

狼疮合剂的质量控制研究

车晓平¹ 王天园² 王 宏² 韩旭阳² 彭 冰² 曾祖平²

(1 首都医科大学附属北京中医医院药学部,北京,100010; 2 北京市中医研究所中药室,北京,100010)

摘要 目的:建立狼疮合剂的质量控制标准。方法:对狼疮合剂中淫羊藿、鸡血藤、黄芪、白术进行薄层色谱法定性鉴别,对君药秦艽含有的龙胆苦苷进行高效液相色谱法含量测定。结果:薄层色谱图特征斑点清晰、分离较好,阴性对照无干扰;龙胆苦苷在 0.202 5~3.24 μg 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系,平均加样回收率为 102.56%, $RSD=1.57\%$ ($n=6$),3 批狼疮合剂中龙胆苦苷平均含量为 1.70 mg/mL。结论:本法准确、灵敏,重复性好,为狼疮合剂的质量控制提供了依据。

关键词 狼疮合剂;龙胆苦苷;高效液相色谱法;薄层色谱法

Study on Quality Control of Lupus Mixture

Che Xiaoping¹, Wang Tianyuan², Wang Hong², Han Xuyang², Peng Bing², Zeng Zuping²

(1 Department of Pharmacy, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China;

2 Department of Materia Medica, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To establish quality control standards of lupus mixture. **Methods:** Herba Epimedii, Caulis Spatholobi, Radix Astragali seu Hedysari, Rhizoma Atractylodis Macrocephalae of lupus mixture were identified by TLC (Thin-Layer Chromatography). Gentiopicroside of lupus mixture was determined by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). **Results:** Characteristics of TLC spots were clear with better separation, and negative control had no interference. It was linear in the range of 0.202 5-3.24 μg , and the rate of average recovery was 102.56% with RSD of 1.57% ($n=6$) for Gentiopicroside. Average concentrations of Gentiopicroside in three batches of Lupus mixture were 1.70 mg/mL. **Conclusion:** The method is accurate, delicacy and reproducible, providing a basis for quality control of lupus mixture.

Key Words Lupus mixture; Gentiopicroside; High performance liquid chromatography; Thin-layer chromatography

中图分类号:R283 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.01.015

系统性红斑狼疮是自身免疫介导的、累及全身各个系统,以免疫性炎症反应为突出表现的弥漫性结缔组织病^[1],《中药新药临床研究指导原则》将系统性红斑狼疮分为热毒炽盛、阴虚内热、瘀热痹阻、风湿热痹、脾肾阳虚、肝肾阴虚、气血两虚等 7 个证型^[2],中医临床根据患者病情辨证治疗。狼疮合剂为首都医科大学附属北京中医医院院内制剂,由黄芪、秦艽、党参等 11 味中药组成,功效为健脾益肾、活血解毒通络,用于脾肾两虚引起的红斑狼疮,有较好的疗效。

狼疮合剂的原质量标准仅对黄芪进行了薄层色谱鉴别,为了保障临床用药的安全性和有效性。本研究采用薄层色谱法建立了鸡血藤、白术、淫羊藿、黄芪的定性鉴别标准,并对君药秦艽含有的龙胆苦苷进行高效液相色谱法含量测定。

1 材料

1.1 仪器 GT10-1 高速离心机(北京时代北利离心机有限公司),H. H. S21.4 电热恒温水浴锅(上海医疗器械三厂),XS205 电子天平(METTLER TOLE-

DO),SK7210HP 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司),YOKO-ZS 薄层色谱成像仪、YOKO-PX 喷雾显色抽气箱、YOKO-PN 电动喷雾器(武汉药科新技术开发有限公司),Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent)。

1.2 试剂 硅胶 G 薄层板、硅胶 GF254 薄层板(青岛海洋化工厂分厂),0.22 μm 微孔滤膜(津腾),所用试剂均为分析纯(北京化学试剂公司)。

1.3 分析样品 狼疮合剂处方饮片(北京杏林药业有限责任公司);狼疮合剂(首都医科大学附属北京中医医院;批号:20140707、20140708、20140709);鸡血藤对照药材(121173-200902),白术对照药材(120925-200708),龙胆苦苷对照品(110770-201013),淫羊藿苷对照品(737-9203),黄芪甲苷对照品(781-9202),均购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 狼疮合剂中鸡血藤、白术、淫羊藿、黄芪的薄层色谱鉴别^[3-4]

