

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.21.009

乙肝灵胶囊质量标准改进研究

黄艳¹, 罗定强¹, 李青¹, 袁芬越²

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710061; 2. 陕西东泰制药有限公司, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 改进乙肝灵胶囊的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对大黄、人参、甘草进行定性鉴别,并在检查项下增加土大黄苷的鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定君药大黄中大黄素、大黄酚的含量。结果 定性鉴别方法斑点清晰,专属性强。大黄素进样量在0.023 4~0.292 5 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好, $r=1.000\ 0$,平均回收率为100.17%, RSD 为1.98%($n=6$);大黄酚进样量在0.039 16~0.489 60 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好, $r=1.000\ 0$,平均回收率为96.38%, RSD 为1.52%($n=6$)。结论 改进后的质量标准可行,可用于乙肝灵胶囊的质量控制。

关键词:乙肝灵胶囊;薄层色谱鉴别;大黄素;大黄酚;含量测定;标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)21-0031-04

Study on Improvement of Quality Standard of Yiganling Capsules

Huang Yan¹, Luo Dingqiang¹, Li Qing¹, Yuan Fenyue²

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710061; 2. Shaanxi Eastantai Pharmaceutical Co., Ltd., Xianyang, Shaanxi, China 712000)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Yiganling Capsules. Methods TLC method was adopted for qualitative identification of *Rheum palmatum*, *Panax ginseng*, *Glycyrrhiza uralensis* and the identification method of rhaponticin was added in the examination. HPLC method was used to determine the content of emodin and chrysophanol. Results The qualitative identification methods had clear spots and good specificity. There was a good linear correlation in the range of 0.023 4~0.292 5 μg ($r=1.000\ 0$) for emodin, the average recovery was 100.17%, the RSD was 1.98% ($n=6$), and there was a good linear correlation in the range of 0.039 16~0.489 60 μg ($r=1.000\ 0$) for chrysophanol, the average recovery was 96.38%, the RSD was 1.52% ($n=6$). Conclusion The improved quality standard is feasible, it can be used for quality control for Yiganling Capsules.

Key words: Yiganling Capsules; TLC; emodin; chrysophanol; content determination; standard

乙肝灵胶囊是由大黄、白芍、茵陈、柴胡、贯众、甘草、人参、黄芪8味中药材组方的中药复方制剂,有清热解毒、疏肝健脾的功效,适用于肝气郁滞、湿邪困脾及乙型肝炎。方中大黄、白芍为君药。大黄苦、寒,泻热通便,利胆逐瘀;白芍苦酸,微寒,养阴和血,柔肝止痛。两者配伍,清利疏养并举。该药品现行质量标准为国家食品药品监督管理局药品标准 YBZA17522005-2009Z,其存在部分薄层色谱重现性差、斑点不清晰,且对大黄未进行含量控制的问题。陈光芝等^[1]采用高效液相色谱(HPLC)法测定了乙肝灵胶囊中芍药苷含量,而其他药味未见文献报道。为有效控制乙肝灵胶囊的质量,本研究中对原有鉴别项进行方法学验证的基础上,对大黄、人参的薄层色谱(TLC)法进行了修订,增加甘草的TLC鉴别和大黄中土大黄苷的薄层色谱检查,用HPLC法测定大黄中大黄素和大黄酚的总量,以实现乙肝灵胶囊质量的有效控制。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.2 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪,2489 紫外检测器,Empower 工作站(美国 Waters 公司);AE204 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

大黄对照药材(批号为121676-201201),大黄酸

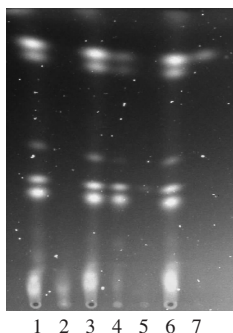
对照品(批号为110757-200206),大黄酚对照品(批号为110796-201520,含量为99.2%),人参皂苷 Rb₁ 对照品(批号为110704-201424),人参皂苷 Re 对照品(批号为110754-201324),甘草对照药材(批号为120904-201318),土大黄苷对照品(批号为110794-201306),大黄素对照品(批号为110796-200110),均购自中国食品药品检定研究院;乙肝灵胶囊(陕西省东泰制药有限公司,批号分别为6B01,6B02,6B03);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂分厂);聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);甲醇为色谱纯(美国 Honeywell 公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

