

反相高效液相色谱法测定体外培育牛黄制剂牛黄上清胶囊中胆红素的含量

★ 刘海涛 (江西天施康中药股份有限公司 鹰潭 335000)

摘要:目的:建立反相高效液相色谱法测定体外培育牛黄制剂牛黄上清胶囊中胆红素的含量的方法。方法:固定相:Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:二甲基亚砜-乙腈-0.5 mol/L 醋酸铵缓冲液(用冰醋酸调 pH 值为 5.3)(6:6:7);流速 1.0 mL/min;检测波长 452 nm。结果:胆红素在 7.30~72.93 μg/ml 的浓度范围内,线性关系良好($r=0.9999$);胆红素平均回收率($n=6$)99.4%($RSD=1.33\%$)。结论:该含量测定方法快速、准确、有效,可以用于含体外培育牛黄的牛黄上清胶囊的质量控制。

关键词:胆红素;体外培育牛黄;牛黄上清胶囊;反相高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**B

牛黄上清胶囊是根据 90 版《中国药典》所载的牛黄上清丸剂改而成的中药新药。该药处方由牛黄、薄荷、菊花等 19 味中药组成。具有清热泻火,

散风止痛功效。牛黄具有清心、开窍、豁痰、凉肝、息风、清热解毒的作用,为该药之君。

在牛黄上清胶囊质量标准中,作为君药的牛黄

3.3 白英甾体皂苷对正常脾细胞的毒性作用

用 MTT 方法测定了白英甾体皂苷对小鼠脾细胞的细胞毒性,试验结果见表 7。结果显示白英甾体皂苷对小鼠脾细胞亦显示一定的细胞毒性,但对比肿瘤细胞的 IC₅₀ 值可见,白英甾体皂苷对正常细胞毒性相对较低。

表 7 白英甾体皂苷对小鼠脾细胞的毒性 IC₅₀

| 药物浓度(μg/ml) | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 |
|------------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 抑制率 | 2.31±1.04 | 4.49±2.03 | 8.64±1.34 | 24.9±1.35 | 57.85±2.71 |
| IC ₅₀ | 32.27±1.77 | | | | |

4 讨论

肿瘤防治方法主要有手术治疗、化学药物治疗、放射治疗治疗、中医治疗、生物治疗、基因治疗等方法,中医治疗具有副作用小等优点。本试验结果表明,白英甾体皂苷对 S₁₈₀ 细胞等五个有代表性的肿瘤细胞都有增殖抑制作用,尤其对 HeLa 细胞、人白血病 HO-8 910 细胞的抑制作用更加显著。表明白英甾体皂苷的抑制肿瘤生长具有普遍性,只是抑制程度稍有不同。任氏^[5]等人的研究也表明白英总苷对人肝癌 BEL-7402 细胞及人胃腺癌 SGC-7901 有显著的抑制作用。因此白英甾体皂苷的抑制肿瘤的作用还是比较广泛的。

为了进一步研究白英甾体皂苷抑制肿瘤细胞增殖的时效和量效关系,本试验以台盼蓝拒染细胞方法测定了白英甾体皂苷处理 HeLa 细胞后的生长曲线,试验结果显示白英甾体皂苷以浓度和时间依赖

性地抑制肿瘤细胞增殖。在作用 48 小时后作用已经比较明显,继续作用到 72、96 小时作用更加明显,显示白英的抗癌作用有比较长的药效作用。

现在临床上的很多药物由于对肿瘤细胞的选择性不强、全身用药毒性较大,而限制了其进一步的使用。本实验进一步研究了白英甾体皂苷对小鼠脾细胞的细胞毒性,结果显示白英甾体皂苷对小鼠脾细胞虽然有一定的细胞毒性,但是对比对 HO-8 910、HeLa、S₁₈₀ 等肿瘤细胞的 IC₅₀ 值可见,白英甾体皂苷对于正常细胞的毒性相对较小,此结果提示白英甾体皂苷对肿瘤细胞的抑制作用有一定的选择性。

总之,本试验显示白英甾体皂苷具有较强的抗肿瘤作用,这种作用呈现一定的时效和量效关系,白英甾体皂苷对正常细胞毒性很小。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:291.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:700.
- [3] 孙立新,任靖,王敏伟,等. 白英水提物抗肿瘤作用的初步研究[J]. 中草药,2006,37(1):98-100.
- [4] 任靖,冯国楠,王敏伟,等. 白英乙醇提取物抗肿瘤作用初步研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(6):497-500.
- [5] 任靖,冯国楠,王敏伟,等. 白英总苷抗肿瘤作用初步研究肿瘤防治研究[J]. 2006,33(4):262-264.