2.1.1 鸡血藤的薄层色谱鉴别 取狼疮合剂 20

mL,每次加入乙醚 20 mL 振摇提取 2 次,将乙醚液合并、蒸干,用乙酸乙酯 1 mL 将残渣溶解,作为供试品溶液。按狼疮合剂制备工艺配制无鸡血藤的空白合剂,同法制得不含鸡血藤的阴性对照品溶液。另取鸡血藤对照药材 3 g,加水 50 mL,煎煮 30 min,放冷后滤过,所得滤液按供试品溶液制备方法制得鸡血藤对照药材溶液。按照《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502 薄层色谱法^[6],分别吸取上述鸡血藤阴性对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L、鸡血藤对照药材溶液 5 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,用展开剂正己烷-乙酸乙酯-甲苯(5:2:1)展开,取出并晾干,以三氯化铝溶液喷雾显色,置 365 nm 紫外光灯下进行检视。在供试品色谱中,与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性样品无干扰^[5]。见图 1。



图 1 鸡血藤薄层色谱图

注:1:鸡血藤阴性对照;2:鸡血藤对照药材;3~5:3 批供试品

2.1.2 白术的薄层色谱鉴别 按狼疮合剂制备工艺配制无白术的空白合剂,照 2.1.1 项下供试品溶液制备方法制得不含白术的阴性对照品溶液。取白术对照药材 0.5 g,加乙醚 20 mL 进行超声处理 20 min,滤过后将滤液蒸干,用甲醇 2 mL 将残渣溶解作为白术对照药材溶液。按照《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502 薄层色谱法,分别吸取白术阴性对照品溶液及 2.1.1 中供试品溶液各 10 μ L、白术对照药材溶液 5 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,用展开剂正己烷-乙酸乙酯-甲苯(5:2:1)展开,取出并晾干,以对二甲氨基苯甲醛试液喷雾显色,热风吹干后置 365 nm 紫外光灯下检视。在供试品色谱中,与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性样品无干扰^[7]。见图 2。

2.1.3 淫羊藿的薄层色谱鉴别 将 2.1.1 中剩余

的水层每次用乙酸乙酯 20 mL 振摇提取 2 次,将乙酸乙酯液合并蒸干,用甲醇 1 mL 将残渣溶解,作为供试品溶液。按狼疮合剂制备工艺配制无淫羊藿的空白合剂,照供试品溶液制备方法制得不含淫羊藿的阴性对照品溶液。另取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 淫羊藿苷的对照品溶液。按照《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502 薄层色谱法,分别吸取淫羊藿阴性对照品溶液及供试品溶液各 10 μ L、淫羊藿苷对照品溶液 2 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,用展开剂丁酮-甲酸-乙酸乙酯-水(1:1:10:1)展开,取出,晾干,以三氯化铝试液喷雾显色,置 365 nm 紫外光灯下检视。在供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性样品无干扰^[8]。见图 3。

