

复方守宫散的质量标准提高研究^Δ

王晓玉*, 孟 楣#, 汪永忠(安徽中医药大学第一附属医院药学部/国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230031)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3832-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.24

摘 要 目的:提高复方守宫散的质量标准。方法:采用显微鉴别法对制剂中壁虎、梅花进行显微鉴别;采用薄层色谱法(TLC)对制剂中制何首乌进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(简称“二苯乙烯苷”)的含量;色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈,流动相为乙腈-水(19:81, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为320 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μL。结果:壁虎的皮肤碎片和鳞片、梅花的花粉粒显微特征明显,阴性对照无干扰。制何首乌的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。二苯乙烯苷检测质量浓度线性范围为23~368 μg/mL($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1.0%;加样回收率为98.69%~101.61%(RSD=0.94%, $n=9$)。结论:提高的标准能更加有效地控制复方守宫散的质量。

关键词 复方守宫散;显微鉴别法;薄层色谱法;含量测定;高效液相色谱法

Study on the Improvement of Quality Standard of Compound Shougong Powder

WANG Xiaoyu, MENG Mei, WANG Yongzhong (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Anhui University of TCM/Third Level Lab of TCM Preparation, State Administration of TCM, Hefei 230031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard of Compound shougong powder. METHODS: *Gekko japonicas* and *Armeniaca mume* were identified by microscopic identification. TLC method was adopted to identify processed Fallopia multiflora qualitatively. The content of 2,3,5,4-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside (stilbene glycoside) was determined by HPLC. The determination was performed on Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (19:81, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 320 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: Microscopic characteristics of skin fragments and scales of *G. japonicas* and the pollen grains of *A. mume* were significant without interference from negative control. TLC spots of *F. multiflora* were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of stilbene glucoside were 23-368 μg/mL ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.0%. The recoveries ranged 98.69%-101.61% (RSD=0.94%, $n=9$). CONCLUSIONS: Improved standard can effectively control the quality of Compound shougong powder.

KEYWORDS Compound shougong powder; Microscopy identification method; TLC; Content determination; HPLC

复方守宫散为安徽省中医院肿瘤科特色医院制剂(批准文号:皖药制字Z20080001),由制何首乌、梅花、三七、人参、没药、壁虎6味中药组方而成,具有补虚解毒、消肿止痛之功效,主治肿瘤伴体虚、乏力、纳差、疼痛等,且不良反应小,易为患者接受,在该院应用十余年效果良好^[1-5]。该制剂原标准只建立了方中三七、人参的定性鉴别方法,其余药味尚未建立有效的鉴别项目,亦无含量测定项目,故有必要对其质量标准进一步完善和提高,从而保证其临床使用的安全性和稳定性。为此,本研究采用显微鉴别法对制剂中壁虎、梅花进行显微鉴别;采用薄层色谱法(TLC)对制剂中制何首乌进行定性

鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中制何首乌的主要成分2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(以下简称“二苯乙烯苷”)的含量,从而达到全面控制该制剂质量的目的,以保障临床用药安全、有效。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Agilent公司);BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司);HH-S型水浴锅(上海予华仪器公司);BCD-277型电冰箱(德国Siemens公司);SK3200H型超声波清洗器(上海科导仪器公司);D2F-6020型真空干燥箱(天津顺诺仪器公司);BX43型电子显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

复方守宫散(安徽省中医院制剂中心自制,批号:20150305、20150507、20150807、20150903、20151129、20151216,规格:50 g/袋);二苯乙烯苷对照品(中国食品

^Δ 基金项目:国家科技支撑计划新安医学传承与发展研究项目(No.2012BAI26B03)

* 主管药师,博士。研究方向:中药新药研发。电话:0551-62838558。E-mail: kane.wang@sohu.com

通信作者:主任中药师,教授,硕士生导师。研究方向:中药新药研发。电话:0551-62838558。E-mail:ahzyymm@163.com

药品检定研究院,批号:110844-201310,纯度:100%);硅胶G薄层板(青岛海洋化工总厂);甲醇、磷酸、乙醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