大黄^[2,3,4,9]:取含量测定项下的供试品溶液作为供试品溶液。另取50 mg 大黄对照药材,置具塞锥形瓶中,加甲醇10 mL,45 min 水浴回流提取,滤过,蒸干滤液,残渣加入8%盐酸溶液10 mL,于沸水浴中加热1 h,冷却至室温,转移溶液置分液漏斗中,用30 mL 乙酸乙酯分3次提取,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣用甲醇1 mL 溶解,作为对照药材溶液。再取大黄酸对照品、大黄酚对照品,分别加甲醇制成质量浓度为1 g/L 的溶液,作为对照品溶液。按处方比例、工艺制备取不含大黄药材的阴

性样品 0.8 g, 按 2.3.2 项下供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。照 TLC 法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 吸取供试品溶液和阴性对照品溶液各 6 μ L, 对照药材溶液和对照品溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C) - 甲酸乙酯 - 甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与大黄对照药材溶液色谱和大黄酸、大黄酚对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰。详见图 1。

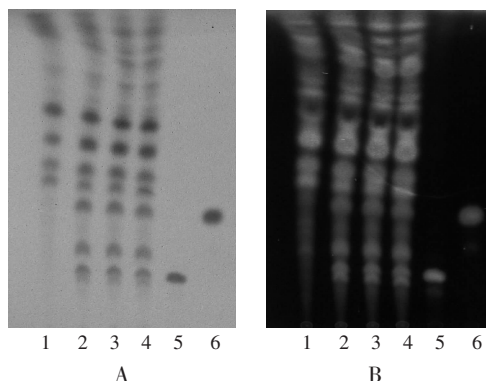


1, 3, 6. 供试品溶液(批号分别为 6B01, 6B02, 6B03)
2. 阴性对照品溶液 4. 大黄对照药材溶液
5. 大黄酸对照品溶液 7. 大黄酚对照品溶液

图 1 大黄的薄层色谱图

人参^{[2]468, [3-4]}: 取本品内容物 6 g, 置索氏提取器中, 加适量乙醚, 加热回流至提取液无色, 弃去乙醚液, 挥干药渣, 再加入 100 mL 甲醇, 加热回流至提取液无色, 放冷至室温, 提取液蒸干, 用 30 mL 水分次溶解残渣, 转移至分液漏斗中, 用 90 mL 水饱和的正丁醇分 3 次振摇提取, 正丁醇提取液合并, 用 90 mL 氨试液分 2 次洗涤, 正丁醇液蒸干, 用 10 mL 水溶解残渣, 通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径为 1.5 cm, 柱高为 12 cm), 按 50 mL 水、40 mL 40% 乙醇和 60 mL 70% 乙醇的顺序洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液, 蒸干, 用甲醇 1 mL 溶解残渣, 作为供试品溶液。另取人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re 对照品, 分别用甲醇制成质量浓度为 1 g/L 溶液, 作为对照品溶液。按处方比例、工艺制备取不含人参药材的阴性样品 6 g, 同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。照 TLC 法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 上述 3 种溶液各吸取 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷 - 甲醇 - 水(13:7:2)10 $^{\circ}$ C 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, 于 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中, 在与人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re 对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点及荧光斑点, 阴性对照无干扰。详见图 2。

甘草^{[2]86, [5-7]}: 取本品内容物 1.5 g, 置具塞锥形瓶



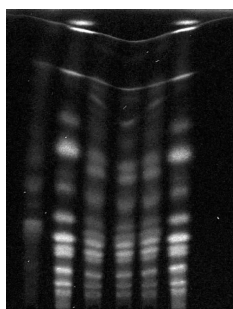
1. 阴性对照品溶液 2-4. 供试品溶液(批号分别为 6B01, 6B02, 6B03)
5. 人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液 6. 人参皂苷 Re 对照品溶液
A. 日光下 B. 紫外光灯(365 nm)下

