

莲白片的质量标准研究

邹丽¹, 马静^{1,2△}

(1. 四川省食品药品检验检测院, 四川 成都 611731; 2. 电子科技大学, 四川 成都 611731)

摘要:目的 建立莲白片的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法鉴别方中白花蛇舌草,参照《中国药典》标准检查崩解时限,采用紫外可见吸收光谱(UV-VIS)法和高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)法测定总黄酮和穿心莲内酯含量。结果 白花蛇舌草的 TLC 图特征斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰;崩解时限检查符合《中国药典》的规定;总黄酮质量浓度在 11.67~140.04 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9992$) 范围内与吸光度线性关系良好,平均加样回收率为 98.91%, RSD 为 0.88% ($n=6$),供试品溶液在常温下 120 min 内稳定性良好。穿心莲内酯进样量在 0.116~11.62 μg ($r=0.9998$) 范围内与峰面积线性关系良好;平均加样回收率为 98.80%, RSD 为 1.89% ($n=6$),且供试品溶液在 12 h 内稳定。结论 所建立的方法结果准确、重复性好,可用作莲白片的质量控制方法。

关键词: 莲白片; 白花蛇舌草; 总黄酮; 穿心莲内酯; 崩解时限; 质量标准

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)17-0032-05

Quality Standard of Lianbai Tablets

ZOU Li¹, MA Jing^{1,2}

(1. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu, Sichuan, China 611731; 2. University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan, China 611731)

Abstract: **Objective** To establish the quality standard of Lianbai Tablets. **Methods** TLC method was used to identify *Hedyotis diffusa* in Lianbai Tablets. The disintegration time were checked according to the standards of the *Chinese Pharmacopoeia*. The content of total flavonoids in Lianbai Tablets was determined by UV-VIS, while the content of andrographolide in Lianbai Tablets was determined by HPLC-UV. **Results** The TLC images of *Hedyotis diffusa* showed clear spots, good separation and no interference from negative control. The disintegration time was in accordance with the provisions of the *Chinese Pharmacopoeia*. The concentration of total flavonoids was linear with absorbance in the range of 11.67~140.04 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9992$), the average recovery was 98.91%, RSD was 0.88% ($n=6$), and the stability of the test solution was good within 120 min at room temperature. The andrographolide showed good linear relationship with peak area in the range of 0.116~11.62 μg ($r=0.9998$), the average recovery was 98.80%, RSD was 1.89% ($n=6$), and the stability of the test solution was good within 12 h. **Conclusion** The established method is accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Lianbai Tablets.

Key words: Lianbai Tablets; *Hedyotis diffusa*; total flavonoids; andrographolide; disintegration time; quality standard

莲白片是由穿心莲、白花蛇舌草、石上柏等 5 味药材制成的薄膜衣片,具有抗癌、散结、止痛、止血等作用,临床常用于绒毛膜上皮癌、恶性葡萄胎、肺癌、鼻炎癌等,与放射治疗或化学治疗配合使用可缩短疗程,加快肿瘤消退。穿心莲为方中君药,具有清热解毒、凉血消肿功效,主要成分为内酯类、黄酮类和甾醇类等^[1]。穿心莲内酯具有显著的抗炎消肿作用,在穿心莲定量分析成分中占有比率较高,可作为本品含量测定的检测指标^[2-3]。白花蛇舌草为方中臣药,具有清热解毒、消痛散结功效,具有明显的抗肿瘤活性^[4],主要成分为黄酮类、有机酸类、甾醇类、多糖类等^[5-6],其中齐墩果酸的含量较高,鉴别斑点明显,也常作为白花蛇舌草鉴别的对照品。穿心莲、白花蛇舌草、石上柏等均含有黄酮类成分,其化学性质稳定,具有抗肿瘤和抗氧化自由基等活性作用,与莲白片的药理功效关系密切。本研究中建立白莲片含量

测定方法时将总黄酮作为检测指标。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KQ400KDE 型台式高功率数控清洗器(功率为 40~100 W,工作频率为 40 kHz,昆山市超声仪器有限公司);DHG-9625A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);全自动薄层铺板仪(北京思普特科技有限公司);LB-2D 型智能崩解时限测定仪(上海黄海药检仪器销售有限公司);XP205DR 型电子天平(十万分之一, Mettler Toledo 公司);LC-20AD 型高效液相泵, SPD-20A 型紫外检测器(日本岛津公司),美国奥泰 SS420X 工作站;市售硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂);自制硅胶 G 薄层板(取硅胶 G 适量,按 1 份固定相和 3 份含 0.3% 羧甲基纤维素钠的水溶液进行混匀,用薄层铺板器制成 10 cm×20 cm、厚度 0.4 mm 的硅胶 G 薄层

