

清肝化瘀方质量标准研究

吴桐¹ 张巧丽² 姚树坤³

(1 首都医科大学附属北京地坛医院,北京,100015; 2 北京市和平里医院,北京,100013; 3 中日友好医院,北京,100029)

摘要 目的:建立清肝化瘀颗粒的质量控制方法。方法:采用薄层色谱法,鉴别黄芩、苦参、半枝莲、莪术等组成药物;采用高效液相色谱法测定方中君药黄芩、苦参的主要成分黄芩苷及苦参碱的含量。结果:确立了颗粒中黄芩、苦参、莪术、半枝莲的薄层色谱鉴别方法。在选定的高效液相色谱条件下,建立了本颗粒中黄芩苷、苦参碱的测定方法,其方法学均符合药典要求。结论:本实验建立的鉴别和含量测定方法简便、准确、重复性好,适用于本颗粒质量的控制。

关键词 清肝化瘀颗粒;薄层鉴别;黄芩苷;苦参碱;质量标准

Study on Quality Standard of Qinggan Huayu Granule

Wu Tong¹, Zhang Qiaoli², Yao Shukun³

(1 Beijing Ditan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2 Beijing Hepingli Hospital, Beijing 100013, China; 3 China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To establish a quality-control method for Qinggan Huayu Granule. **Methods:** TLC (Thin Layer Chromatography) was adopted to identify Radix Scutellariae, Radix Sophorae Flavescentis, Scutellaria barbata, zedoary etc. The main content of baicalin and matrine in the principal drug Radix Scutellariae, Radix Sophorae Flavescentis are determined by HPLC (high performance liquid chromatography) method. **Results:** Identification method of the TLC about Radix Scutellariae, Radix Sophorae Flavescentis, Scutellaria barbata, zedoary etc in granules was established. Under the selected conditions of HPLC, an identification method for baicalin and matrine in granules was established and the methodology complies with the requirements of Chinese Pharmacopeia. **Conclusion:** The identification and quantitative determination method is simple, accurate and reproducible, which can be applied to the quality control of Qinggan Huayu Granule.

Key Words Qinggan Huayu Granule; TLC; Baicalin; Matrine; Quality standard

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.10.046

清肝化瘀方由黄芩、苦参、白术、半枝莲、白花蛇舌草、莪术、三棱、甘草等 8 味中药组成,是姚树坤教授治疗原发性肝癌的临床有效经验方,临床应用具有二十余年历史。该方具有清热解毒、健脾祛湿、活血化瘀、软坚消癥等功效,前期临床研究及动物实验表明该方适用于绝大多数原发性肝癌患者,具有多环节、多靶点的作用特点,能提高患者免疫功能,延长生存期,改善生命质量^[1-7]。为保证原方的临床疗效及方便患者服用,对原方进行工艺优化制成颗粒剂,并建立其质量控制方法,本实验采用薄层色谱法对方中黄芩、苦参、半枝莲、三棱进行定性研究,采用高效液相色谱法测定方中君药黄芩、苦参的主要有效成分,包括黄芩苷及苦参碱。为严格控制清肝化

瘀颗粒的质量提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);AL204 电子分析天平(德国梅特勒-托利多公司);YB-1A 型真空恒温干燥箱(天津鑫洲科技有限公司);电子恒温水浴锅(北京永光明医疗仪器厂);调温电热套(北京永光明医疗仪器厂)

1.2 试剂 甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),超纯水。

1.3 分析样品 黄芩对照药材(批号:120955-201309),苦参对照药材(批号:121019-201006),半枝莲对照药材(批号:121293-201003),三棱对照药

基金项目:国家重大新药创制专项课题(2012ZX09103201-021)——清肝化瘀胶囊治疗原发性肝癌的候选药物研究

作者简介:吴桐(1982.02—),男,博士,主治医师,研究方向:中西医结合防治肝病研究,E-mail:wut1982@126.com

通信作者:姚树坤(1957.11—),男,博士,教授,博士研究生导师,中日友好医院副院长,研究方向:中西医结合防治消化病研究,E-mail:yaoshukun6@aliyun.com

