

复生康胶囊质量标准的研究

黄瑞松¹, 叶云峰², 苏青¹, 胡秋萍³, 丘记珍³, 黄永灵^{3*}

(1. 广西民族医药研究所, 广西南宁 530001; 2. 广西兽药监察所, 广西南宁 530001; 3. 广西中医学院, 广西南宁 530001)

摘要: 目的 建立复生康胶囊质量控制方法。方法 采用薄层色谱法对蒲葵子、喜树果和莪术进行定性鉴别, 采用 HPLC 法测定喜树碱的含量。色谱条件为: Dikma Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水 (55:45); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm。结果 薄层色谱斑点清晰集中, 喜树碱在 0.050 6~0.253 0 μ g 具有良好线性关系, 平均回收率为 96.90%, $RSD=1.74\%$ ($n=6$)。结论 方法灵敏、准确、重现性好、专属性强, 可作为复生康胶囊的质量控制标准。

关键词: 复生康胶囊; 质量标准; 薄层色谱; 喜树碱; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)08-0698-04

Studies on quality standard of Fushengkang Capsule

HUANG Rui-song¹, YE Yun-feng², SU Qing¹, HU Qiu-ping³, QIU Ji-zhen³, HUANG Yong-ling³

(1. Guangxi Institute of Minority Nationality Medicine and Pharmacology, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Institute of Veterinary Drug Control, Nanning 530001, China; 3. Guangxi College of TCM, Nanning 530001, China)

Abstract **Object** To establish the method for quality control of Fushengkang Capsule. **Methods** *Semen Livistoniae Chinensis*, *Fructus Camptothecae Acuminatae* and *Rhizoma Curcumae* in this capsule were identified by TLC. The content of camptothecine was determined by HPLC. Condition of HPLC was Dikma Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) the mobile phase was a mixture of methanol-water (55:45), the flow rate was 0.8 mL/min, and detection wavelength at 254 nm. **Results** The spots of TLC were clear and concentrative. There was a good linear relationship for camptothecine within the range of 0.050 6—0.253 0 μ g. The average recovery was 96.90%, $RSD=1.74\%$ ($n=6$). **Conclusion** This method is sensitive, accurate, reproducible and exclusive. It can be used for quality control of Fushengkang Capsule.

Key words Fushengkang Capsule; quality standard; TLC; camptothecine; HPLC

复生康胶囊为广西民族药制剂, 主要由蒲葵子、喜树果和莪术等民族药和中药组成, 具有活血化瘀、健脾消积的功效, 用于增强胃癌、肝癌放疗、化疗的疗效, 改善肝癌患者的临床症状。为控制该药的质量, 本研究对蒲葵子、喜树果和莪术 3 味药进行了薄层鉴别, 并采用 HPLC 法测定该药中的喜树碱含量。

1 仪器与试药

2695 型 HPLC 系统 (带自动进样器), 2487 紫外检测器, 2996 型二极管阵列检测器, Millennium³² 数据处理系统 (均为美国 Waters 公司); UV-2401PC (日本岛津公司); AE-240 型 1/10⁵ 电子分析天平 (瑞士梅特勒公司); SB2200 超声波清洗器 (上海必能信超声有限公司); 薄层板自动涂布器 (重

庆贝尔德仪器技术公司); 定量毛细管 (美国 Drummond Scientific Co.)。

复生康胶囊及各被检药材的阴性制剂, 由广西昌弘制药有限公司提供; 喜树碱对照品由中国科学院上海药物研究所提供; 蒲葵子、喜树果、莪术对照药材由广西民族医药研究所提供, 经广西中医学院刘寿养副教授鉴定, 蒲葵子为 *Livistona chinensis* R. Br. 的果实, 喜树果为 *Camptotheca acuminata* Decne. 的果实, 莪术为 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 的根茎。甲醇为色谱纯 (天津市四友生物医学技术有限公司), 水为重蒸馏水, 硅胶 G/H 为化学纯 (青岛海洋化工厂), 其他化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

* 收稿日期: 2002-11-26

作者简介: 黄瑞松, 男, 广西贵港人, 副主任药师, 药学部主任, 从事中草药分析和中药新药研究开发工作。

Tel (0771) 3130064 E-mail gxhrs@hotmail.com

2.1 薄层色谱定性鉴别

2.1.1 蒲葵子: 取本品内容物 1 g, 加甲醇 2 mL, 超声处理 15 min, 静置 40 min, 吸取上清液滤过, 滤液作为供试品溶液。另取缺蒲葵子的阴性制剂内容物 1 g, 同法制成阴性对照溶液; 取蒲葵子对照药材粉末 2 g, 加水 20 mL 煎煮 30 min, 趁热滤过, 取滤液浓缩至 3 mL, 加乙醇 6 mL, 搅匀, 密闭, 静置 4 h, 滤过, 取滤液蒸干, 残渣加甲醇 0.5 mL 溶解, 作为对照药材溶液; 吸取上述 3 种溶液 8~10 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-甲酸 (5: 0.8: 0.2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1.5% 硫酸铁铵溶液, 热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的褐色主斑点, 阴性对照色谱则无此斑点。见图 1-A

