

HPLC 法同时测定抗癌平丸中 8 种成分

李晨露¹, 熊婉娟², 余霞霞¹

(1. 东南大学附属中大医院药学部, 江苏 南京 210009; 2. 武汉市第三医院药学部, 湖北 武汉 430060)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定抗癌平丸(半枝莲、肿节风、白花蛇舌草,等)中野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷的含有量。**方法** 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 210、238、335、344 nm。**结果** 8 种成分在各自范围内线性关系良好($r>0.999\ 0$), 平均加样回收率 96.89%~100.12%, RSD 0.79%~1.71%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于抗癌平丸的质量控制。

关键词: 抗癌平丸; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)08-1752-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.016

Simultaneous determination of eight constituents in Kangaiping Pills by HPLC

LI Chen-lu¹, XIONG Wan-juan², YU Xia-xia¹

(1. Department of Pharmacy, Zhongda Hospital, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Department of Pharmacy, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of scutellarin, scutellarein, funmaric acid, isofraxidin, astilbin, methyl paederoside, asperulosidic acid and asperuloside in Kangaiping Pills [*Scutellaria barbata* D. Don, *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai, *Hedyotis diffusa* Willd, etc.].

METHODS The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 210, 238, 335, 344 nm.

RESULTS Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.89%–100.12% with the RSDs of 0.79%–1.71%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Kangaiping Pills.

KEY WORDS: Kangaiping Pills; chemical constituents; HPLC

抗癌平丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂)》第二十册,临床上主要用于热毒瘀血壅滞肠胃所致的胃癌、食道癌、贲门癌、直肠癌等消化道癌症的治疗^[1]。该制剂由半枝莲、肿节风、白花蛇舌草、珍珠菜、藤梨根、香茶菜、蛇莓、兰香草、石上柏、蟾酥 10 味中药材加工而成,其中半枝莲清热解毒、化瘀止痛,为君药;肿节风清热凉血、活血通络,珍珠菜、香茶菜清热解毒、活血散瘀,藤梨根清热解毒消肿,共为臣药;白花蛇舌草、石上柏清热解毒,蛇莓清热凉

血、消肿解毒,兰香草活血散瘀,蟾酥解毒止痛,共为佐药,诸药合用,共奏清热解毒、散瘀止痛之功效^[2]。抗癌平丸对结直肠癌术后 FOLFOX 方案化疗患者效果显著,能有效改善临床症状及生活质量^[3];联合 TACE 治疗中晚期肝癌、联合 FED 方案治疗晚期胃癌的作用显著^[4-6],但现行标准未对方中成分进行定量测定;仅潘玲^[7]采用 HPLC 法测定半枝莲中野黄芩苷的含有量;孙瑶^[8]、董小平等^[9]对肿节风中异嗪皮啶进行定量控制。为了保证抗癌平丸质量的稳定性和临床疗效的均一性,本

收稿日期: 2017-11-25

作者简介: 李晨露(1984—),女,药师,研究方向为抗肿瘤药物。Tel: 18752066656, (025) 83262630, E-mail: lcl_nj@126.com

实验选择方中君药半枝莲的代表性成分野黄芩苷、野黄芩素；臣药肿节风的代表性成分反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷；佐药白花蛇舌草的代表性成分鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷作为指标成分，采用 HPLC 法同时测定其含有量，为该制剂质量评价提供有力的数据支持。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪（美国安捷伦科技公司）；ME155DU 电子天平（十万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）；KQ-250DB 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。抗癌平丸（每瓶装 1 g，批号 1607211、1609141、1703191）购于江苏鹏鹞药业有限公司。野黄芩苷（110842-201508）、反丁烯二酸（111541-201102）、异嗪皮啶（110837-201608）、落新妇苷（111798-201504）对照品购于中国食品药品检定研究院；野黄芩素（529-53-3）、鸡屎藤次苷甲酯（122413-01-8）、车叶草苷酸（25368-11-0）、车叶草苷（14259-45-1）对照品购于南京森贝伽生物科技有限公司。乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷对照品适量，50% 甲醇分别制成 9.516、5.194、0.792、0.354、0.432、0.538、0.386、0.498 mg/mL 贮备液，精密吸取适量，置于同一 50 mL 量瓶中，50% 甲醇分别制成 475.8、259.7、39.6、17.7、21.6、26.9、19.3、24.9 μg/mL 溶液，即得。

