醇溶液。

1.2.1.4 椿皮 取颗粒, 研细后称取 60 g, 加 100 mL 乙醚, 超声处理 30 min, 过滤, 取滤液, 蒸干, 残渣加 1 mL 乙醇溶解, 作为供试品溶液。另取椿皮对照药材 2 g, 同法制成对照药材溶液。再按处方比例称取缺椿皮的处方饮片, 制备缺椿皮的阴性样品, 按上述供试品溶液制备方法, 制成阴性对照液。照薄层色谱法试验^[6], 吸取供试品溶液和阴性对照液各 15 μ L、对照药材溶液 6 μ L 进行点样, 展开剂为石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(4:1), 展开后取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。

1.2.2 含量测定

1.2.2.1 系统适用性试验 色谱柱: Kromasil 100-5 C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.4% 冰醋酸水溶液(35:65); 检测波长为 335 nm; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量为 10 μ L。

1.2.2.2 溶液的制备 对照品溶液: 精密称取适量野黄芩苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 46 μ g 的溶液, 即得。

供试品溶液: 取本品颗粒 5 g, 称定后置 100 mL 烧杯中, 加入沸水约 90 mL 使溶解, 冷却至室温, 滤过, 滤液加水定容至 100 mL, 搅匀, 即得。

阴性溶液: 取“1.2.1.3 项”下制备的阴性样品, 按上述供试品溶液制备方法, 制成阴性对照液。

1.2.2.3 方法学考察 专属性试验: 精密吸取上述“1.2.2.2 项”下 3 种溶液各 10 μ L, 按“1.2.2.1 项”下法进样测定。

野黄芩苷线性关系考察:精密吸取“1.2.2.2 项”下制备的对照品溶液 8 mL、6 mL、5 mL、4 mL 和 2 mL 至 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,制成浓度分别为 46.0、36.8、27.6、23.0、18.4、9.2 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,各吸取 10 μL ,按“1.2.2.1 项”下色谱条件进样测定,以浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,并计算回归方程。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液 10 μL ,按“1.2.2.1 项”下色谱条件连续进样 5 次,记录野黄芩苷峰面积积分值,并计算野黄芩苷峰面积的 RSD。

稳定性试验:取同一批号(批号:150228)下的样品,分别于 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 12 h,按“1.2.2.1 项”下色谱条件测定,记录野黄芩苷峰面积积分值,并计算野黄芩苷峰面积 RSD。

重复性试验:取同一批号(批号:150228)下的样品 6 份,按“1.2.2.2 项”下方法制成供试品溶液,进样测定,记录野黄芩苷峰面积积分值,并计算其含量及 RSD。

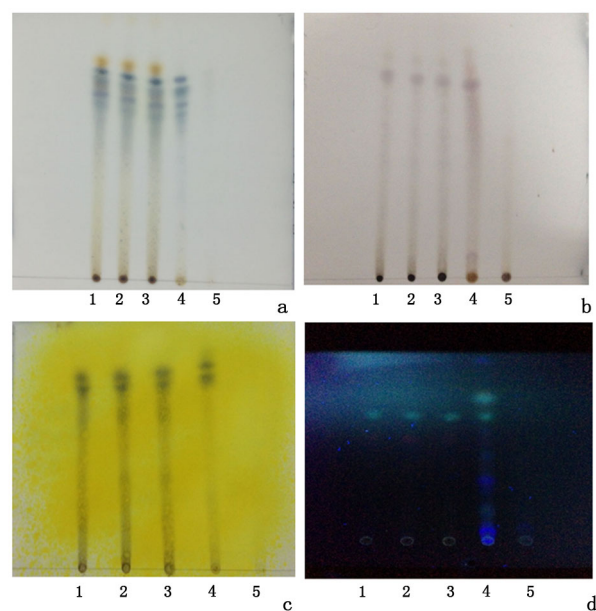
加样回收率试验:精密称取野黄芩苷对照品 22.6 mg,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得浓度为 226 $\mu\text{g/mL}$ 对照品储备液。精密称取已知含量的复方猕猴桃根颗粒(批号:150228,野黄芩苷含量为 0.5256 mg/g)粉末 9 份,每份 2.5 g,分成 3 组,分别精密加入上述对照品储备液 4.50、6.00、7.00 mL,按“1.2.2.2 项”下方法制成供试品溶液,进样测定,记录峰面积,并计算回收率。