图 2 人参的薄层色谱图

中, 量入 30 mL 甲醇, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 用 10 mL 水溶解残渣, 调节 pH 至 9~10, 用 60 mL 水饱和的正丁醇液分 3 次提取, 弃去正丁醇提取液, 水液调节 pH 至 2~3, 用 60 mL 水饱和的正丁醇液分 3 次提取, 提取液合并, 用 60 mL 正丁醇饱和的水分次洗涤 2 次, 蒸干提取液, 用甲醇 5 mL 溶解残渣, 作为供试品溶液。另取甘草对照药材 0.5 g, 同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。再取按处方比例、工艺制备不含甘草药材的阴性样品 1.5 g, 同法制成阴性对照品溶液。照 TLC 法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 取上述 3 种溶液各 2~5 μ L, 分别点于同一用 1% 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上, 展开剂为乙酸乙酯 - 甲酸 - 冰醋酸 - 水(15:1:1:2), 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与甘草对照药材溶液色谱相应位置上显相同的黄绿色荧光斑点, 阴性对照无干扰。详见图 3。

2.2 土大黄苷检查^{[2]23, [8-11]}

取本品内容物 1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 20 mL 甲醇, 超声处理 30 min(功率 500 W, 频率 40 kHz), 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。另取土大黄苷对照品, 加甲醇制成 0.1 g/L 溶液, 作为对照品溶液(临用新制)。按处方比例、工艺制备的不含大黄药材的阴性样品 1 g, 同供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。取土大黄苷替代处方中大黄, 然后取按处方比例、工艺所制备的阳性样品 1 g, 同供试品溶液制备方法制成阳性对照品溶液。照 TLC 法(2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502)试验, 上述 4 种溶液各吸取 1 μ L, 分别点于同一聚酰胺薄层板上, 展开剂为三氯甲烷 - 甲醇 - 甲酸 - 水(11:3:0.2:0.3), 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与土大黄苷对照品溶液色谱相应位置上未出现相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

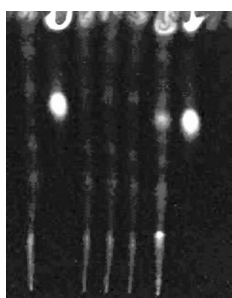


1 2 3 4 5 6

1. 阴性对照品溶液 3-5. 供试品溶液(批号分别为 6B01, 6B02, 6B03)
2, 6. 对照药材溶液

图3 甘草的薄层色谱图

阳性对照品溶液色谱中,在与土大黄苷对照品溶液色谱相应位置上出现相同颜色的斑点。详见图4。



1 2 3 4 5 6 7

1. 阴性对照品溶液 2, 7. 土大黄苷对照品溶液
3-5. 供试品溶液(批号分别为 6B01, 6B02, 6B03)
6. 阳性对照品溶液

图4 土大黄苷的薄层色谱图

2.3 含量测定^[12-15]

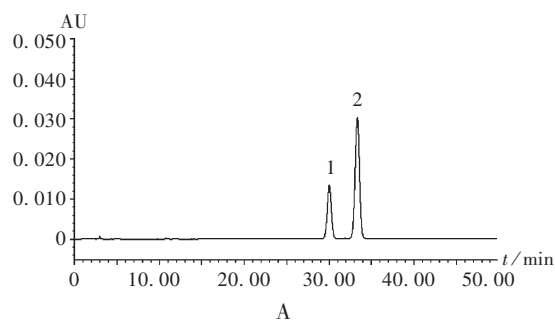
2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent 5 TC - C₁₈(2)柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(68:32); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。在此条件下, 供试品溶液中 大黄素 色谱峰、大黄酚 色谱峰与其他杂质峰基线分离。色谱图见图5。

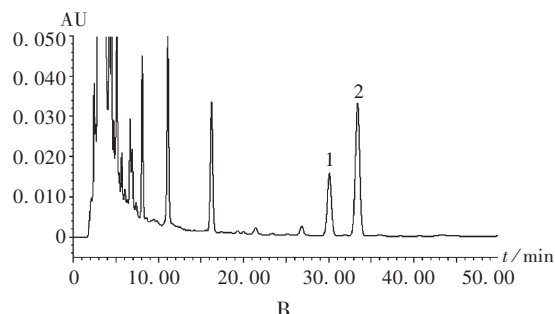
2.3.2 溶液制备

对照品溶液: 取 大黄素、大黄酚 对照品适量, 精密称定, 加 甲醇 制成 大黄素 质量浓度为 10 μg/mL、大黄酚 质量浓度为 20 μg/mL 的混合溶液, 即得。