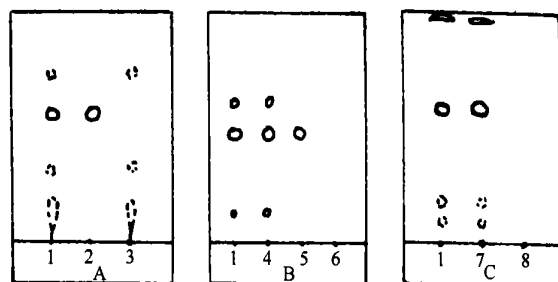
2.1.2 喜树果: 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液; 另取缺喜树果的阴性制剂内容物 1 g, 同 2.1.1 项下方法制成阴性对照溶液; 取喜树碱对照品, 加氯仿-乙醇 (1: 1) 制成 1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述供试品溶液、阴性对照溶液、对照品溶液各 1 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上, 以氯仿-丙酮 (7: 3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的亮蓝色荧光斑点, 阴性对照色谱则无此荧光斑点。见图 1-B

2.1.3 莪术: 取本品内容物 5 g, 加乙醚 10 mL, 超声提取 15 min, 静置 30 min, 吸取上清液作为供试品溶液; 另取缺莪术的阴性制剂内容物 5 g, 同法制成阴性对照溶液。取莪术对照药材粉末 1 g, 加乙醚 5 mL, 同法制成对照药材溶液。吸取上述 3 种溶液各 10~15 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上, 以石油醚 (60 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯 (9: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以香草醛试液。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的樱红色主斑点, 阴性对照溶液则无此主斑点。见图 1-C

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱: Dikma Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水 (55: 45); 流速: 0.8 mL/min; 波长: 254 nm; 柱温: 室温。

2.2.2 喜树碱对照品纯度检查: 归一化法检查: 精密称取喜树碱对照品 10.05 mg, 置 10 mL 量瓶内, 加氯仿-乙醇 (1: 1) 至刻度, 摇匀, 作为喜树碱对照



1-供试品 2-蒲葵子对照药材 3-缺蒲葵子阴性对照

4-喜树果对照药材 5-喜树碱对照品 6-缺喜树果阴性对照

7-莪术对照药材 8-缺莪术阴性对照

1-sample 2-Semen Livistonae Chinensis 3-sample without Semen Livistonae Chinensis 4-Fructus Camptotheca Acuminatae 5-camptothecine 6-sample without Fructus Camptotheca Acuminatae 7-Rhizoma Curcuma 8-sample without Rhizoma Curcuma

图 1 蒲葵子 (A)、喜树果 (B) 和莪术 (C) 的 TLC 图谱

Fig. 1 TLC chromatograms of *Fructus Livistonae Chinensis* (A) *Fructus Camptotheca Acuminatae* (B) and *Rhizoma Curcuma* (C)

品溶液; 另取氯仿-乙醇 (1: 1) 作为溶剂对照溶液。吸取上述对照品溶液和溶剂对照溶液各 10 μ L, 分别注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件, 采用归一化法进行测定。结果表明: 喜树碱对照品溶液色谱中喜树碱吸收峰的峰面积积分值的相对百分含量为 98.69% ($n=3$), 扣除溶剂对照溶液吸收峰的峰面积, 喜树碱吸收峰的峰面积相对百分含量 > 98%。说明试验所用喜树碱对照品的纯度符合含量测定用的要求。色谱峰纯度检测: 应用二极管阵列检测器对对照品中的喜树碱色谱峰进行纯度分析。结果纯度角小于纯度域值, 表明色谱分离良好, 色谱峰纯度高。

2.2.3 对照品溶液的制备: 精密称取喜树碱对照品 10.12 mg, 置 200 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 再精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 供试品溶液的制备: 取本品内容物 0.3 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 60 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.5 阴性对照溶液的制备: 取缺喜树果的阴性制剂内容物 0.3 g, 按 2.2.4 项下方法制备, 即得。

2.2.6 系统适用性试验: 分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件试验。结果表明, 供试品溶液色谱图中均有与喜树碱保留时间相同的吸收峰, 且喜树碱峰与相邻杂质峰分离度大于 1.5, 可