第一作者:邹丽,女,硕士研究生,副主任中药师,研究方向为中药质量分析,(电子信箱)1312785625@qq.com。

△通信作者:马静,回族,在读硕士研究生,副高级工程师,研究方向为中药质量标准及新药研发,(电子信箱)404565135@qq.com。

板,晾干,110℃条件下加热30 min,置干燥器存放)。

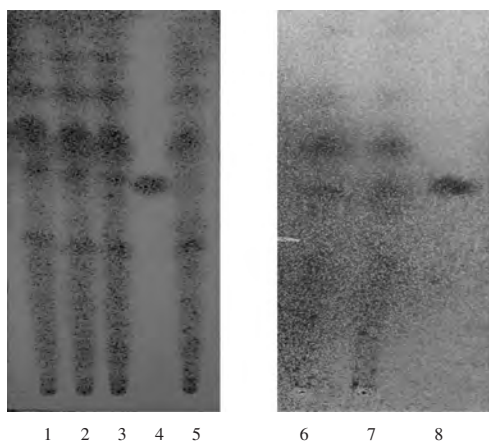
1.2 试药

乙醇、乙酸乙酯、正己烷、三氯甲烷、冰醋酸、磷钼酸、三氯化铝、醋酸钠等(分析纯,成都市方舟化学试剂厂);甲醇(色谱纯,Fisher公司);纯净水(娃哈哈集团有限公司);齐墩果酸对照品(批号为110709-201206),芦丁对照品(批号为100080-201610),穿心莲内酯对照品(供鉴别用,批号为110797-201609),白花蛇舌草对照药材(供鉴别用,批号为121183-201605),均购于中国食品药品检定研究院;莲白片(实验室自制,批号分别为20170103,20170104,20170105)。

2 方法与结果

2.1 白花蛇舌草薄层色谱鉴别

取本品适量,去薄膜衣,研细,取2 g,精密称定,加甲醇20 mL,超声处理40 min,滤过,滤液浓缩至1 mL,作为供试品溶液。取齐墩果酸对照品适量,加甲醇溶解,制成每1 mL含0.5 mg的对照品溶液;另取白花蛇舌草对照药材1 g,照供试品溶液制备方法同法制备对照药材溶液。取莲白片处方中除白花蛇舌草外的药材,通过相应制备工艺制成阴性对照品,取约2 g,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。参照2015年版《中国药典(一部)》^[7]通则0502项下方法,精密吸取对照品溶液5 μL、供试品溶液及阴性对照品溶液各10 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷-三氯甲烷-甲醇(5:5:1, V/V/V)为展开剂,上行展开15 min,取出,晾干,喷10%磷钼酸乙醇试液,在105℃下加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液及对照药材溶液相同位置上显相同颜色斑点, R_f 值0.3~0.7,斑点分离度良好,阴性对照无干扰。详见图1。



1-3. 供试品溶液 4. 对照品溶液 5. 阴性对照品溶液
6-7. 对照药材溶液 8. 对照品溶液

图1 白花蛇舌草薄层色谱图

检视条件考察时,展开后,分别喷2%三氯化铁试液或10%磷钼酸乙醇试液加热至斑点显色清晰后于日

光下检视。结果最佳检视条件为后者。薄层板选择时,分别在市售硅胶G薄层板和自制硅胶G薄层板上点样并依法展开,结果两者的特征斑点均显色清晰,分离度达到要求。

2.2 崩解时限考察

分别取3批样品各6片,参照2015年版《中国药典(四部)》^[7]通则0921崩解时限中的方法,在盐酸溶液(9→1000)中进行崩解时限考察。结果表明,3批样品均于1 h内全部崩解,符合相关规定。