2.2 供试品溶液制备 取丸剂适量，研细，过 80 目筛，精密称取约 1.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 50% 甲醇，称定质量，超声提取 30 min，放冷，擦干外壁，50% 甲醇补足缺失的质量，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.3 阴性供试品溶液制备 严格按照丸剂处方和生产工艺，分别制备缺半枝莲、肿节风、白花蛇舌草的阴性供试品，按“3.2”项下方法制备，即得。

2.4 色谱条件与系统适用性试验 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0~13 min，16.0% A；13~22 min，16.0%~27.0% A；22~35 min，27.0%~35.0% A；35~46 min，35.0%~40.0% A；46~55 min，40.0%~16.0% A）；0~

22 min 在 335 nm^[7,10-11] 波长下检测野黄芩苷、野黄芩素，22~30 min 在 210 nm^[12-13] 波长下检测反丁烯二酸，30~35 min 在 344 nm^[8,12,14] 波长下检测异嗪皮啶、落新妇苷，35~55 min 在 238 nm^[15-16] 波长下检测鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷；体积流量 0.9 mL/min；柱温 30℃；进样量 10 μL，色谱图见图 1。由图可知，各成分色谱峰分离度良好（>1.5），理论塔板数均不低于 3 500，阴性无干扰。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下贮备液各 2.0 mL，50% 甲醇稀释至 20 mL，摇匀，作为线性回归混标溶液 1，精密量取适量，50% 甲醇分别稀释 2、5、10、15、20 倍，作为线性回归混标溶液 2、3、4、5、6，在“2.4”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系
Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)	r
野黄芩苷	$Y = 7.2318 \times 10^5 X + 239.4$	47.58~951.60	0.999 9
野黄芩素	$Y = 5.9746 \times 10^5 X + 405.7$	25.97~519.40	0.999 6
反丁烯二酸	$Y = 1.9347 \times 10^6 X - 270.8$	3.96~79.20	0.999 5
异嗪皮啶	$Y = 8.3548 \times 10^5 X + 185.3$	1.77~35.40	0.999 7
落新妇苷	$Y = 9.8347 \times 10^5 X + 266.0$	2.16~43.20	0.999 3
鸡屎藤次苷甲酯	$Y = 1.3029 \times 10^6 X + 216.8$	2.69~53.80	0.999 6
车叶草苷酸	$Y = 9.0573 \times 10^5 X - 333.1$	1.93~38.60	0.999 5
车叶草苷	$Y = 1.2051 \times 10^6 X - 457.5$	2.49~49.80	0.999 8

2.5.2 精密度试验 取“2.1”项下对照品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定 6 次，测得野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷峰面积 RSD 分别为 0.51%、0.65%、0.82%、1.18%、1.43%、1.00%、1.03%、0.96%，表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取丸剂（批号 1607211）适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，在“2.4”项色谱条件下进样测定，测得野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷含有量 RSD 分别为 0.83%、0.96%、1.10%、0.32%、1.17%、0.99%、1.31%、1.25%，表明该方法重复性良好。