1.2.3 样品含量测定 取 3 批复方猕猴桃根颗粒(批号分别为 150228、160220、170212),按上述供试品溶液制备方法及色谱条件进行测定。

2 结 果

2.1 薄层色谱鉴别 供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点或荧光斑点。见图 1。

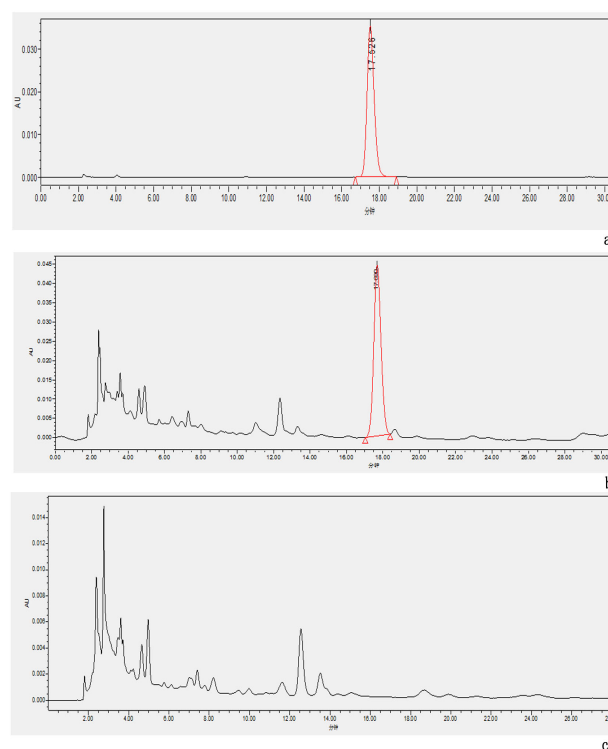
2.2 含量测定 经方法专属性试验结果表明,在与对照品色谱相应保留时间处,有同一色谱峰,而阴性对照溶液则无峰出现,表明无干扰成分,见图 2。野黄芩苷线性回归方程为 $Y=26509X - 41058$ ($r=0.9993$),表明野黄芩苷的浓度在 9.2~46.0 $\mu\text{g/mL}$,与峰面积呈良好的线性关系。精密度试验示野黄芩苷峰面积的 RSD 为 0.35%,表明该方法的精密度良好。稳定性试验示野黄芩苷峰面积 RSD 为 0.67%,表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。重复性试验测得野黄芩苷含量的 RSD 为 2.39%,表明方法重复性良好。加样回收率试验示平均回收率为 101.53%,RSD 为 2.71%,见表 1。



a: 猕猴桃根; b: 太子参; c: 半枝莲; d: 椿皮

1~3: 复方猕猴桃根颗粒(批号分别为: 140925、141211、150228); 4: 对照药材; 5: 阴性对照液

图 1 各试药的薄层色谱图



a: 野黄芩苷对照品; b: 复方猕猴桃根颗粒; c: 阴性样品

图 2 野黄芩苷方法专属性试验

2.3 样品含量测定 3 批样品(批号 150228、160220、170212)中野黄芩苷平均含量分别为 0.51、0.45、0.49 mg/g。

表 1 野黄芩苷加样回收率试验结果(n=9)

取样量(g)	样品含量 (mg)	对照品加 入量(mg)	实测含量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
2.54	1.3360	1.0170	2.3647	101.15		
2.53	1.3308	1.0170	2.3877	103.92		
2.55	1.3413	1.0170	2.3926	103.37		
2.52	1.3255	1.3560	2.7349	103.94		
2.53	1.3308	1.3560	2.7343	103.51	101.53	2.71
2.54	1.3360	1.3560	2.7284	102.68		
2.51	1.3203	1.5820	2.8389	96.00		
2.51	1.3203	1.5820	2.8790	98.53		
2.52	1.3255	1.5820	2.9184	100.69		

3 讨 论

3.1 含量测定指标的选择 处方中半边莲、椿皮、南沙参 3 味药材在 2015 年版《中国药典》中并无含量测定项的要求规定;而猕猴桃根、白英、白花蛇舌草、山海螺、猪殃殃、黄药子 6 味药均为《现代中药学大辞典》收录品种^[7],故目前尚无相关质量标准,文献资料表明,猕猴桃根^[8-9]、白英^[10]、白花蛇舌草^[11-13]等多味药中均含有熊果酸、齐墩果酸等化合物,白英、白花蛇舌草等多味药材中均含有槲皮素等黄酮类化合物,而皂苷、绿原酸等化合物在方中众多药材中均存在^[14-17],故均不适合作为定量指标。同时,课题组前期实验研究表明,山豆根所含苦参碱和氧化苦参碱、薏苡仁所含甘油三油酸酯、太子参所含太子参环肽 B 等或因含量太低、或因提取工艺等因素,在制剂中均未检测出,亦无法作为定量指标。