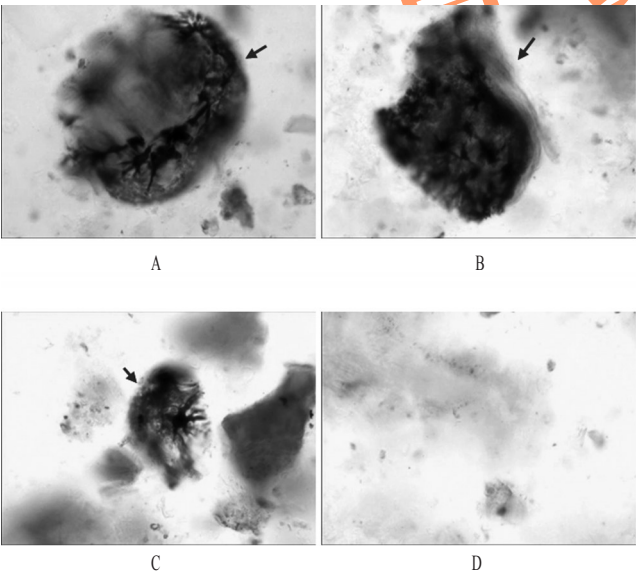
壁虎、梅花药材(安徽省中医院中草药房提供)由安徽中医药大学第一附属医院药学部孟楣主任中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 显微鉴别

取3批样品(批号:20150507、20150903、20151216)粉末少许,备用。分别按复方守宫散处方和工艺制备壁虎、梅花的单一阴性对照品。按2015年版《中国药典》“通则2001”项下的显微鉴别法,采用粉末制片法,分别置于载玻片上,加水合氯醛透化,装片,置于电子显微镜下观察,拍照并保存图像。从样品粉末中主要成分的显微特征方面进行显微鉴别,并对其显微特征加以归纳总结。

2.1.1 壁虎 (1)皮肤碎片。3批样品均可观察到壁虎皮肤碎片,且阴性对照无干扰。壁虎皮肤碎片的具体显微特征概括如下:皮肤碎片较多见,呈浅棕色或黄褐色,团块状,表面观察细胞界限不清楚,密布有棕色或黑色色素颗粒,色素颗粒多聚集呈星芒状,分枝较多^[6-7],详见图1。

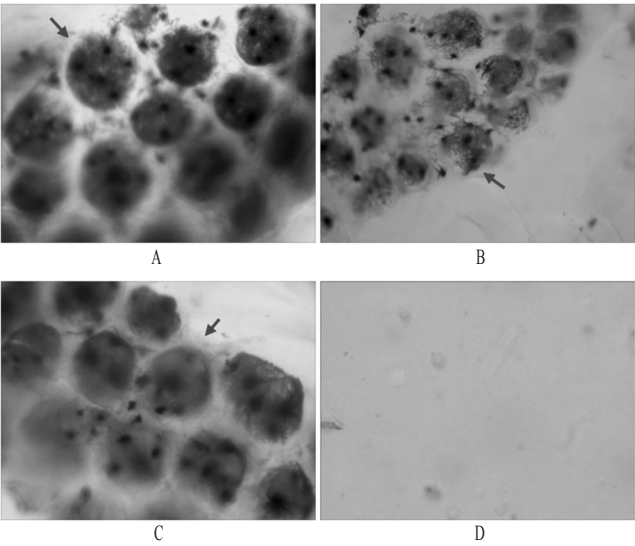


A.批号20150507样品;B.批号20150903样品;C.批号20151216样品;D.阴性对照
A.batch No.20150507 sample; B.batch No.20150903 sample; C.batch No.20151216 sample; D. negative control

图1 壁虎皮肤碎片的显微鉴别图(200×)
Fig 1 Microscopic identification of skin fragments of *Gekko japonicus* (200×)

(2)鳞片。3批样品均可观察到壁虎鳞片,且阴性对照无干扰。壁虎鳞片的具体显微特征概括如下:鳞片边缘多无色透明,单个鳞片较大,呈卵圆形、多角形、类三角形或类六角形,多呈覆瓦状排列,鳞片中分布有细小

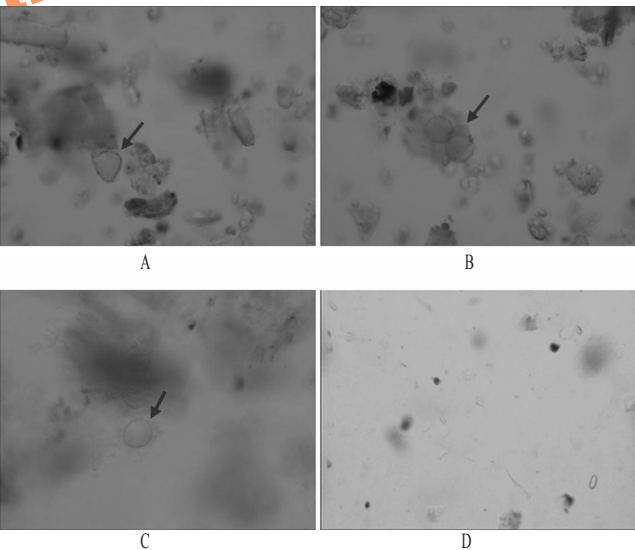
的棕褐色至黑色的组织色素颗粒^[6-7],详见图2。



A.批号20150507样品;B.批号20150903样品;C.批号20151216样品;D.阴性对照
A.batch No.20150507 sample; B.batch No.20150903 sample; C.batch No.20151216 sample; D. negative control