(收稿日期:2009-04-09 责任编辑:查青林)

只有鉴别检项,没有含量测定项,要求不甚严格,难以较好地控制成品的质量。为提高功效,更好的控制产品质量,拟用体外培育牛黄投料,并用反相高效液相色谱法测定牛黄上清胶囊中胆红素的含量。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:安捷伦 1200 泵,二极管阵列检测器化学工作站:安捷伦化学工作站。色谱柱:Hypersil BDS C₁₈;胆红素(批号:100077-200402,供含量测定用)由中国药品生物制品检定所提供。水为超纯水,乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

样品:牛黄上清胶囊,批号 20061001、20061002、20061003、090601、090602、090603 江西天施康弋阳制药有限公司生产;牛黄上清胶囊阴性样品(缺体外培育牛黄)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

参考文献[1],色谱柱 Hypersil BDS C₁₈柱;流动相:二甲基亚砷-乙腈(7:3);检测波长:452 nm;流速:1.0 ml/min。

2.2 溶液制备

对照品溶液制备^[2]:取经五氧化二磷干燥至恒重的胆红素对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加二甲基亚砷-乙腈(7:3)制成每 1 ml 含 40 μg 的溶液,即得。

供试品溶液的制备^[2]取本品装量差异检查项下的内容物,混匀,取约 0.3 g,精密称定,置 25 ml 棕色量瓶中,精密加入二甲基亚砷-乙腈(7:3)20ml,称定重量,超声处理 10 分钟,放冷,称定重量,用二甲基亚砷-乙腈(7:3)补足失重、摇匀,滤过,备用。

阴性样品溶液的制备:同供试品溶液的制备方法。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 取牛黄上清胶囊阴性样品,按正文中供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液,按正文条件测定,比较供试品溶液色谱及胆红素对照品色谱,结果阴性样品中其他成分对胆红素峰无干扰,供试品溶液色谱图中胆红素峰峰型对称、分离度高(理论塔板数 7519,对称因子 1.03,分离度 $R = 10.19$)。

2.3.2 线性关系 精密称取的胆红素对照品 9.12 mg,置 50 ml 量瓶中,加二甲基亚砷-乙腈(7:3)溶解并稀释至刻度,摇匀。依次精密吸取 1、2、4、6、8、10 mg,各置 25 ml 棕色量瓶中,加二甲基亚砷-乙腈(7:3)稀释至刻度,摇匀,得 6 个浓度的对照品溶液。分别精密吸取 5 μl 注入液相色谱仪,按正文色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,进样浓度为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $y = 22.411x$

+9.122 5, $r = 0.999 9$ 。结果表明胆红素浓度在 7.30 ~ 72.93 μg/ml 之间呈良好线性。

2.3.3 精密度试验 精密吸取对照品溶液(38.36 μg/ml),连续进样 6 次,依法测定,结果 RSD 为 0.84%,表明进样精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取本品(批号 20061001)内容物依法制备供试品溶液,依法测定,以后每隔一定时间进样一次,结果供试品溶液在 6 小时内峰面积无明显变化(相对标准偏差为 1.32%)。

2.3.5 重复性试验 取本品(批号 07060201),照正文中【含量测定】项下方法,将样品重复测定 6 次,结果见表 5。胆红素平均含量为 2.886 mg/g, RSD = 0.68%。

2.3.6 回收率试验 采用加样回收试验,取已知含量的本品(批号 20061001,胆红素含量 2.886 mg/g)适量,研细,取约 0.15 g,精密称定,置棕色量瓶中,分别精密添加胆红素对照品溶液(浓度 36.48 μg/ml)10 ml,再分别精密加入二甲基亚砷-乙腈(7:3)10 ml,同法制备 6 份,按正文中【含量测定】项下方法试验,计算回收率,结果平均回收率为 99.4%, RSD 为 1.33%。

2.4 样品测定

取本品 6 批,按 2.2 依法测定,测定结果见表 1。

表 1 6 批牛黄上清胶囊的含量 mg·粒⁻¹

| 批号 | 胆红素含量(mg/粒) |
|----------|-------------|
| 20061001 | 0.866 |
| 20061002 | 0.722 |
| 20061003 | 0.681 |
| 090601 | 0.798 |
| 090602 | 0.803 |
| 090603 | 0.765 |

3 讨论

牛黄是牛黄上清胶囊的君药,胆红素是牛黄解热、抗炎及抗感染的主要成分。以其中胆红素作为指标成分进行含量测定是科学、合理的。

牛黄主要成分胆红素的含量测定方法有紫外分光光度法、高效液相法、反相高效液相色谱法等,文中所用方法提取简便、专属性强、分离度高、结果准确,6 批样品测定结果表明含量基本稳定,故可作为该样品的含量控制方法。

参考文献

- [1]方建国,王文清,蒋平,等.反相高效液相色谱法测定体外培育牛黄中胆红素的含量.医药导报,2006,25(7):694-695.
- [2]刘乃强,张晓丹,李振国,等.感冒通片中胆红素的含量测定.中国药学杂志,2000,35(11).

(收稿日期:2009-08-15 责任编辑:查青林)