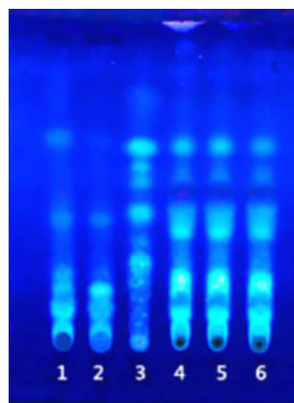


图 2 白术薄层色谱图

注:1~2:白术阴性对照;3:白术对照药材;4~6:3 批供试品

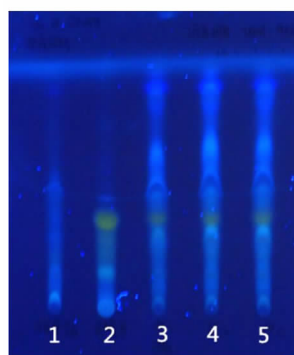


图 3 淫羊藿薄层色谱图

注:1:淫羊藿阴性对照;2:淫羊藿苷对照品;3~5:3 批供试品

2.1.4 黄芪的薄层色谱鉴别 将 2.1.3 中剩余的水层用水饱和正丁醇振摇提取 2 次,20 mL/次,合并正丁醇液,依次用氨水、正丁醇饱和水洗涤 1 次,30 mL/次,蒸干正丁醇液,用甲醇 1 mL 将残渣溶解,作为供试品溶液。按狼疮合剂制备工艺配制无黄芪的空白合剂,照供试品溶液制备方法制得不含黄芪的阴性对照品溶液。另取黄芪甲苷对照品适量,加乙

醇制成每 1 mL 含 1 mg 黄芪甲苷的对照品溶液。按照《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502 薄层色谱法,分别吸取黄芪阴性对照品溶液及供试品溶液各 10 μ L、黄芪甲苷对照品溶液 2 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,用展开剂甲醇-三氯甲烷-水(7:13:2)的下层溶液展开,取出并晾干,以 10% 硫酸乙醇溶液喷雾,加热至清晰显色出斑点。在供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;365 nm 紫外光灯下显相同颜色的荧光斑点;阴性样品均无干扰^[9]。见图 4。

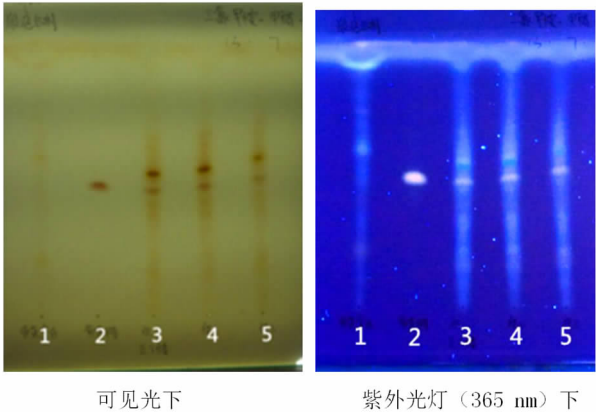


图 4 黄芪薄层色谱图

注:1:黄芪阴性对照;2:黄芪甲苷对照品;3~5:3 批供试品

2.2 狼疮合剂中龙胆苦苷的含量测定^[10-11]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶柱;流动相:0.1% 甲酸-乙腈(90:10);检测波长:270 nm;柱温:室温;流速:1.0 mL/min。

2.2.2 对照品溶液的制备 取龙胆苦苷对照品 20.25 mg 精密称定,加甲醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中,用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照品溶液的制备 按制剂工艺制备不含秦艽的空白合剂,取 5 mL 置于 25 mL 容量瓶中,加水至刻度,定容,用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密量取离心后的狼疮合剂上清液 1 mL,置 25 mL 容量瓶中,加水 20 mL,超声 5 min,加水定容至 25 mL,摇匀,用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过,即得。

2.2.5 专属性试验 精密吸取秦艽阴性对照品溶液、龙胆苦苷对照品溶液与狼疮合剂供试品溶液各 10 μ L,分别进样。龙胆苦苷与其他组分可达到基线分离,阴性对照无干扰。见图 5。

2.2.6 线性关系考察 将对照品溶液分别进样 0.5、1、2、4、6、8 μ L,依照 2.2.1 色谱条件测定峰面积。以横坐标为龙胆苦苷进样量(X)、纵坐标为峰

面积积分值(Y)制作标准曲线,获得龙胆苦苷线性回归方程 $Y = 1\,255.2X - 1.306\,7$ ($r = 0.999\,99$, $n = 6$)。结果表明,在 0.202 5 ~ 3.24 μ g 范围内,龙胆苦苷进样量与峰面积积分值线性关系良好。

