

抗瘤丸的质量标准研究

冯英楠 陈菲 张鹏 庄伟 林晓兰

【摘要】 目的 建立抗瘤丸系统的质量标准,以提高其质量。**方法** 分别采用薄层色谱法对院内制剂抗瘤丸中三七、土茯苓、沉香、制何首乌及显微鉴别法对炒山楂进行定性鉴别;并用高效液相色谱法对制剂中的三七、土茯苓进行含量测定。**结果** 薄层色谱斑点清晰,阴性对照无干扰;三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、落新妇苷分别在 $0.3331 \sim 5.3302 \mu\text{g}$ ($r = 0.9999$)、 $0.7857 \sim 12.5709 \mu\text{g}$ ($r = 0.9999$)、 $0.1478 \sim 2.3654 \mu\text{g}$ ($r = 1.0000$) 范围内呈良好的线性关系,平均回收率分别为 98.70%、99.08%、98.76%。**结论** 该法灵敏、简便、准确和重复性好,可作为抗瘤丸的质量控制标准。

【关键词】 抗瘤丸; 质量标准; 高效液相色谱法; 薄层色谱法

【中图分类号】 R286 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.05.004

Quality standard for KangLiuWan FENG Yingnan, CHEN Fei, ZHANG Peng, et al. Department of Pharmacy Xuanwu, Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China
Corresponding author: LIN Xiaolan, E-mail: xllin83@163.com

【Abstract】 Objective To establish the quality standards of KangLiuWan (KLW), to improve its quality. **Methods** Thin layer chromatography (TLC) was used to qualitative identification of Notoginseng Radix et Rhizoma, Smilacis Glabrae Rhizoma, Aquilariae Lignum Resinatum, Polygoni Multiflori Radix Praeparata, and microscopic identification method was used to qualitative identification of Crataegi Fructus; HPLC was applied to quantitatively determining the contents of Notoginseng Radix et Rhizoma and Smilacis Glabrae Rhizoma. **Results** The TLC spots were clear and well-separated; Notoginsenoside R_1 , ginsenosides R_{g1} , and Chinese astilbin showed good relationships within the ranges of $0.3331 \sim 5.3302 \mu\text{g}$ ($r = 0.9999$)、 $0.7857 \sim 12.5709 \mu\text{g}$ ($r = 0.9999$)、 $0.1478 \sim 2.3654 \mu\text{g}$ ($r = 1.0000$), the average recovery were 98.70%、99.08%、98.76%, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and reproducible, and can be used as the quality control standard of KLW.

【Key words】 KLW; Quality standards; HPLC; TLC

胶质瘤是中枢神经系统最常见的一类肿瘤,呈迅速的浸润性生长,治疗困难,且生存期短,死亡率高,对人类健康威胁极大。外科手术是目前治疗脑胶质瘤的主要手段,但是由于脑胶质瘤浸润性生长的特性以及多累及脑重要功能区域或其附近,手术难以将肿瘤全部切除。放、化疗虽可杀灭肿瘤细胞,但也将损伤正常脑组织,并导致全身不良反应

的发生。

抗瘤丸是由白花蛇舌草、半枝莲、白英等 18 味中药组成的医院制剂,主要功效为利湿解毒、扶正培本、活血化瘀。用于胶质瘤之湿热蕴毒证,临床以头痛、眩晕、视物不清,或兼呕吐,舌紫黯或有瘀斑,脉沉或沉细等为特征,适用于脑胶质瘤、脑垂体瘤等见上述表现者的辅助治疗。自 1980 年应用于临床,至今已有 30 年的历史,深受广大患者的好评。于 1986 年获北京科技进步一等奖,其有效率高达 64.7%^[1];回顾性研究表明,院内制剂中药抗瘤丸可以延长恶性神经胶质瘤患者的生存时间,具有肯定疗效^[2]。笔者对抗瘤丸进行系统的质量标准研究,可有效地控制抗瘤丸质量。

基金项目:北京市科委“十病十药”专项(Z141100002214016)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院药剂科