图2 壁虎鳞片的显微鉴别图(400×)
Fig 2 Microscopic identification of the scales of *G. japonicus* (400×)

2.1.2 梅花 3批样品均可观察到梅花花粉粒,且阴性对照无干扰。梅花花粉粒的具体显微特征概括如下:花粉粒类球形或钝三角形,直径35~45 μm,表面光滑,具3个萌发孔^[8],详见图3。



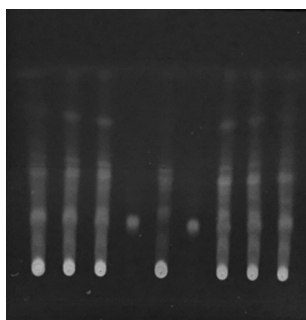
A.批号20150507样品;B.批号20150903样品;C.批号20151216样品;D.阴性对照
A.batch No.20150507 sample; B.batch No.20150903 sample; C.batch No.20151216 sample; D. negative control

图3 梅花花粉粒的显微鉴别图(200×)
Fig 3 Microscopic identification of the pollen grains of *A. mume* (200×)

2.2 制何首乌的TLC鉴别

取样品5 g,加稀乙醇40 mL,超声(功率:250 W,频

率:40 kHz,下同)处理30 min,摇匀,静置,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取二苯乙烯苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成二苯乙烯苷质量浓度为20 μg/mL的对照品溶液。按复方守宫散处方和工艺制备缺制何首乌的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[8]试验,吸取上述供试品溶液和对照品溶液各5 μL、阴性对照溶液2 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(7:3, V/V)为展开剂,展至约3.5 cm,展开,取出,晾干,再以三氯甲烷-甲醇(20:1, V/V)为展开剂,展开至约7 cm,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图4。



1~3.供试品;4.对照品;5.阴性对照
1-3.test samples;4.substance control;5.negative control
图4 薄层色谱图

Fig 4 TLC chromatograms

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(19:81, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:320 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μL^[9]。

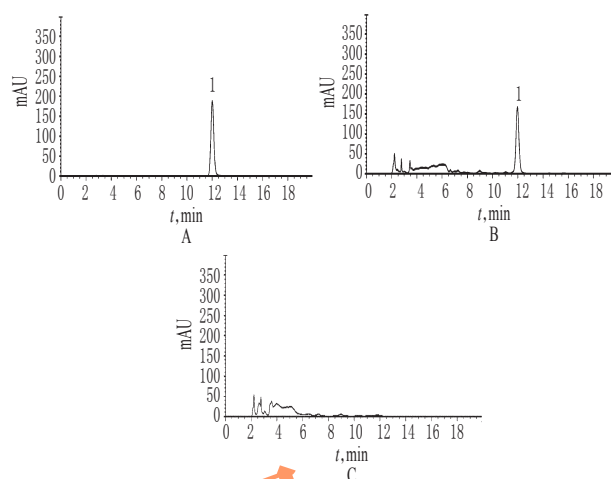
2.3.2 对照品溶液的制备 取二苯乙烯苷对照品适量,精密称定,加稀乙醇制成二苯乙烯苷质量浓度为0.23 mg/mL的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取样品约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加稀乙醇25 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,静置,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 按复方守宫散处方和工艺制备缺制何首乌的阴性样品,并按“2.3.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3.5 系统适用性试验 取“2.3.2”“2.3.3”“2.3.4”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图5。结果,供试品色谱中二苯乙烯苷峰的保留时间与二苯乙烯

苷对照品的保留时间一致,且与其他物质峰分离度>1.5,理论板数按二苯乙烯苷峰计为12 553(将理论板数定为不少于2 000为宜);阴性对照色谱中,在供试品色谱中二苯乙烯苷峰相应的保留时间处无色谱峰出现,表明阴性对照无干扰。



A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.二苯乙烯苷
A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1.stibene glucoside

图5 高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms

2.3.6 线性关系考察 分别精密量取对照品溶液(0.46 mg/mL)0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加稀乙醇定容,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μL,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以二苯乙烯苷质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y=23.371x-1.1159$ ($r=0.9999$)。结果表明,二苯乙烯苷检测质量浓度线性范围为23~368 μg/mL。