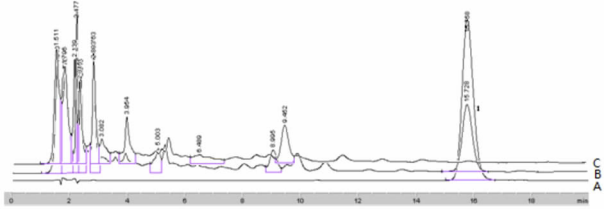


图 5 高效液相色谱图

注:A:龙胆苦苷对照品;B:供试品;C:秦艽阴性对照

2.2.7 中间精密度试验 取相同供试品溶液,连续进样 6 次,每次 10 μ L,测定龙胆苦苷峰面积积分值,计算龙胆苦苷含量,结果 RSD 为 1.37% ($n = 6$),表明所用仪器的精密度良好。

2.2.8 供试品溶液稳定性试验 取相同供试品溶液,在 0、2、4、6、8 h 每次进样 10 μ L,测定龙胆苦苷峰面积积分值,计算龙胆苦苷含量,结果 $RSD = 0.89\%$ ($n = 5$),表明龙胆苦苷在供试品溶液中 8 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 分 6 次精密吸取相同批号狼疮合剂,每次 1 mL,按 2.2.3 项下供试品溶液制备方法制备,进样 10 μ L,测定龙胆苦苷峰面积积分值,计算含量,结果龙胆苦苷平均含量 1.767 mg/mL, $RSD = 1.23\%$ ($n = 6$),表明龙胆苦苷的含量测定方法重复性良好。

2.2.10 回收率试验 精密吸取已知含量的样品 0.5 mL,共 6 份,置于 25 mL 量瓶中,分别精密加入浓度为 0.405 mg/mL 的对照品溶液 3 mL,加水 15 mL,超声 5 min,加水定容至 25 mL,摇匀,用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过,即得供试液。精密吸取供试液 10 μ L,依法测定,计算,结果平均回收率为 102.56%, $RSD = 1.57\%$ ($n = 6$)。见表 1。

表 1 回收率测定结果($n = 6$)

样品 编号	测得量 (mg)	加入量 (mg)	样品中含量 (mg)	回收率	均值	RSD (%)
1	2.109	1.215	0.883	100.906	102.56	1.57
2	2.150	1.215	0.883	104.269		
3	2.138	1.215	0.883	103.227		
4	2.122	1.215	0.883	101.965		
5	2.107	1.215	0.883	100.706		
6	2.151	1.215	0.883	104.300		

2.2.11 耐用性试验 选择 2 种不同品牌色谱柱,分别为 kromasil 100-5c18 150 mm $\times$ 4.6 mm; Agilent

ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 2.1 mm ×150 mm,依法测定同一批号样品。结果表明,使用2种不同品牌的色谱柱,供试品溶液中龙胆苦苷峰均能达基线分离,分离度符合要求,测定结果不受影响,方法耐用性良好。

2.2.12 样品测定结果 取3批次狼疮合剂,按2.2.3项下分别制成供试品溶液,依照2.2.1色谱条件每批次进样10 μL测定龙胆苦苷含量。见表2。

表2 龙胆苦苷含量测定结果(n=3)

样品批号	含量(mg/mL)			$\bar{x}$	RSD(%)
20140707	1.772	1.788	1.781	1.78	1.69
20140708	1.744	1.747	1.771	1.75	0.84
20140709	1.558	1.593	1.557	1.57	1.33