材(批号:121521-201103),黄芩苷对照品(批号:110842-201207);黄芩素对照品(批号:111595-201306),汉黄芩素对照品(批号:111514-200403),苦参碱对照品(批号:110805-200508)均购于中国食品药品检定研究院。清肝化瘀颗粒(7.5 g/袋,中日友好医院药学部制剂室制备,批号 2014003,2014004,2014005)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 黄芩薄层鉴别^[8] 取3批颗粒各5 g,加乙酸乙酯—甲醇(3:1)40 mL,超声30 min,过滤。将滤液置水浴上挥干,残渣加5 mL 甲醇溶解,作为供试液;另分别取处方中缺黄芩的其他药材,同法制成阴性对照溶液;取黄芩标准药材1 g,同法制成对照药材溶液;取汉黄芩素、黄芩素、黄芩苷对照品,加甲醇制成对照品溶液,浓度均为1 mg/mL。分别吸取上述8种溶液,各5 μ L,点于同一聚酰胺薄膜上,以甲苯—乙酸乙酯—甲醇—甲酸(10:3:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示供试品色谱中,在与标准药材、对照品色谱相对应的位置上,紫外光灯(365 nm)下显相同颜色的斑点,而阴性对照无干扰。见图1。

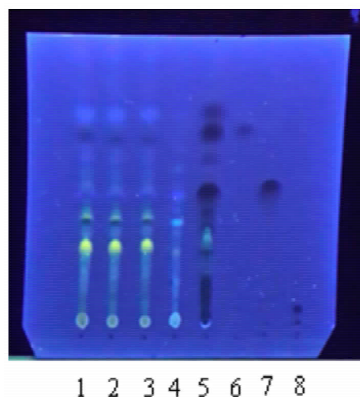


图1 黄芩薄层色谱

注:1~3 供试品;4 阴性对照;5 黄芩对照药材;6 汉黄芩素;7 黄芩素;8 黄芩苷

2.1.2 苦参薄层鉴别 取3批颗粒各3 g,放入具塞锥形瓶中,加入氨水5 mL,浸泡5 min,加氯仿30 mL 超声30 min,过滤。取滤液置水浴上挥干,残渣加2 mL 甲醇溶解,作为供试液;另分别取处方中缺苦参的其他药材,同法制成阴性对照溶液;取苦参标准药材1 g,同法制成对照药材溶液;取苦参碱对照品加甲醇制成每1 mL 含1 mg 的溶液,作为对照品溶液。分别吸取上述6种溶液各5 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯—丙酮—甲醇(8:3:0.5)为

展开剂,展开,取出,晾干,喷以碘化铋钾溶液显色。结果显示供试品色谱中,在与对照药材、对照品色谱相对应的位置上,显相同颜色的斑点,而阴性对照无干扰。见图2。

2.1.3 半枝莲薄层鉴别 取3批颗粒各5 g,研细,加水40 mL 溶解,用水饱和的正丁醇萃取3次,40 mL/次,合并正丁醇萃取液,过滤,取续滤液置50 $^{\circ}$ C 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他药材,同法制成阴性对照溶液;取1 g 半枝莲标准药材同法制成对照药材溶液。分别吸取上述5种溶液各5 μ L,点于同一硅胶H薄层板上,以甲苯—甲酸乙酯—甲酸(3:3:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 $AlCl_3$ 溶液,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示供试品色谱中,在与对照药材色谱相对应的位置上,显相同荧光斑点,而阴性对照无干扰。结果见图3。

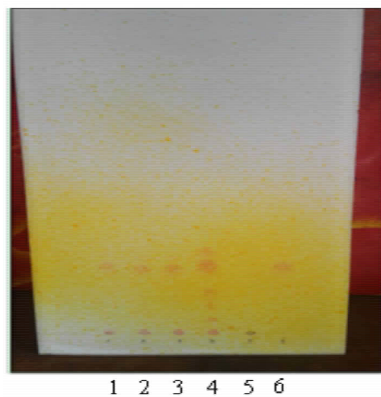


图2 苦参薄层色谱

注:1~3 供试品;4 苦参对照药材;5 阴性对照;6 苦参碱对照品

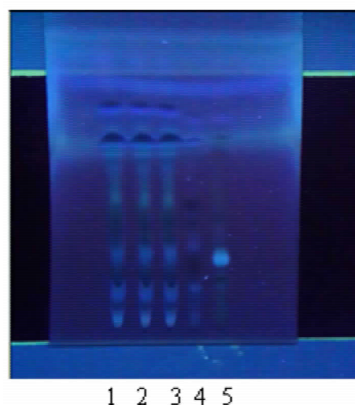


图3 半枝莲薄层色谱

注:1~3 颗粒;4 阴性对照;5 对照药材

2.1.4 三棱薄层鉴别 取3批颗粒各5 g,加乙醇30 mL,加热回流1 h。滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇2 mL 使溶解,作为供试品溶液。分别取处方中缺三