达到基线分离。理论板数按喜树碱峰计算不低于 2 000 阴性对照溶液的色谱图则无此吸收峰 见图 2

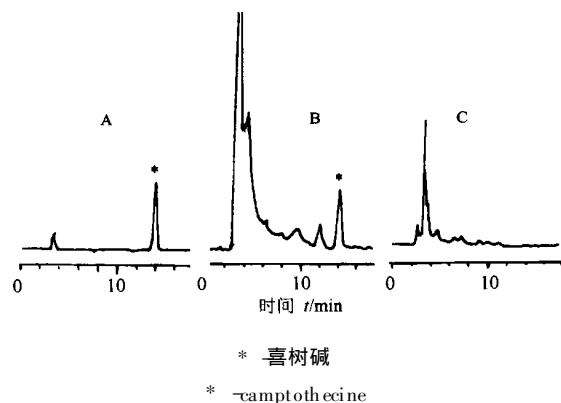


图 2 喜树碱 (A)、复生康胶囊供试品 (B)和缺喜树果阴性对照 (C)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of camptothecin (A), Fushengkang Capsule (B) and sample without *Fructus Camptothecae Acuminatae* (C)

2.2.7 线性关系的考察:精密称取喜树碱对照品 10.12 mg,置 200 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。分别精密吸取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 置 10 mL 量瓶中,各加甲醇至刻度,摇匀。分别吸取 20 μ L 注入高效液相色谱仪,测定。以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y = 6 \times 10^6 X - 1954.2$, $r = 0.9999$ 。喜树碱含量在 0.050 6~0.253 0 μ g 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.8 精密度考察:精密吸取同一供试品 (000809) 溶液 20 μ L,重复进样 5 次,测定,喜树碱含量相差不大, $RSD = 0.58\%$ 。

2.2.9 重现性试验:精密吸取同一批号制剂 (000809) 制备的 6 个供试品平行溶液,各进样 20 μ L,测定,计算喜树碱含量。结果表明,喜树碱含量 $RSD = 1.4\%$ 。说明本方法重现性好。

2.2.10 稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液 (000809) 20 μ L,每隔 2 h 进样一次,共进样测定 5 次,计算各次喜树碱含量,结果 8 h 内喜树碱含量的 $RSD = 1.37\%$ 。说明供试品溶液中喜树碱在 8 h 之内是稳定的。

2.2.11 回收率试验:采用加样回收法。称取已测得含量的同一批号制剂 (000809) 0.3 g 共 6 份,分别精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,各加入喜树碱对照品甲醇溶液 (4.08 μ g/mL) 25 mL,按 2.2.4 项下方法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 20 μ L 进样,测定。结果喜树碱平均回收率为 96.90%, $RSD = 1.74\%$ 。

2.2.12 样品测定:取本品 10 批,按上述方法测定喜树碱含量。结果 10 批样品的喜树碱在 0.136~0.163 mg/粒,定含量为 0.148 mg/粒。见表 1

表 1 复生康胶囊中喜树碱含量测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Contents of camptothecin in Fushengkang Capsule ($n = 3$)

批号	喜树碱含量 / ($\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)	RSD / %
000809	0.142	1.77
000810	0.144	1.06
010319	0.149	0.39
010927	0.152	2.01
011008	0.163	0.94
011012	0.153	1.00
020108	0.136	0.85
020310	0.145	1.73
020316	0.147	1.04
020319	0.148	1.40

3 讨论

3.1 薄层鉴别试验中,样品和阴性对照均采用平行试验。结果表明,样品均可检出蒲公英、喜树果和莪术,且各检出成分不受该药内容物中其他成分的干扰,说明上述各鉴别方法重现性好,专属性强。

3.2 喜树果主要活性成分为喜树碱,喜树碱既是抗肿瘤有效成分,又是有毒成分^[1,2]。故选择喜树碱含量进行测定,对于控制该药临床用药的安全有效具有重要意义。喜树碱的含量测定方法有紫外分光光度法和 HPLC 法^[3,4],本实验选择 HPLC 法进行喜树碱的含量测定。

3.3 曾分析选择甲醇、80% 乙醇、氯仿、氯仿-乙醇 (1:1) 作为提取溶剂,分别采用 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温浸和超声处理 60 min 提取。结果 80% 乙醇、氯仿、氯仿-乙醇 (1:1) 无论温浸或超声提取,供试品 HPLC 色谱分离效果均较差,杂质峰对喜树碱峰均有一定干扰;以甲醇作溶剂温浸提取时 HPLC 色谱图中杂质峰与喜树碱峰亦未能达到基线分离;只有以甲醇作为溶剂超声提取的供试品溶液 HPLC 色谱分离效果较好,喜树碱与相邻杂质峰的分离度大于 1.5,且可达到基线分离。故供试品溶液的制备采用甲醇超声提取的方法。在超声时间方面,曾试验以同一批号样品 (000809) 分别以甲醇超声提取 15、30、45 和 60 min。结果喜树碱含量分别为 0.114 5、0.128 0、0.136 3 和 0.141 6 mg/粒,与超声时间成正比。故采用超声处理时间为 60 min。