2.3.7 精密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,二苯乙烯苷峰面积的RSD=0.49%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液(批号:20150507)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,二苯乙烯苷峰面积的RSD=0.39%(n=6),表明供试品溶液室温放置10 h内基本稳定。

2.3.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20150507)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,二苯乙烯苷峰面积的RSD=0.71%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:20150507)适量,共6份,分别加入低、中、高质量的二苯乙烯苷对照品,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.250 3	1.143 9	0.981 8	2.141 5	101.61		
0.252 5	1.153 9	0.981 8	2.136 5	100.08		
0.252 0	1.151 6	0.981 8	2.120 5	98.69		
0.262 0	1.197 4	1.180 0	2.375 1	99.80		
0.258 6	1.181 8	1.180 0	2.350 0	99.00	99.83	0.94
0.254 9	1.164 9	1.180 0	2.329 8	98.70		
0.250 1	1.142 9	1.365 0	2.510 0	100.15		
0.253 0	1.156 2	1.365 0	2.527 5	100.46		
0.251 1	1.147 5	1.365 0	2.512 5	100.00		

2.3.11 样品含量测定 取6批样品各适量,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3,mg/g)

样品批号	二苯乙烯苷	平均值
20150305	4.31	
20150507	4.38	
20150807	4.39	
20150903	4.57	4.36
20151129	4.04	
20151216	4.46	

3 讨论

笔者参考2015年版《中国药典》和相关文献资料,综合考虑用显微鉴别法比较方便、快捷,更适合散剂的质量控制。因此,笔者选择对制剂中的壁虎、梅花、制何首乌、三七、人参等药味分别进行了显微鉴别研究。结果,壁虎的皮肤碎片和鳞片、梅花的花粉粒的显微鉴别特征较为明显,阴性对照无干扰,且方法重复性好,而其他药味显微鉴别均存在不同程度的阴性对照干扰。TLC鉴别中,笔者发现,制剂中制何首乌的薄层色谱斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。因此,壁虎和梅花的显

微鉴别法、制何首乌的TLC鉴别法均可作为定性鉴别考察指标,建议纳入复方守宫散的质量标准修订草案。

预试验发现,制何首乌中的水溶性成分二苯乙烯苷含量很高,而2015年版《中国药典》(一部)制何首乌的含量测定项下收录了HPLC法测定二苯乙烯苷含量的具体方法^[8]。因此,本研究确定以二苯乙烯苷作为制剂的质量控制指标。笔者参考文献[9-11]建立了制剂中二苯乙烯苷的HPLC含量测定方法,经方法学考察证实本方法简便、准确、可靠、重复性好,可有效控制该制剂质量。

综上所述,本研究所建立的标准提高方法能更加有效地控制复方守宫散的质量。

参考文献

[1] 胡金凤,夏黎明.复方守宫散临床疗效的研究现状[J].中医药临床杂志,2015,27(10):1486-1488.

[2] 张良军,夏黎明.复方守宫散联合化疗治疗晚期或术后复发胃癌30例[J].实用医学杂志,2012,28(5):837-839.

[3] 许晓洲,苏丽,凡巧云.复方守宫散联合放疗化疗治疗局部晚期非小细胞肺癌90例[J].安徽中医学院学报,2010,29(3):15-17.

[4] 卢会琴.复方守宫散治疗癌因性疲乏的临床研究[D].合肥:安徽中医药大学,2015.

[5] 孙彤,王曙光,吴飞雪,等.复方守宫散治疗肿瘤恶病质的临床观察[J].安徽中医学院学报,2003,22(6):19-20.

[6] 包华音,石俊英.壁虎药材显微鉴别质量标准研究[J].山东中医药大学学报,2014,38(5):496-497.

[7] 陈明,王玉兰.无蹠壁虎的生药学鉴定[J].福建中医学院学报,1995,5(1):31-32.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:176-177、311.

[9] 刘志辉,钱芳,陆超.HPLC法测定首乌软胶囊中二苯乙烯苷的含量[J].中国药事,2009,23(2):131-133.

[10] 李林福.制何首乌化学成分及其质量标准研究[D].北京:中国中医科学院,2008.

[11] 李奇,王伽伯,肖小河,等.何首乌不同提取物清除羟自由基的活性研究[J].中国药房,2013,24(19):1760-1762.

(收稿日期:2016-11-28 修回日期:2017-02-19)

(编辑:张 静)