棱的其他药材,同法制成阴性对照溶液,取三棱标准药材 1 g,同法制成对照药材溶液。分别吸取上述 5 种溶液各 10 μL,点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90℃)—乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示供试品色谱中,在与对照药材色谱相对应的位置上,显相同荧光斑点,而阴性对照无干扰^[8]。见图 4。

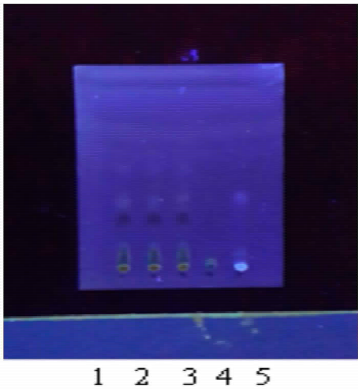


图 4 三棱薄层色谱

注:1~3 颗粒;4 阴性对照;5 对照药材

2.2 黄芩苷含量测定

2.2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇—水—磷酸(43:57:0.2);检测波长:280 nm;流速:1 mL/min;进样量:10 μL;柱温:28℃。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取黄芩苷对照品(8.0 mg)置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解,定容至 10 mL,摇匀,备用(每 1 mL 中含黄芩苷 8.0 mg)。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称取颗粒 0.5 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入 75% 甲醇溶剂 50 mL,密塞,称定重量,超声 30 min,放置至室温,予 75% 甲醇补足失去重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 专属性试验 按处方量精密称取除黄芩以外的 7 味药材,以各提取工艺及成型工艺制成颗粒,精密称取该颗粒 0.5 g,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 75% 甲醇溶剂 50 mL,密塞,称定重量,超声 30 min,放置至室温,予 75% 甲醇补足失去重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得阴性对照溶液。分别精密吸取供试品、阴性对照及黄芩苷对照品溶液各 10 μL,按以上色谱条件检测,结果显示供试品与黄芩苷对照品色谱峰保留时间一致,阴性无干扰。见图 5。

2.2.5 线性关系考察 取上述对照品溶液以 2、4、

6、8、10、12 μL 按黄芩苷测定色谱条件检测,以黄芩苷含量为横坐标,峰面积值为纵坐标,得回归方程 $y = 2\,322x + 386.26$, $r = 0.999\,5$,表明黄芩苷在 1.6~9.6 μg 范围内进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 中间精密度试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液,重复进样 6 次,峰面积 $RSD = 0.43\%$,表明精密度试验符合要求。

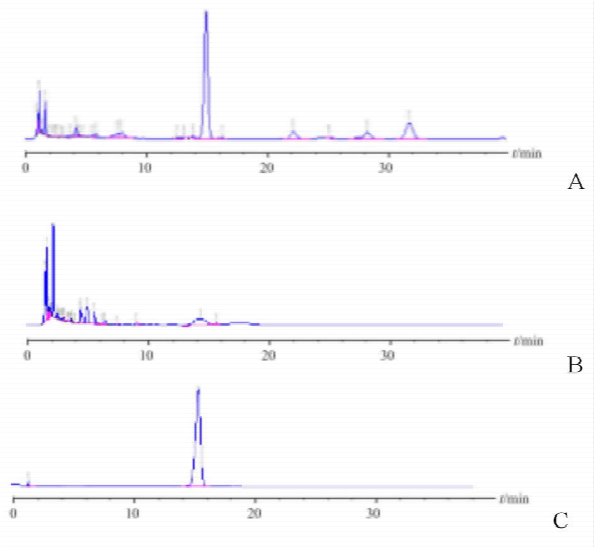


图 5 清肝化瘀颗粒中黄芩高效液相色谱

注:A 供试品;B 阴性对照;C 黄芩苷对照品

2.2.7 供试品溶液稳定性试验 制备供试品溶液,于室温中放置,测 1 次/h,共 8 h, $RSD = 0.12\%$,表明样品在 8 h 内稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一批颗粒(批号:2014003),分别称取颗粒 0.5 g,6 次,按供试品溶液制备方法制备溶液,测得黄芩苷的峰面积并计算其含量,平均值为 43.71 mg/g, $RSD = 0.61\%$,该方法的重复性分析符合要求。