3 讨论

3.1 薄层色谱鉴别 对方中其他药味也进行了薄层色谱研究。1)鉴别党参^[12]时,供试液曾经尝试用2.1.4中的供试品溶液、氨水洗涤液部分或正丁醇饱和水洗涤液部分;采用正丁醇-冰醋酸-水(7:1:0.5)、三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液等做展开剂。结果供试品中与党参炔苷对应位置斑点均不清晰,未收载于正文。2)鉴别拳参^[13]时,以绿原酸、没食子酸和拳参药材作为阳性对照,考察展开剂二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1)、乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)上层。结果2.1.3中供试品与绿原酸似有对应斑点,而在与没食子酸相应位置阴性有干扰。此鉴别特异性不强,未收载于正文。3)鉴别女贞子时,曾经尝试《中华人民共和国药典》收载方法^[13],结果供试品中与齐墩果酸对应位置无明显斑点;将女贞子药材水煎后依次用乙酸乙酯、水饱和和正丁醇振摇提取、浓缩后作为阳性对照,结果乙酸乙酯部分在二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1)的展开条件下,与没食子酸相应位置阴性有对应斑点,表明二者相互干扰,未收载于正文。4)鉴别丹参时,考虑制剂的工艺特点,选择鉴别丹参中的水溶性成分。以2.1.3项下供试液采用药典方法^[13]鉴别丹酚酸B,效果不佳。后参考文献方法^[14],取丹参药材1.5 g,加水20 mL,煎煮30 min,放冷,滤过,滤液用盐酸调pH约为2,其余同2.1.3供试品溶液制备,得到丹参对照药材溶液;并按处方比例,称取除丹参以外的其他饮片,按成品制备工艺制成空白制剂,再按2.1.3项下供试液制备方法制备,得丹参阴性对照溶液;以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1)为展开剂、3%三氯化铁乙醇液为显色剂,结果主斑点阴性有干扰。未收

载于正文。

3.2 含量测定 秦艽既能外散风湿舒筋活络,又能内泄湿热、凉血退蒸,为风药中之润剂,散药中之补剂,具有抗炎、抗氧化、调节免疫中枢系统、保肝、升血糖等广泛的药理活性^[15],在狼疮合剂中为君药。秦艽中主要有效成分为龙胆苦苷,为《中华人民共和国药典》中规定的含量测定成分^[13]。

根据文献以及药典中龙胆苦苷的含量测定方法,实验中考察了甲醇-水(25:75)、0.1%甲酸-乙腈(90:10)2种流动相,使用甲醇-水(25:75)的流动相分离效果不好,故舍弃。考察了270 nm、254 nm 2种波长,比较后得出在波长270 nm下达到最大吸收,且分离效果好,阴性无干扰,故选择波长270 nm。

狼疮合剂的薄层色谱鉴别和含量测定方法重现性好,简便易行,为安全有效的用药提供了一个合理依据,可较好地控制狼疮合剂的质量。

参考文献

[1]谢素红. 系统性红斑狼疮合并尿路感染的临床分析[J]. 中国医药,2013,8(11):1608-1609.

[2]郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:111-115.

[3]国家药典委员会. 中华人民共和国药典中药材薄层色谱彩色图集[S]. 北京:人民卫生出版社,2009.

[4]颜晓航,薄层色谱法操作技术控制要点分析[J]. 安徽医药,2012,16(9):1271-1272.

[5]王丽静,肖草茂,曾宪仪. 丰城鸡血藤的生药学鉴定[J]. 华西药杂志,2015,30(4):452-453.

[6]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 1部. 北京:中国医药科技出版社,2015:57.

[7]李耀荣,徐青青,莫玉芳,等. 益气通鼻颗粒中白术鉴别方法探究[J]. 中国药业,2009,18(24):32-33.

[8]朱冬可,吴佩颖,高崎,等. 乳腺消郁颗粒的质量控制[J]. 中成药,2015,37(6):1375-1379.

[9]汪晶,吴晓燕. 复方益气止咳颗粒质量标准研究[J]. 亚太传统医药,2015,11(22):17-19.

[10]宋愿智,姜华,唐永红. HPLC法测定耳聋通窍丸中龙胆苦苷的含量[J]. 西北药学杂志,2010,25(3):168-169.

[11]刘仁俊,慕芳英,鲁静. HPLC法测定芹龙肝治宝颗粒中龙胆苦苷的含量[J]. 中国卫生工程2010,9(2):147-148.

[12]王珍,李鑫. 补肾健脾颗粒质量标准研究[J]. 中成药,2010,32(7):1252-1255.

[13]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 1部. 北京:中国医药科技出版社,2015:45,76,270,288.

[14]吴良发,吴燕红,杨明,等. 乳块消片中丹参、橘叶与地龙的同板薄层色谱鉴别[J]. 赣南医学院学报,2015,35(3):350-251.

[15]芦启琴,娄灯吉,沈建伟,等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(29):9299-9301.