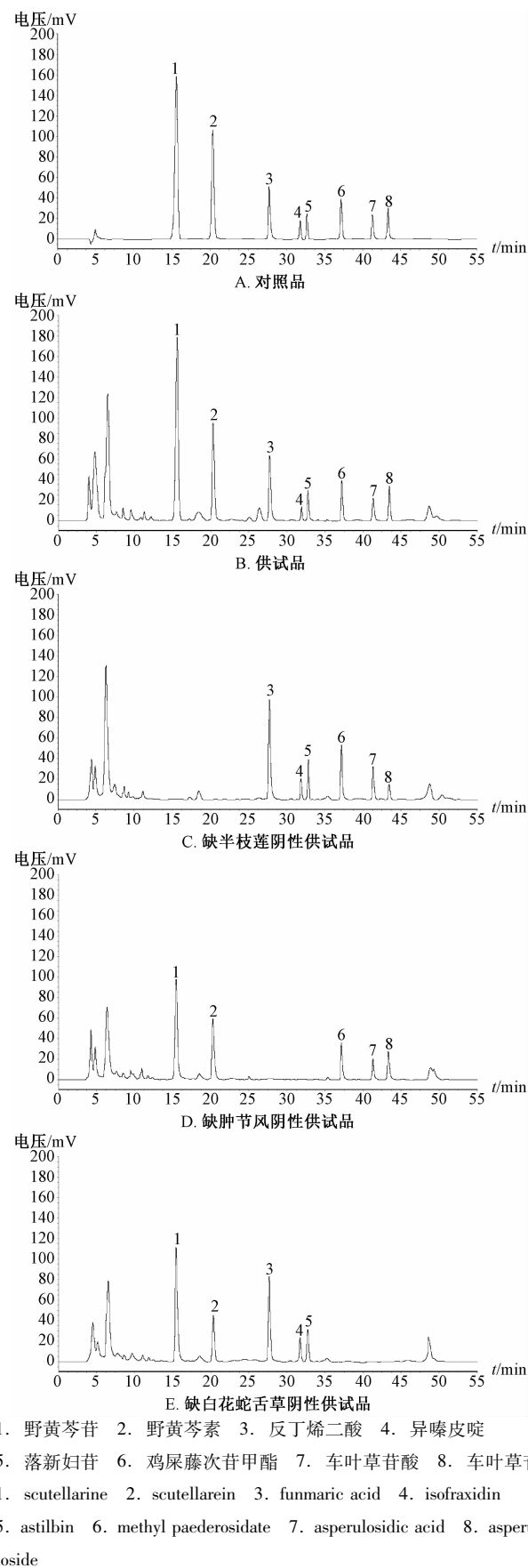


图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

1754

2.5.4 稳定性试验 取丸剂（批号1607211）适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，室温下于0、2、4、8、12、16 h在“2.4”项色谱条件下进样测定，测得野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷峰面积RSD分别为0.55%、0.72%、0.91%、1.47%、1.25%、1.11%、1.33%、1.20%，表明供试品溶液在16 h内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷对照品适量，50% 甲醇分别制成2.159、2.072、1.075、0.386、0.581、0.719、0.463、0.626 mg/mL对照品溶液。取含有量已知的丸剂（批号1607211）适量，研细，过80目筛，精密称取6份，每份约0.5 g，置于具塞锥形瓶中，按1：1比例加入适量对照品溶液，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定。结果，各成分平均加样回收率分别为100.12%、98.59%、97.98%、96.89%、97.54%、98.15%、98.47%、99.27%，RSD分别为0.79%、1.65%、1.06%、0.87%、1.46%、1.27%、1.71%、0.98%。

2.5.6 样品含有量测定 取3批丸剂，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果（mg/g，n=3）

成分	批号		
	1607211	1609141	1703191
野黄芩苷	25.936	27.226	26.950
野黄芩素	12.419	11.382	11.507
反丁烯二酸	2.144	2.202	1.971
异嗪皮啶	0.771	0.704	0.805
落新妇苷	1.159	1.200	1.056
鸡屎藤次苷甲酯	1.436	1.553	1.299
车叶草苷酸	0.932	0.846	0.969
车叶草苷	1.248	1.149	1.297

3 讨论

3.1 流动相筛选 本实验以野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷分离效果和色谱峰基线平稳情况为指标，考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸^[10]、乙腈-磷酸^[8,12,15]、乙腈-冰醋酸^[7,10]，发现乙腈-磷酸体系最理想。在此基础上，又对磷酸