2.2.9 回收率试验 精密量取已知含量的供试品溶液 1 mL,共 6 份,置 10 mL 量瓶中,分别精密加入对照品溶液 1 mL,加 75% 甲醇稀释并定容,依法测定。见表 1。

表 1 黄芩苷回收率试验

序号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	实际测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.455	0.8	1.225	96.25	96.88	0.71
2	0.455	0.8	1.235	97.50		
3	0.455	0.8	1.225	96.25		
4	0.455	0.8	1.235	97.50		
5	0.455	0.8	1.235	97.50		
6	0.455	0.8	1.225	96.25		

2.2.10 样品测定结果 取 3 批清肝化瘀颗粒,按 2.2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条

件测定,计算样品黄芩中黄芩苷的含量分别为324.15、329.25、327.00 mg/袋。

2.3 苦参碱含量测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:有机相甲醇-乙腈(1:1);水相,0.1%氨水溶液;梯度洗脱程序:有机相,0~40 min(10%~60%),40~41 min(60%~10%),41~50 min(10%);流速为1.0 mL/min;柱温为30℃;检测波长为210 nm;进样量为10 μL。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取苦参碱对照品(0.55 mg)置于100 mL量瓶中,用甲醇溶解,定容至100 mL,摇匀,备用(每1 mL中含苦参碱0.055 mg)。

2.3.3 供试品溶液制备 精密称取本品颗粒0.5 g,置100 mL锥形瓶中,加入甲醇溶剂50 mL,密塞,称定重量,超声30 min,放置至室温,予甲醇补足失去重量,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 专属性试验 按处方量精密称取除苦参以外的7味药材,以各提取工艺及成型工艺制成颗粒,精密称取本品颗粒0.5 g,置100 mL锥形瓶中,加入甲醇溶剂50 mL,密塞,称定重量,超声30 min,放置至室温,予甲醇补足失去重量,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得阴性对照溶液。分别精密吸取供试品、阴性对照及苦参碱对照品溶液各10 μL,按以上色谱条件检测,结果显示供试品与苦参碱对照品色谱峰保留时间一致,阴性无干扰。见图6。

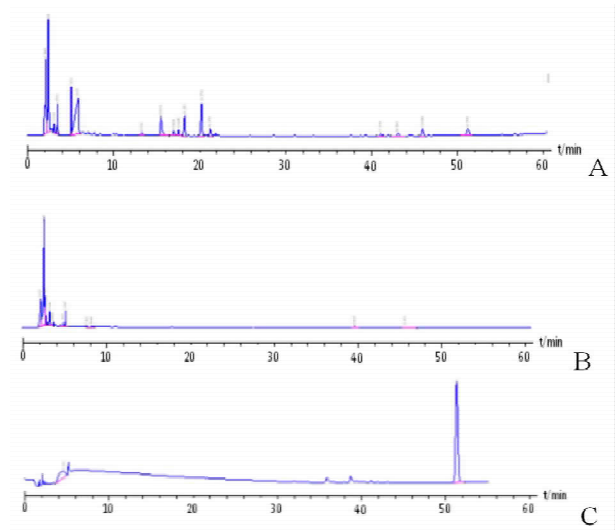


图6 清肝化癥颗粒中苦参高效液相色谱
注:A 供试品;B 阴性对照;C 苦参碱对照品

2.3.5 线性关系考察 取上述对照品溶液以2、4、6、8、10、12 μL按5.1项下色谱条件检测,记录峰面积,以苦参碱含量为横坐标,峰面积值为纵坐标,得

回归方程 $y = 2\,411.6x - 14.887$, $r = 0.999\,5$,表明苦参碱在0.11~0.66 μg范围内进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.6 中间精密度试验 精密吸取苦参碱对照品溶液,重复进样6次,峰面积 $RSD = 0.09\%$,表明精密度试验符合要求。

2.3.7 供试品溶液稳定性试验 制备供试品溶液,于室温中放置,测1次/h,共8 h, $RSD = 2.31\%$,表明样品在8 h内稳定。

2.3.8 重复性试验 取同一批颗粒(批号:2014003),分别称取颗粒0.5 g 6次,按供试品溶液制备方法制备溶液,测得苦参碱的峰面积并计算其含量,平均值为3.50 mg/g, $RSD = 2.20\%$,该方法的重复性分析符合要求。