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 溶液制备

取105℃减压干燥至恒重的芦丁对照品11.67 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液(每1 mL中含芦丁1.167 mg)。取莲白片适量,去包衣,取约3 g,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷70 mL,回流3 h脱脂,滤过,弃去三氯甲烷,残渣挥干,加甲醇70 mL,再加热回流2 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至25 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得供试品溶液。称取1.5 g无水醋酸钠,加入50 mL水使溶解,用冰醋酸调节pH至 4.5 ± 0.1 ,得醋酸-醋酸钠缓冲液($pH = 4.5 \pm 0.1$),备用。称取0.68 g三氯化铝,加入50 mL乙醇使溶解,得三氯化铝溶液0.102 mol/L(0.1 mol/L),备用。

2.3.2 最大吸收波长确定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各1 mL,分别置10 mL容量瓶中,依次加入0.1 mol/L三氯化铝溶液1 mL和 $pH(4.5 \pm 0.1)$ 醋酸-醋酸钠缓冲液1 mL,加甲醇稀释至刻度,摇匀,放置30 min。取续滤液置比色皿中,照紫外-可见分光光度法[2015年版《中国药典》通则0401]^[7],在200~800 nm波长范围内扫描。结果上述溶液在415 nm波长处均有最大吸收,故以此为测定波长。光谱图见图2。

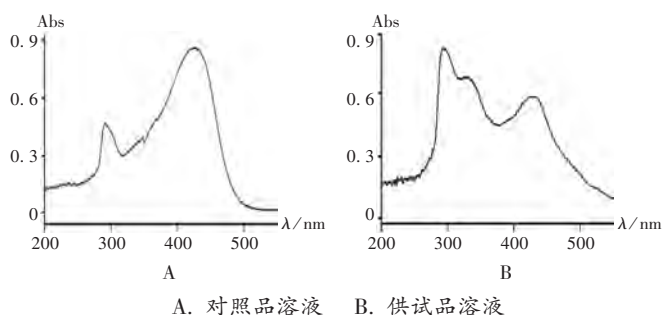


图2 紫外可见分光光谱图

2.3.3 方法学考察

专属性试验:按莲白片的处方配制缺总黄酮的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液,进行全波长(200~800 nm)扫描测定。结果阴性对照品

溶液在 415 nm 波长处基本无吸收,表明处方中其他成分对总黄酮测定无干扰。

标准曲线考察:精密量取质量浓度为 1.167 g/L 的对照品溶液 0, 0.10, 0.25, 0.50, 0.80, 1.00, 1.20 mL, 分别置 7 个 10 mL 容量瓶中,依次加入 0.102 mol/L 三氯化铝溶液 1 mL 和 pH(4.5 ± 0.1)醋酸-醋酸钠缓冲液 1 mL,加甲醇稀释至刻度,摇匀,放置 30 min。按紫外-可见分光光度法(2015 年版《中国药典》通则 0401),以第 1 管作为空白对照,415 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y)、质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.0148X + 0.1532$, $r = 0.9992$ ($n = 6$)。结果表明,总黄酮质量浓度在 11.67 ~ 140.04 μg/mL 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:精密量取质量浓度为 1.167 g/L 的对照品溶液 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,依法显色后测定吸光度。结果芦丁对照品吸光度的 RSD 为 0.42% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,依法显色,分别在室温下每隔 20 min 测定吸光度。结果吸光度 RSD 为 0.87% ($n = 6$),表明供试品溶液在 120 min 内稳定性较高。

重复性试验:取样品(批号为 20170103)适量,依法制备供试品溶液,照上述显色方法测定吸光度。结果总黄酮的平均含量为 1.947 mg, RSD 为 1.74% ($n = 6$),表明方法重复性较好。

加样回收试验:精密称取已知含量的莲白片(批号为 20170103)6 份,分别加入质量浓度为 6.82 g/L 的芦丁对照品溶液各 1 mL,依法制备供试品溶液,照上述显色方法测定吸光度,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 总黄酮加样回收试验结果 ($n = 6$)

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
1.01597	1.1526	6.610	1.671	6.82	1.624	13.297	3.321	98.05	101.60				
1.06433	1.0967	6.925	1.594	6.82	1.624	13.684	3.163	99.11	96.61				
1.10172	1.1125	7.168	1.612	6.82	1.624	13.873	3.225	98.31	99.32				
1.04857	1.1439	6.822	1.659	6.82	1.624	13.516	3.262	98.15	98.71	98.91	98.80	0.88	1.89
1.02916	1.1046	6.696	1.601	6.82	1.624	13.508	3.174	99.88	96.86				
1.11845	1.0814	7.277	1.568	6.82	1.624	14.095	3.187	99.97	99.69				