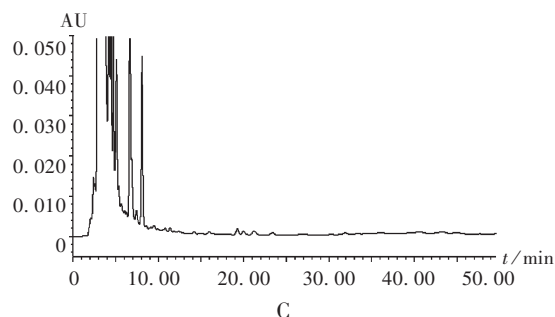
供试品溶液: 取样品混匀的内容物约 0.8 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 加热回流 45 min, 冷却至室温, 用 甲醇 补足 减失 的质量, 滤过, 精密量取 续滤液 10 mL, 置具塞锥形瓶中, 蒸干, 冷却, 加入 8% 盐酸溶液 10 mL, 1 h 沸水浴加热, 冷却至室温, 转移至分液漏斗中, 用 50 mL 乙酸乙酯 分次提取 5 次, 合并 乙酸乙酯 液, 蒸干, 用 甲醇 溶解 残渣 转移至 10 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。



A



B



C

1. 大黄素 2. 大黄酚

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图5 高效液相色谱图

阴性对照品溶液: 精密称取按供试品处方比例、工艺制备的不含大黄的阴性样品 0.8 g, 按供试品溶液制备方法制成, 即得。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察: 精密吸取 大黄素 (11.70 μg/mL)、大黄酚 (19.58 μg/mL) 混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL, 按拟订色谱条件测定, 以进样量 (X, μg) 为横坐标、峰面积积分值 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 得 大黄素 回归方程 $Y = 3798.28X + 271.54$, $r = 1.0000$ ($n = 6$); 得 大黄酚 回归方程 $Y = 5496.76X + 4577.04$, $r = 1.0000$ ($n = 6$)。结果表明, 大黄素和大黄酚进样量分别在 0.023 4 ~ 0.292 5 μg 和 0.039 16 ~ 0.489 60 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL, 进样 6 次。结果 大黄素 峰面积积分值的 RSD 为 0.49% ($n = 6$), 大黄酚 峰面积积分值的 RSD 为 0.85% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 6B02)样品, 精密

称取6份,每份0.8 g,依法制备供试品溶液,精密吸取10 μ L,测定。结果大黄素平均含量为0.413 2 mg/g, RSD为1.57% ($n=6$),大黄酚平均含量为0.664 3 mg/g, RSD为1.81% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,每隔2 h进样1次,记录24 h。结果大黄素峰面积的RSD为0.34%,大黄酸峰面积的RSD为0.19% ($n=6$),表明供试品溶液在

24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为6B02,大黄素含量为0.413 2 mg/g,大黄酚含量为0.664 3 mg/g)6份,精密称定,每份0.4 g,分别精密加入25 mL大黄素、大黄酚混合对照品甲醇溶液(大黄素质量浓度为7.656 μ g/mL,大黄酚质量浓度为11.088 μ g/mL),依法制备供试品溶液,测定。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.404 4	0.404 4	0.167 1	0.268 6	0.191 4	0.277 2	0.361 6	0.540 2	101.62	97.98				
0.406 9	0.406 9	0.168 1	0.270 3	0.191 4	0.277 2	0.361 2	0.533 2	100.89	94.84				
0.402 5	0.402 5	0.166 3	0.267 3	0.191 4	0.277 2	0.357 5	0.538 7	99.90	97.91	100.17	96.38	1.98	1.52
0.400 7	0.400 7	0.165 6	0.266 2	0.191 4	0.277 2	0.350 0	0.528 3	96.34	94.55				
0.405 0	0.405 0	0.167 3	0.269 0	0.191 4	0.277 2	0.360 0	0.536 0	100.68	96.32				
0.408 1	0.408 1	0.168 6	0.270 0	0.191 4	0.277 2	0.363 0	0.538 0	101.57	96.68				