2.3.9 回收率试验 精密量取已知含量的供试品溶液1 mL,共6份,置10 mL量瓶中,分别精密加入对照品溶液1 mL,加75%甲醇稀释并定容,依法测定。见表2。

表2 苦参碱回收率试验						
序号	样品含量 (μg)	加入量 (μg)	实际测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	35.0	51.0	85.5	99.02	99.84	1.45
2	35.0	51.0	86.0	100.00		
3	35.0	51.0	85.5	99.02		
4	35.0	51.0	87.0	101.96		
5	35.0	51.0	86.5	100.98		
6	35.0	51.0	85.0	98.04		

2.3.10 样品测定测定 取3批清肝化癥颗粒,按2.2.2.3项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算样品苦参中苦参碱的含量分别为26.86、25.52、26.43 mg/袋。

3 讨论

3.1 薄层鉴别条件筛选 黄芩、三棱的薄层鉴别方法主要参照《中华人民共和国药典》(2010版)(以下简称《药典》)中黄芩、三棱项下方法,各斑点显示清晰,重现性好,操作简易。苦参薄层鉴别采用药典方法时苦参碱斑点显示不清晰,耗时较长,工艺复杂,经参考相关文献^[9-13],采取本文中方法,其展开系统样品的相容性、分离效果均较好,R_f值适中,薄层板对应部位苦参碱斑点清晰,呈红棕色,阴性无干扰,该鉴别条件简单易行,重现性好。半枝莲^[14-15]采用本文方法斑点清晰,可有效鉴别。白术、莪术、白花蛇舌草、甘草4味中药经《药典》(2010版)及其他文献方法,鉴别结果欠佳,背景通道干扰明显,斑点未能清晰分离,该4味中药薄层色谱尚在进一步研

究中。

3.2 含量测定研究 方中君药为黄芩、苦参,两药均具有清热解毒祛湿的功效,与病机相符,其主要成分分别为黄芩苷、苦参碱,本研究主要测定两者的含量。黄芩苷含量测定时,首先选用《药典》高效液相色谱法进行测定,即流动相:甲醇—水—磷酸(47:53:0.2),检测波长:280 nm,流速:1 mL/min,进样量:10 μ L,由于复方中成分复杂,结果显示黄芩苷色谱峰与其他峰有部分重叠,为减少其他峰的干扰,经文献研究^[16-23],调整流动比较例为甲醇—水—磷酸(43:57:0.2),其他条件不变,所得结果黄芩苷色谱峰峰型对称,与杂质峰分离度良好,系统适用性考察符合要求,阴性样品无干扰。苦参碱含量测定时^[24-30],试验考察了甲醇-水,乙腈-水,甲醇-0.1%氨水,乙腈-0.1%氨水等不同的流动相体系,苦参碱分离不理想,最终选择流动相:有机相:甲醇-乙腈(1:1),水相:0.1%氨水溶液,梯度洗脱程序:有机相,0~40 min(10%~60%),40~41 min(60%~10%),41~50 min(10%),流速为1.0 mL/min,柱温为30℃,检测波长为210 nm,进样量为20 μ L,结果显示苦参碱峰型及分离度均较好,经相关方法学考察各指标均符合药典要求,且阴性对照无干扰,可满足清肝化瘀颗粒苦参碱含量测定。

本研究对清肝化瘀颗粒中黄芩、苦参、半枝莲、三棱4味中药进行了定性鉴别,所选方法简单易行,重现性好,阴性对照无干扰;对方中君药黄芩、苦参的主要有效成分进行了含量测定,其方法学均符合《药典》要求,所建立方法可用于清肝化瘀颗粒的质量标准控制。