注:A 为总黄酮,B 为穿心莲内酯。

2.3.4 样品含量测定

取实验室自制 3 批样品,依法制备供试品溶液,照上述显色方法测定吸光度,从标准曲线上求出供试品溶液中总黄酮的含量。结果见表 2。

2.4 穿心莲内酯含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);

表 2 样品含量测定结果(mg, $n = 3$)

批号	总黄酮含量			穿心莲内酯含量		
	1	2	$\bar{X}$	1	2	$\bar{X}$
20170103	1.955	1.949	1.952	0.380	0.383	0.382
20170104	1.932	1.937	1.934	0.367	0.370	0.369
20170105	1.919	1.927	1.923	0.374	0.379	0.377

流动相:甲醇-水(45:55, V/V);流速:1 mL/min;柱温:35 ℃;紫外检测波长:225 nm;进样量:10 μL。

2.4.2 溶液制备

取穿心莲内酯对照品 11.62 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 1.162 g/L 的对照品贮备液;精密量取上述贮备液 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.1162 g/L 的对照品溶液;精密量取对照品溶液 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 58.1 μg/mL 的对照品溶液。取本品适量,去包衣,研细,取约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,取出放冷,用 60% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,弃去初滤液,续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得供试品溶液。取莲白片处方中除穿心莲外的其他药材,按制备工艺和供试品制备方法,同法制成阴性对照品溶液。

2.4.3 方法学考察

专属性试验:分别取 2.4.2 项下 3 种溶液各适量,按拟订色谱条件,注入高效液相色谱仪,记录色谱图(见图 3)。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液相同保留时间有相关峰出现,阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。

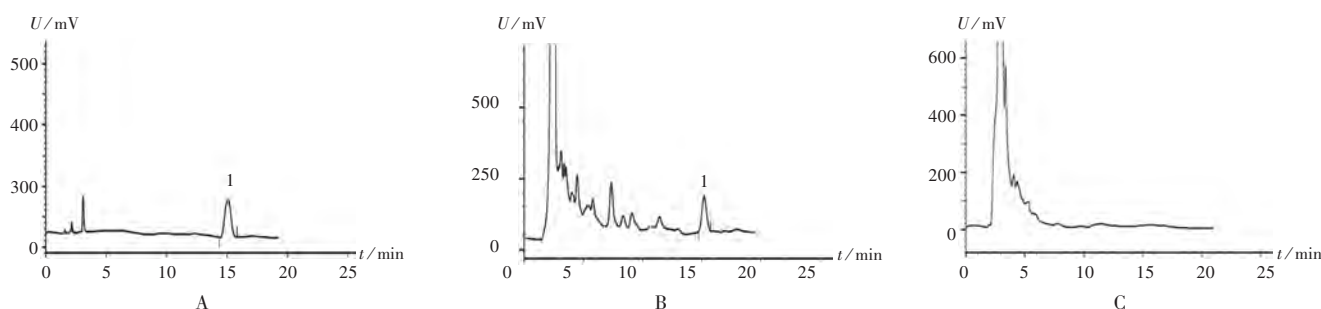
线性关系考察:精密吸取质量浓度为 58.1 μg/mL 和 1.162 g/L 的对照品溶液各 2, 5, 10 μL,注入高效液相色谱仪,以绝对进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 2245.1X - 116134$, $r = 0.9998$ ($n = 6$)。结果表明,穿心莲内酯进样量在 0.116 ~ 11.62 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取质量浓度为 58.1 μg/mL 的对照品溶液 10 μL,依法进样。结果,穿心莲内酯峰面积的 RSD 为 0.95% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品适量,按拟订方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 时测定。结果的 RSD 为 1.27% ($n = 5$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

重复性试验:取同一批样品(批号为 20170103),依法制备供试品溶液并测定,计算含量。结果穿心莲内酯平均含量为每片 0.383 mg, RSD 为 1.53% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量(批号为 20170103,含



1. 穿心莲内酯

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱图

量为每片 0.191 mg) 样品 6 份, 去包衣后研成细粉, 各 1 g, 置 6 个具塞锥形瓶中, 每份加入质量浓度为 1.624 g/L 的对照品溶液 1 mL, 依法制备供试品溶液按拟订色谱条件进样测定, 计算回收率。结果见表 1。