注:A为大黄素,B为大黄酚。

2.3.4 样品含量测定

按拟订色谱条件,取3批(批号分别为6B01,6B02,6B03)样品,依法制备供试品溶液,精密吸取10 μ L,注入高效液相色谱仪,测定。结果见表2。

表2 样品含量测定结果(mg/粒, $n=2$)

批号	大黄素	大黄酚	总含量
6B01	0.20	0.33	0.53
6B02	0.21	0.34	0.55
6B03	0.21	0.36	0.57

3 讨论

现行标准对大黄的薄层鉴别只是以大黄酸、大黄酚对照品为检验指标,且供试品溶液色谱中大黄酸对照品斑点不清晰,对结果的判定有一定影响。本研究中增加了大黄对照药材作为检验指标,以含量测定项下的供试品溶液作为该鉴别项的供试品溶液,优化了薄层鉴别展开系统,考察了不同温度、相对湿度下薄层色谱的展开情况,结果斑点 R_f 值适宜,方法耐用性良好。

对大黄素和大黄酚的总量测定,本研究中考察了提取方式、提取时间和水解时间,发现超声处理45 min提取,沸水浴1 h水解,即可提取完全;水解后提取溶剂,比较了三氯甲烷、乙酸乙酯和乙醚3种溶剂,结果发现乙酸乙酯与三氯甲烷提取率相当,其供试品溶液色谱图中预测定峰与其他成分能达到基线分离,因此提取溶剂采用毒性较小的乙酸乙酯。

参考文献:

- [1] 陈光芝,刘燕华,孙筱林,等. HPLC法测定乙肝灵胶囊中芍药苷的含量[J]. 齐鲁药事,2006,25(4): 220-221.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:

中国医药科技出版社,2015.

- [3] 汪冰,林永强,徐丽华. 参芪胶囊的质量标准研究[J]. 中国药事,2013,27(6):592-596.
- [4] 许红辉,张永锋,李晓燕,等. 八子补肾胶囊的质量标准研究[J]. 中国药业,2011,20(7):24-25.
- [5] 杨辉. 甘草及制剂中甘草酸含量测定研究进展[J]. 中国药业,2008,17(10):73-75.
- [6] 李清林,尹华,谢斌. 补肾活血颗粒中红花、附子和甘草的薄层鉴别研究[J]. 中华中医药学刊,2013,31(4):817-818.
- [7] 李湘平,袁槎樑,李玟. 薄层色谱法定性鉴别胃可舒片中的陈皮、甘草、木香[J]. 中国医药指南,2014,12(10):51-53.
- [8] 严华,魏峰,肖新月,等. 同属不同种大黄及含大黄制剂中土大黄苷检查方法的研究[J]. 药物分析杂志,2010,30(9):1615-1620.
- [9] 沈兵,傅静芝,高洪琳. RP-HPLC法检测炎可宁片中土大黄苷方法的探讨[J]. 中国药事,2010,24(9):901-902.
- [10] 孟姝,林玉莲. 采用TLC和HPLC法检查利胆片中的土大黄苷[J]. 中成药,2012,34(6):1193-1195.
- [11] 樊宝娟,杨亚丽,杨瑞瑞,等. 大黄制剂中土大黄苷检查及含量测定的通用方法[J]. 陕西中医,2013,34(7):904-905.
- [12] 朱南霖,许菊. 牛黄消炎片中非法成分土大黄苷的检测[J]. 中成药,2013,35(4):870-871.
- [13] 徐乾丽,毛向军,宋晓宁,等. HPLC法同时测定六位安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(10):1841-1844.
- [14] 毛春芳,施忠,罗琳,等. HPLC法同时测定大黄中芦荟大黄素等11种成分的量[J]. 中草药,2014,45(16):2400-2403.
- [15] 徐冲,沈洁,夏敏,等. 一测多评法测定黄蛭内异胶囊中5种蒽醌类成分含量[J]. 中国中医药信息杂志,2018,25(4):66-70.

(收稿日期:2018-05-26)