作者简介:冯英楠(1988-),女,硕士,药师。研究方向:中药药效与作用机制研究。E-mail:fengyingnan88@163.com

通信作者:林晓兰(1963-),女,本科,主任药师。研究方向:中药制剂研发与医院药学管理。E-mail:xllin83@163.com

1 仪器与试剂

1.1 试剂

三七皂苷 R_1 (批号:110745-201318); 人参皂苷 Rb_1 (批号:110704-201424); 人参皂苷 Rg_1 (批号:110703-201128); 落新妇苷对照品 (批号:111798-201303); 三七 (批号:120941-201409); 制何首乌 (批号:121454-201405); 沉香 (批号:121222-201203); 均由中国食品药品检定研究院提供。抗癌丸:160201 批, 160202 批, 160203 批; 均由首都医科大学宣武医院提供。

1.2 仪器

SHIMADZU LC-2010Aht 高效液相色谱仪; WFH-203S 三用紫外分析仪 (上海精科实业有限公司); SHIMADZU UV-2450 紫外可见分光光度计; LD5-2A 低速离心机 (北京医用离心机厂); CPA225D 精密电子天平 (十万分之一, Sartorius); WT1003H 电子分析天平 (千分之一, 常州市万泰天平仪器有限公司); 澳浦 UB203i 显微镜 (重庆重光实业有限公司); 硅胶 G 薄层板 (烟台市化学工业研究所, 批号:120712); 硅胶 G (薄层层析用, 青岛海洋化工有限公司, 批号:0101116)。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 三七鉴别 取本品适量, 研细, 取约 3 g, 加甲醇 30 mL, 加热回流 30 分钟, 蒸干滤过液, 残渣加入水 10 mL, 搅拌至溶解, 转移到分液漏斗, 放冷后, 20 mL 乙醚振摇提取 2 次, 弃去乙醚液, 水饱和的正丁醇提取水液 2 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 用 15 mL 水洗涤, 蒸干正丁醇液, 加甲醇 1 mL 溶解残渣, 作供试品溶液。另取三七对照药材 0.5 g, 加甲醇 30 mL, 同法制得对照药材溶液。再取人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_1 、及三七皂苷 R_1 对照品, 加甲醇, 制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。取缺三七的阴性样品 3 g, 按供试品溶液的方法制备成阴性对照溶液。吸取供试品、对照药材溶液各 1 μ L、对照品溶液 4 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇: 乙酸乙酯: 水 (4:1:5) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷洒 10% 硫酸乙醇溶液, 105℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。见图 1。

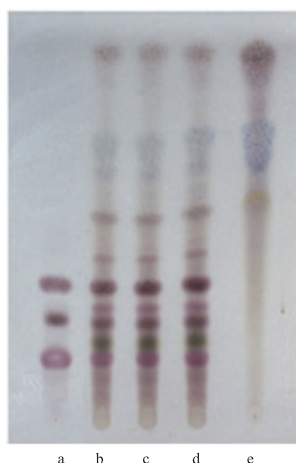
2.1.2 何首乌鉴别 取本品适量, 研细, 取约 10 g, 加甲醇 30 mL, 超声 30 分钟, 蒸干滤过液, 加 5% 氢氧化钠溶液 8 mL 溶解残渣, 过滤, 加 HCl 调节 pH 值为 2, 用 30 mL 乙酸乙酯振摇提取, 蒸干乙酸乙酯液, 加乙酸乙酯 1 mL 溶解残渣, 离心, 取上清作为供试品溶液。取制何首乌对照药材 0.5 g, 同法制得对照药材溶液。取缺何首乌的阴性样品 10 g, 按供试品溶液的方法制备成阴性对照溶液。吸取供试品溶液 5 μ L、对照药材溶液 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯: 乙酸乙酯: 甲酸 (15:2:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 置氨熏后, 斑点变为红色。见图 2。

2.1.3 土茯苓鉴别 取本品适量, 研细, 取约 0.5 g, 置三角瓶中, 加甲醇 20 mL, 超声 30 分钟, 蒸干滤过液, 加水 5 mL 溶解残渣, 通过大孔吸附树脂柱, 用水 60 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 再用 25% 乙醇 60 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 继用 50% 乙醇 60 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 加甲醇 2 mL 溶解残渣, 作为供试品溶液。另取落新妇苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。取缺土茯苓的阴性样品 0.5 g, 按供试品的方法制备成阴性对照溶液。吸取供试品 3 μ L、对照品 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯: 乙酸乙酯: 甲酸 (13:32:9) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 5% 三氯化铝乙醇溶液, 放置 5 分钟, 紫外光灯 (365 nm) 下检视, 供试品色谱中, 在与对照品相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。见图 3。