参考文献

- [1] 姚树坤,殷飞,王娜.清肝化瘀方药对原发性肝癌患者的疗效及对细胞免疫功能的影响[J].临床荟萃,2006,21(18):1300-1302.
- [2] 王永中,姚树坤,李智岗,等.清肝化瘀口服液对肝细胞癌介入治疗后血管内皮生长因子及环氧合酶2表达的影响[J].临床荟萃,2010,25(22):1951-1954,1958.
- [3] 王永中,姚树坤,高立明,等.清肝化瘀口服液对原发性肝癌介入治疗后免疫功能影响的临床研究[J].中国老年学杂志,2008,28(8):770-772.
- [4] 殷飞,姚树坤,吴新满,等.清肝化瘀方对大鼠肝癌血管形成的影响[J].中药药理与临床,2005,21(1):29-32.
- [5] 贺云妹,殷飞,姚树坤.清肝化瘀方药含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞基因组学影响[J].北京中医药大学学报,2011,34(12):843-846.
- [6] 杨志云,姚树坤,殷飞,等.清肝化瘀方对大鼠肝癌前病变模型 Notch 信号系统的影响[J].中医杂志,2006,47(12):933-935.
- [7] 杨志云,姚树坤,殷飞,等.清肝化瘀方药对大鼠肝癌前病变中卵圆细胞表型的影响[J].癌变·畸变·突变,2006,18(6):450-

454.

- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- [9] 杜华碧,王叶茗.三白草洗剂质量标准研究[J].亚太传统医药,2014,10(3):33-36.
- [10] 李万红.宁心胶囊薄层色谱鉴别[J].中国中医药信息杂志,2010,17(8):40-41.
- [11] 谈静,芳芳,曾倩,等.妇康洗剂质量标准研究[J].中药与临床,2014,5(2):48-52.
- [12] 陈锡钦,黄荣,刘怡,等.两种含苦参中成药中主要黄酮类成分定性鉴别方法研究[J].亚太传统医药,2015,11(20):34-37.
- [13] 何绍映,覃志高.对苦参片薄层鉴别若干问题探讨[J].亚太传统医药,2016,12(15):47-48.
- [14] 刘雅敏,王晨平,苏鹏,等.莲白消癌丸定性定量研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):48-50.
- [15] 张淑瑜,徐建江,于燕莉,等.复方汉防己颗粒中野黄芩苷的定性鉴别和含量测定[J].药学实践杂志,2016,34(3):245-248.
- [16] 杨志军,杨秀娟,耿广琴,等.HPLC 同时测定甘肃不同产地黄芩及不同炮制品中黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素的含量[J].中医研究,2015,28(9):72-75.
- [17] 张小波.芙蓉散质量标准的建立[J].中国中西医结合外科杂志,2015,21(5):485-488.
- [18] 孙芳,景霞,朱明娟.HPLC 法测定抗 601 合剂中黄芩苷的含量[J].中国药师,2015,18(12):2180-2182.
- [19] 冯春景,侯佳宁,刘毓阳,等.HPLC 法同时测定肝血管瘤活血胶囊中栀子苷和黄芩苷的含量[J].中国药师,2016,19(4):772-774.
- [20] 孙艳涛.HPLC 双波长法同时测定消石利胆胶囊中芍药苷、橙皮苷、黄芩苷和大黄酚的含量[J].中国药师,2016,19(4):801-803.
- [21] 陈旭,田明.柴胡桂姜颗粒中黄芩苷含量测定方法研究[J].中国执业药师,2016,13(11):27-30.
- [22] 郗洋,张照洁,刘晓红,等.HPLC 同时测定清胃黄连丸 5 种有效成分的含量[J].中药材,2016,39(6):1347-1349.
- [23] 张松涛.HPLC 法测定石黄清火丸中黄芩苷的含量[J].中医临床研究,2016,8(1):32-33.
- [24] 张智军,崔华,马久太.HPLC 法测定肤疾洗剂中苦参碱的含量[J].世界中医药,2012,7(5):457-459.
- [25] 赵凤春,李浩,陈两绵,等.苦参提取物的质量标准研究[J].中国中药杂志,2015,40(2):245-250.
- [26] 周俊,彭翠香,范茜茜,等.益母妇宁胶囊中苦参碱、氧化苦参碱的含量测定[J].湖北中医药大学学报,2015,17(3):32-35.
- [27] 牛天增,乔玉峰,李明花,等.苦参及其制剂中生物碱成分测定方法研究进展[J].亚太传统医药,2015,11(19):56-59.
- [28] 张为,谭璐,张广求,等.高效液相色谱法同时测定参菊洗剂中苦参碱和蛇床子素的含量[J].西北药学杂志,2016,31(1):40-42.
- [29] 黄正德,林如文,刘小平.高效液相色谱法测定苦参碱醇质体温敏凝胶中苦参碱含量[J].医药导报,2016,35(5):521-523.
- [30] 薛建文,林华,黄兴振.高效液相色谱法同时测定口疳吹药中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J].中国药物经济学,2016,11(4):20-22.