2.4.4 样品含量测定

取 3 批自制样品适量(每批平行取 2 份), 依法制备供试品溶液, 精密吸取质量浓度为 58.1 $\mu\text{g/mL}$ 穿心莲对照品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪测定, 并计算含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 薄层色谱条件

点样量选择时, 吸取对照品溶液、供试品溶液各 2, 5, 10, 20 μL , 点于同一羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 依法展开, 按斑点清晰度和分离度选择, 结果最佳点样量为供试品溶液 10 μL 、对照品溶液 5 μL 。展开剂选择时, 分别以乙酸乙酯-甲醇-水(8:1:1, $V/V/V$)^[8]、三氯甲烷-乙醚(5:1)^[9]、甲苯-丙酮-乙酸(10:2:0.2, $V/V/V$)^[10]和正己烷-三氯甲烷-甲醇(5:5:1, $V/V/V$)为展开剂展开并显色。结果采用前 3 种展开剂时特征斑点出现了分离度不好、拖尾严重、 R_f 值过高的情况; 而最后 1 种展开剂的斑点分离度较好, 斑点颜色清晰, R_f 值适中。故以正己烷-三氯甲烷-甲醇(5:5:1, $V/V/V$)为展开剂。

3.2 总黄酮含量测定

提取溶剂: 一般提取黄酮类成分时, 常采用 30% 乙醇、乙醇^[11]、60% 乙醇^[12]为提取溶剂, 但本试验中考察发现, 采用低浓度乙醇提取的总黄酮不完全、水溶性杂质多; 而用乙醇提取总黄酮的水溶性杂质虽少, 但含有部分脂溶性杂质。综合考虑, 莲白片采用三氯甲烷脱脂除杂, 再以甲醇为提取溶剂, 可充分提取总黄酮。

提取方法及时间: 分别直接采用超声波提取 1 h、加热回流提取 3 h、索氏连续回流提取 2 h, 结果前两者的总黄酮含量较低, 提取不完全, 提取效率较低; 而采用后一种方法提取, 总黄酮含量高, 提取时间充分, 适合作为

莲白片的提取方法。

比色方法: 分别采用硝酸铝显色法^[13]和三氯化铝显色法^[14]对莲白片中总黄酮进行测定。使用硝酸铝显色法时, 芦丁对照品溶液于 500 nm 波长处有最大吸收, 而供试品溶液于 500 nm 波长处的吸收较弱, 说明莲白片用此方法测定的专属性不强, 有一定局限性。而采用三氯化铝显色法的专属性较强, 在 415 nm 波长处的干扰小, 适合测定莲白片中的总黄酮。另外, 还考察过显色时间, 从加入显色剂开始, 每隔 5 min 测 1 次吸光度, 结果在加入显色剂后 25~35 min 时, 吸光度值变化缓慢, 无显著差异, 故确定最后的显色时间为 30 min; 三氯化铝的用量, 分别加入了 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 0.5, 1.0, 1.5 mL, 同法制成供试品溶液, 结果随着显色剂用量的增大, 吸光度先增大后缩小, 用量在 1.0 mL 时吸光度最大。

3.3 穿心莲内酯含量测定

前处理考察: 分别以甲醇^[15]、40% 甲醇^[16]和 60% 甲醇溶液为提取溶剂; 用超声波提取和加热回流提取为提取方法; 以提取 15, 30, 60 min 为提取时间对穿心莲内酯的前处理方法进行考察。结果表明, 在不同提取溶剂、提取方法及提取时间的条件下, 供试品溶液中均有与穿心莲内酯对照品溶液保留时间一致的峰, 但综合有效成分的含量、分离度、出峰时间及峰宽等因素考虑, 最终选择以 60% 甲醇为提取溶剂、超声提取 30 min。

系统耐用性试验: 分别考察了不同品牌的色谱柱 [Shim-pack C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), Diamonsil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)], 不同柱温(25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$), 不同的流动相条件[甲醇-水梯度洗脱^[17]、甲醇-水(65:35, V/V)^[18]和甲醇-水(45:55, V/V)]的差异。结果表明, 在不同品牌的色谱柱、不同比例的流动相及不同柱温条件下, 供试品溶液中均有与穿心莲内酯对照品保留时间一致的峰, 说明该色谱条件的系统适用性良好; 但从出峰时间、分离度、理论板数、基线波动、试验效率等因素的影响来考虑, 发现流动相为甲醇-