2.1.4 沉香鉴别 取本品适量, 研细, 取约 2 g, 加石油醚 (30~60℃) 30 mL, 超声 30 分钟, 蒸干滤过液, 加丙酮 2 mL 溶解残渣, 作供试品溶液。另取对照药材粉末 0.2 g, 同法制得对照药材溶液。取缺沉香的阴性样品 2 g, 按供试品的方法制备成阴性对照溶液。吸取供试品、对照药材溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷: 乙醚 (10:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 10% 硫酸乙醇溶液, 晾干, 紫外光灯 (365 nm) 下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。见图 4。

2.2 山楂显微鉴别

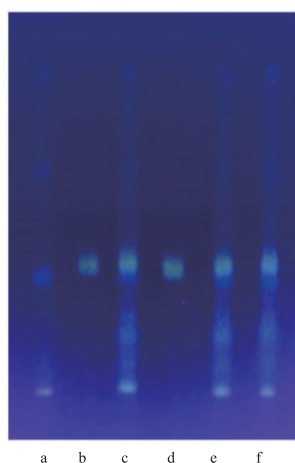
取本品, 研细, 置显微镜下观察: 果皮石细胞淡紫红色或黄棕色, 类圆形, 直径约至 120 μ m。见图 5。



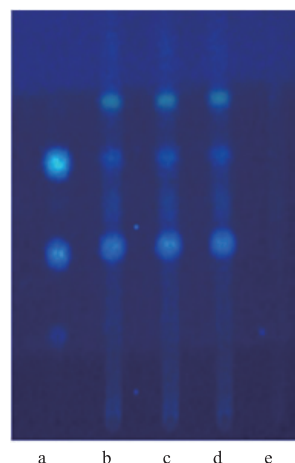
注: a. 人参皂苷 R_{b1} 、 R_{g1} 与三七皂苷 R_1 ; b. 抗瘤丸 (批号 160201); c. 抗瘤丸 (批号 160202); d. 抗瘤丸 (批号 160203); e. 三七阴性样品



注: a. 何首乌阴样品性; b. 抗瘤丸 (批号 160201); c. 抗瘤丸 (批号 160202); d. 抗瘤丸 (批号 160203); e. 何首乌对照药材



注: a. 土茯苓阴性样品; b. 土茯苓对照药材; c. 抗瘤丸 (批号 160201); d. 落新妇苷; e. 抗瘤丸 (批号 160202); f. 抗瘤丸 (批号 160203)



注: a. 沉香对照药材; b. 抗瘤丸 (批号 160201); c. 抗瘤丸 (批号 160202); d. 抗瘤丸 (批号 160203); e. 沉香阴性样品

图 1 三七薄层色谱鉴别

图 2 何首乌薄层色谱鉴别

图 3 土茯苓薄层色谱鉴别

图 4 沉香薄层色谱鉴别



图 5 山植显微鉴别

2.3 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil C_{18} (6×250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸溶液; 检测波长为 203 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃。

2.3.2 对照品溶液的制备 取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 0.1 mg、人参皂苷 R_{g1} 0.5 mg 的混合溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取本品约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 水浴回流 2 小时, 放冷, 再称定重量, 补足减重, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 先用乙醚振摇提取 3 次, 每次 20 mL, 弃去乙醚液, 再用水饱和正丁醇振摇提取 4 次, 每次

30 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 3 次, 每次 30 mL, 取正丁醇液挥干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 处方中除去三七, 按比例称取其他药材及辅料同法制成阴性对照溶液。

2.3.5 线性关系考察 三七皂苷 R_1 : 精密量取上述对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成 33.31、66.63、133.20、266.51、533.02 μ g/mL 的对照品溶液, 摇匀, 分别精密量取 10 μ L, 注入色谱仪, 测得峰面积, 以对照品进样量 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程: $Y = 300837.5833X - 2769.7782$ 。三七皂苷 R_1 在 0.3331 μ g ~ 5.3302 μ g 范围内呈良好的线性关系。