体积分数（0.05%^[15]、0.1%^[8,12]）进行比较，同时摸索流动相梯度洗脱比例，最终确定以乙腈-0.1%磷酸为流动相，按“2.4”项下比例梯度洗脱。

3.2 供试品溶液制备方法筛选 本实验考察了不同提取溶剂（30% 甲醇^[16]、50% 甲醇^[15]、甲醇^[8]、30% 乙醇^[14]、50% 乙醇^[12]、乙醇^[13]）对各成分提取率和色谱峰分离情况的影响，发现以50% 甲醇为提取溶剂时各成分提取率最高，而且均能达到有效分离。在此基础上，以各成分提取率 and 操作便捷性为指标，又对提取方式（超声提取、水浴回流、索氏提取）和提取时间（15、30、45 min）进行比较，最终确定供试品溶液制备方法为50% 甲醇超声提取30 min。

4 结论

本实验建立 HPLC 法同时测定抗癌平丸中野黄芩苷、野黄芩素、反丁烯二酸、异嗪皮啶、落新妇苷、鸡屎藤次苷甲酯、车叶草苷酸、车叶草苷的含量，该方法简便快捷，灵敏度较高，重复性好，可用于该制剂的质量控制。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准（中药成方制剂第二十册）[S]. 北京：人民卫生出版社，1998：134.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：117，223-224.

[3] 方 钱，徐洪根，邵春法，等. 抗癌平丸对结直肠癌术后 FOLFOX 方案化疗患者的临床疗效[J]. 中国生化药物杂志，2017，37(2)：93-96.

[4] 张杰峰. 抗癌平丸联合肝动脉栓塞化疗术在 30 例中晚期肝癌中的临床应用[J]. 重庆医学，2010，39（5）：563-564.

[5] 陈 丽. 抗癌平丸联合肝动脉栓塞化疗术治疗中晚期肝癌临床研究[J]. 中医学报，2016，31(1)：23-25.

[6] 刘铁成，郑荣生，俞秀琴. 抗癌平丸联合 FED 方案治疗晚期胃癌的临床研究[J]. 中华全科医学，2009，7（9）：921-923.

[7] 潘 玲. HPLC 法测定抗癌平丸中野黄芩苷的含量[J]. 中国药房，2008，19(3)：203-204.

[8] 孙 瑶. 抗癌平丸质量标准的研究[J]. 药学与临床研究，2009，17(6)：472-474.

[9] 董小平，王 慧，王 玉，等. 抗癌平丸质量标准研究[J]. 中成药，2005，27(3)：359-360.

[10] 田新宇，范翠梅，渠田田，等. 半枝莲总黄酮中 7 种成分的含量测定及抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(1)：53-59.

[11] 王秀芹，林 彤. 半枝莲配方颗粒质量标准的研究[J]. 中成药，2017，39(7)：1524-1527.

[12] 张广财，张 朔，李可强，等. 高效液相色谱波长切换法同时测定肿节风中多指标成分的含量[J]. 中国医院药学杂志，2008，28(23)：2051-2052.

[13] 王 砚，王钢力，姚令文，等. 肿节风药材中反丁烯二酸和异嗪皮啶的含量测定[J]. 华西药学杂志，2005，20(1)：60-62.

[14] 林培玲，曾建伟，魏艺聪，等. HPLC 法同时测定草珊瑚中 7 个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志，2013，33(9)：1512-1517.

[15] 杨培民，曹广尚，李 芳，等. 基于高效液相色谱-二极管阵列检测法测定白花蛇舌草中 5 个环烯醚萜成分的含量[J]. 中国医院药学杂志，2015，35(1)：9-12.

[16] 温丽荣，姚志红，陈 妍，等. 高效液相色谱法同时测定白花蛇舌草中 6 个成分的含量[J]. 中国药学杂志，2014，49(5)：406-411.