3.4 在 200~400 nm 波长测试喜树碱甲醇溶液 (5.06 μ g/mL) 的吸收光谱。结果在 254 nm 波长处有最大吸收峰,故选择 254 nm 作为 HPLC 的检测波长。曾以甲醇-水 (60:40) 作为流动相进行试验,

结果样品杂质峰对喜树碱峰有干扰,经改用甲醇-水(55:45),流速为0.8 mL/min后,样品的分离效果较好。经对3批样品(000809 011008 011012)进行试验,喜树碱峰与相邻杂质峰的分离度分别为1.9, 1.8和2.4,均大于1.5,且峰形对称尖锐。说明甲醇-水(55:45)作为流动相适用于该药喜树碱的测定。以2.2.1项下色谱条件对3批样品(批号同上)进行测定,结果理论塔板数按喜树碱峰计算,分别为3 242, 3 227, 4 100。考虑到用不同品牌和规格的色谱柱测定可能有偏差,故暂定理论塔板数按喜树碱峰计算应不低于2 000。

References

- [1] Xu J S, Zhao T Y, Lin L Z *et al.* Chemical constituents of the anticancer plant *Camptotheca acuminata* Decne. II. Chemical constituents of the fruits of *Camptotheca acuminata* Decne. [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 1997, 35(3-4): 193-199.
- [2] Information Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituents in Phytomedicine* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.
- [3] *Guangxi Standard of Drug* (广西药品标准) [S]. 1984.
- [4] Zhang L, Yang Y. Determination of camptothecin in the fruit of *Camptotheca* Decne. by RP-HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(4): 234-235.

大孔树脂富集三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯 A和 B的研究

黄雪松¹, 黄荣春^{2*}

(1. 暨南大学理学院 食品科学与工程系, 广东 广州 510632; 2. 香港中文大学 生物系, 香港 沙田)

摘要:目的 大量富集三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯 A, B(WTA, WTB)。方法 采用气相色谱法测定 WTA 和 WTB, 并以 WTA 和 WTB 的含量、洗脱率、精制度为考察指标, 研究 D₁₀₁大孔树脂吸附 WTA 和 WTB 的工艺条件及参数。结果 通过大孔树脂吸附后, WTA 和 WTB 的洗脱率达 90%, 50% 乙醇洗脱部分中 WTA 和 WTB 的含量为总固物的 4.01% ~ 4.09%。结论 可以采用大孔树脂富集 WTA 和 WTB。
关键词: 三裂叶蟛蜞菊; 三裂叶蟛蜞菊倍半萜内酯 A, B; 大孔吸附树脂; 气相色谱
中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2003)08-0701-04

Studies on enriched yield of wedeliatriloclactone A and B in *Wedelia trilobata* by macroporous resin

HUANG Xue-song¹, VINCENT E. C. Ooi²

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Biology, Chinese University of Hong Kong, Shatin, China)

Abstract **Object** To enrich the yield of wedeliatriloclactone A and B (WTA and WTB) from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. **Methods** WTA and WTB were determined by gas chromatography and their eluting ratio and purities were analysed by determining their contents in different fractions eluted from D₁₀₁ macroporous resin. **Results** The eluting ratio of WTA and WTB was increased up to 90% and their contents were 4.01% ~ 4.09% in 50% alcohol fraction. **Conclusion** WTA and WTB can be separated by D₁₀₁ macroporous resin.

Key words *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.; wedeliatriloclactone A and B (WTA and WTB); macroporous resin; GC

三裂叶蟛蜞菊为菊科植物三裂叶蟛蜞菊 *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. 的干燥地上部分, 在香港、深圳、广州等地广泛用作花园、路边、池塘等地的观赏植物。除叶子三裂外, 其根、茎、花等植物学特

征与我国民间常用的蟛蜞菊 *W. chinensis* (Osb.) Merr. 类似。因此, 当地常将其视为蟛蜞菊使用。文献报道三裂叶蟛蜞菊中含有倍半萜内酯^[1,2]。倍半萜内酯类物质具有抗肿瘤、细胞毒、刺激组织胺释放、

* 收稿日期: 2002-09-29

作者简介: 黄雪松 (1957-), 男, 山东汶上人, 教授, 博士, 曾两次赴香港中文大学生物系研修, 主要从事食品化学、食品功能因子及食品加工工艺方面的研究。

Tel (020) 85226630-6635 E-mail xshuang@sdau.edu.cn