人参皂苷 R_{g1} : 方法同“三七皂苷 R_1 线性关系考察”, 配制成 78.57、157.14、314.27、628.54、1257.09 μ g/mL 的对照品溶液, 摇匀, 分别精密量取 10.00 μ L, 注入色谱仪, 测得峰面积, 绘制标准曲线。回归方程: $Y = 245606.5070X + 22209.2712$, 人参皂苷 R_{g1} 在 0.7857 μ g ~ 12.5709 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.3.6 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液 10 μ L, 重复进样 6 次, 按前文“色谱条件”项下的色

谱柱条件测定,三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 峰面积的 RSD 分别为 1.60%、1.47%,表明样品中间精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取同一批样品(20160201)1份,按前文“供试品溶液的制备”项下制备和测定法操作,分别在制备后 0、2、4、8、12、24 小时进样。在 24 小时内测得三七皂苷 R_1 平均峰面积为 267778.8, RSD=0.68%;人参皂苷 R_{g_1} 平均峰面积为 1487077.8, RSD=0.58%。表明样品在 24 小时内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 取同一批样品(20160201)连续进样 6 次,按“供试品溶液的制备”项下方法制备样品溶液,测定峰面积并计算含量。结果显示:三七皂苷 R_1 平均含量为 0.887 mg/g, RSD=1.34%;人参皂苷 R_{g_1} 平均含量为 5.961 mg/g, RSD=1.99%,表明该方法重复性良好。

2.3.9 回收率试验 取已知含量的样品 6 份,分别精密加入一定量的三七皂苷 R_1 人参皂苷 R_{g_1} ,按前文“供试品溶液的制备”项下方法制备样品溶液,在前文色谱条件测定计算回收率。结果见表 1、表 2。

2.3.10 样品含量测定 根据上述确定的三七含量测定方法,进行了抗瘤丸成品含量测定,按照“2.1.1”项下方法配制供试品溶液,测定三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 含量。结果见表 3。

表 3 三批样品三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 含量测定

批号	三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 含量之和(mg/袋)
160201	39.8
160202	38.7
160303	39.2

2.4 落新妇苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Inertsil C_{18} ;流动相:甲醇-0.1%冰醋酸溶液(39:61);检测波长为 291 nm,流速:1.0 mL/min;柱温:30℃。

2.4.2 对照品溶液的制备 落新妇苷对照品适量,精密称定,加 60% 甲醇制成每 1 mL 含落新妇苷 40 μ g 的溶液,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,取约 0.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声 30 分钟,放冷,再称定重量,补足减重,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.4 阴性对照溶液的制备 处方中除去土茯苓,按比例称取其它药材及辅料同法制成阴性对照溶液。

2.4.5 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中,分别用 60% 甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成 14.78、

表 1 三七皂苷 R_1 加样回收率试验结果

试验号	称样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
1	1.0073	0.8935	0.876	1.7441	97.10	98.70	1.82
2	1.0947	0.9710	0.876	1.8634	101.87		
3	1.0363	0.9192	0.876	1.7715	97.29		
4	1.0261	0.9102	0.876	1.7667	97.77		
5	1.0047	0.8912	0.876	1.7551	98.62		
6	1.0103	0.8961	0.876	1.7681	99.54		

表 2 人参皂苷 R_{g_1} 加样回收率试验结果

试验号	称样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
1	1.0036	5.982	5.959	11.892	99.18	99.08	1.54
2	1.0211	6.087	6.080	12.103	98.95		
3	1.0183	6.070	6.034	11.976	97.88		
4	1.0281	6.129	5.940	12.035	99.43		
5	1.0192	6.075	5.894	12.069	101.70		
6	1.0282	6.129	6.108	12.073	97.31		

表 4 落新妇苷加样回收率试验结果

试验号	称样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
1	0.4050	0.5362	0.522	1.047	97.85	98.76	0.80
2	0.4104	0.5434	0.522	1.056	98.20		
3	0.4126	0.5463	0.522	1.060	98.41		
4	0.4022	0.5325	0.522	1.054	99.90		
5	0.4092	0.5418	0.522	1.057	98.70		
6	0.4054	0.5367	0.522	1.056	99.48		