而方中半枝莲具有清热解毒、化瘀利尿的功效,临床常用于治疗疔疮肿毒、咽喉肿痛、黄疸、水肿和蛇虫咬伤等。现代药理学研究表明,半枝莲抗肿瘤活性良好,与其他中药复方联合,对原发性肝癌、消化道肿瘤、肺癌和宫颈癌等妇科多种肿瘤,具有良好的治疗作用^[18]。黄酮类化合物是半枝莲中主要的有效成分,含量最多的为野黄芩苷^[19]。2015 年版《中国药典》一部收录的半枝莲质量控制中,通过总黄酮及野黄芩苷的含量来评价。故本实验选择处方中半枝莲所含野黄芩苷作为复方猕猴桃根颗粒的质量控制指标。

3.2 流动相的选择 根据文献研究和实验考察,流动相选择甲醇-0.4%/冰醋酸水溶液比例为 35:65 时,色谱峰有较好的分离度,且峰型良好,故确定流动相为甲醇-0.4%/冰醋酸水溶液(35:65)。

本实验建立的猕猴桃根、太子参、半枝莲、椿皮

的薄层色谱鉴别方法以及野黄芩苷高效液相色谱测定含量的方法,结果表明方法稳定可靠,可用于复方猕猴桃根颗粒的质量控制。

[参考文献]

- [1] 唐安福,苏倩雯,贡 磊,等. HPLC 法测定儿肾康丸中特女贞苷含量[J]. 东南国防医药,2017,19(1):13-15.
- [2] 崔恩忠,陈美惠,贡 磊,等. 寒痹丸质量标准的研究[J]. 东南国防医药,2016,18(3):281-283.
- [3] 王 闯,孟 慧,许 勇. 复方甘草软膏的制备及含量测定法德建立[J]. 东南国防医药,2015,17(4):389-392.
- [4] 崔恩忠,唐安福,刘文雅,等. 高效液相色谱法测定益肾丸中特女贞苷的含量[J]. 医学研究生学报,2015,28(1):79-81.
- [5] 于 森,原 源. HPLC 法测定益心酮片中四种黄酮类成分的含量[J]. 东南国防医药,2015,17(2):157-165.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版)四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:7-8.
- [7] 宋立人,洪 恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:83,185,286,719,1904,1997.
- [8] 陈晓晓,杨尚军,白少岩. 中华猕猴桃根化学成分研究[J]. 中草药,2011,42(5):841-843.
- [9] 邱 学,王海波,翟延君,等. HPLC 法测定猕猴桃根中熊果酸、齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):66-68.
- [10] 王文昌,胡德禹,杨 松. 白英化学成分及生物活性研究进展[J]. 广州化工,2011,39(9):3-5.
- [11] 梁 洁,柳贤福,孙正伊,等. HPLC 测定白花蛇舌草配方颗粒中槲皮素和山柰素含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):149-151.
- [12] 张 瑜,谈献和,崔小兵,等. HPLC 法测定不同产地白花蛇舌草中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(4):274-276.
- [13] 石金敏,高家荣,贾 陆,等. 清肾颗粒中白花蛇舌草的质量标准控制[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(1):63-65.
- [14] 陈 燕,刘倩伶,德 吉,等. 藏药材猪殃殃质量标准研究[J]. 中国民族医药杂志,2009,5(5):40-42.
- [15] 任启生,余雄英,宋新荣,等. 山海螺化学成分研究[J]. 中草药,2005,36(12):1773-1775.
- [16] 余雄英,任启生,宋新荣. 山海螺挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国中药杂志,2003,28(5):467-468.
- [17] 李德斌,黄志芳,刘云华,等. 黄药子质量标准研究[J]. 中成药,2014,36(5):1037-1040.
- [18] 何福根,章红燕,沈 斌. 半枝莲抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 中国肿瘤,2008,17(2):108-113.
- [19] 杨连梅,刘 量,胡 荣,等. 半枝莲化学成分的提取和含量测定方法研究[J]. 江苏中医药,2010,42(2):78-79.

(收稿日期:2018-05-22; 修回日期:2018-11-09)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)