29.57、59.14、118.27、236.54 μg/mL 的对照品溶液,摇匀,分别精密量取 10 μL,注入色谱仪,测得峰面积,以对照品进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程:Y = 2278593.7544X-3132.1353。落新妇苷在 0.1478 μg ~2.3654 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.4.6 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,按前文“供试品溶液的制备”项下供试品溶液的制备和测定法操作,测定落新妇苷的 RSD=0.58%。表明样品重复性良好。

2.4.7 稳定性试验 取同一批样品(20160201)连续进样 6 次,按前文“供试品溶液的制备”项下制备和测定法操作,分别在制备后 0、2、4、8、12、24 小时进样。在 24 小时内测得落新妇苷平均峰面积为 933753.5, RSD=0.14%,表明样品在 24 小时内稳定性良好。

2.4.8 重复性试验 取同一批样品(20160201)连续进样 6 次,按前文方法制备样品溶液和测定法项下操作,测定落新妇苷的平均含量为 1.324 mg/g, RSD=0.69%,表明样品重复性良好。

2.4.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取落新妇苷对照品 11.30mg,按前文方法制备样品溶液,在前文色谱条件测定计算回收率。结果见表 4。

2.4.10 样品含量测定 根据上述确定的土茯苓含量测定方法,进行了抗瘤丸成品含量测定,按照前文中的描述配制方法配制供试品溶液,测定落新妇苷含量。结果见表 5。

表 5 三批样品落新妇苷含量测定

批号	落新妇苷(mg/袋)
160201	9.93
160202	9.65
160203	9.74

3 讨论

本研究对抗瘤丸中的君药进行定性、定量鉴

别;对臣药及贵重药进行定性鉴别,完善了抗瘤丸质量控制标准。三七薄层色谱鉴别中,以《中华人民共和国药典》2015 版^[3]的展开剂三氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇:水(15:40:22:10)展开,发现斑点模糊,分离度不佳,故以正丁醇:乙酸乙酯:水(4:1:5)为上层溶液,斑点清晰,分离度好^[4-5]。沉香薄层色谱鉴别中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。但供试品溶液比较黏稠,超过 2 μL 就很难点样,且斑点不太圆整。经文献检索^[6],喷以 10% 硫酸乙醇溶液,晾干,置紫外光灯 365 nm 下检视,在 Rf 值 0.5~0.7 处有斑点显色清晰,效果较直接检视更好。人参皂苷 Rb₁总平均回收率仅为 78.11%,且数据很难稳定。经文献检索^[1],人参皂苷 Rb₁在酸性和碱性条件下均不稳定,其水溶液在加热下也不稳定。供试品在制备过程中,氨试液洗涤后,正丁醇液呈碱性,并加热蒸干,可能会造成人参皂苷 Rb₁降解,但此为供试品制备必须步骤,无法略去,故综合考虑,放弃人参皂苷 Rb₁,仅将人参皂苷 Rg₁和三七皂苷 R₁列入正文。综上所述,本文所建标准可用于抗瘤丸的质量控制。

参 考 文 献

[1] 於堃,宋珏娴,刘倩,等. 高利治疗脑胶质瘤经验[J]. 北京中医药,2008,27(10):785-786.

[2] 庄伟,林晓兰,姜德春,等. 中药 KLW-1 治疗恶性神经胶质瘤的临床研究[J]. 中国新药杂志,2011,20(19):1894-1897.

[3] 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,2015:12.

[4] 岑艳华,蔡丽云,陈华. 活血祛瘀片中三七、大黄的薄层色谱鉴别[J]. 临床医学工程,2011,18(6):915-916.

[5] 李霄,万丹丹,郭洛宏. 薄层色谱对复方丹参片中三七皂苷 R₁和人参皂苷 Re 的鉴别[J]. 中成药,2009,31(9):1470-1472.

[6] 王晔,高沂. 八味三香散质量标准中鉴别和含量测定方法的研究[J]. 中国药学杂志,2007,42(3):232-233.

(收稿日期: 2017-02-16)
(本文编辑: 韩虹娟)