

消石通颗粒质量标准研究*

崔恩忠,唐安福,贡磊,汤淦[△]

(中国人民解放军东部战区总医院制剂科,江苏南京 210002)

摘要:目的 建立消石通颗粒的质量控制方法。方法 对方中金钱草、鸡内金和甘草3味药进行薄层色谱(TLC)鉴别,同时采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂所含绿原酸总量。结果 TLC色谱图中斑点清晰,专属性强;绿原酸质量浓度在7.12~35.60 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好,平均回收率为101.29%,RSD为2.29%(n=9)。结论 所建立的TLC定性鉴别方法简便、重复性好,定量方法准确、可靠,可作为消石通颗粒的质量标准。

关键词:消石通颗粒;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;绿原酸

中图分类号:R932;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)11-0050-03

Quality Standard of Xiaoshitong Granules

CUI Enzhong, TANG Anfu, GONG Lei, TANG Hao

(Department of Pharmaceutical Preparation, General Hospital of Eastern Theater Command of PLA, Nanjing, Jiangsu, China 210002)

Abstract: Objective To establish the quality control method of Xiaoshitong Granules. **Methods** TLC method was used for qualitative identification of the *Lysimachia christinae*, *Gallus gallus domesticus* and *Radix Glycyrrhizae*. HPLC method was used for content determination of the total chlorogenic acid in this preparation. **Results** TLC spots were clear with strong specificity. The linear relationship of chlorogenic acid content was good in the range of 7.12–35.60 μg/mL, the average recovery was 101.29%, RSD was 2.29% (n=9).

Conclusion The established TLC qualitative identification method is simple, reproducible, accurate and reliable, which can be used as the quality standard of Xiaoshitong Granules.

Key words: Xiaoshitong Granules; quality standard; TLC; HPLC; chlorogenic acid

消石通颗粒为我院院内制剂,由金钱草、冬瓜皮、徐长卿、海金沙、车前子、鸡内金、石韦、白茅根、瞿麦、篇蓄和甘草共11味中药组方,具有清热解毒、利尿通淋的功效,主治石淋,用于尿路结石、尿路感染等,处方复杂,所含药味种类繁多,成分复杂。因此本试验中采用薄层色谱(TLC)法对方中金钱草、鸡内金和甘草3味药进行鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中所含绿原酸总量进行测定,进一步完善其质量标准^[1-3],从而更好地控制其质量^[4-5]。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:Waters 1525型高效液相色谱仪,DAD二极管阵列检测器(美国Waters公司);FA1104型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ-500DE型超声机(昆山市超声仪器有限公司);调温电热器(南通通州申通电热器厂);HH-6型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

试药:对照药材金钱草(批号为120923-201113),鸡内金(批号为121072-201109),甘草(批号为110756-200110),对照品绿原酸(批号为110753-200413),均购自中国食品药品检定研究院;消石通颗粒(医院自制,批号分别为150316,150504,151213,

160627,161115);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

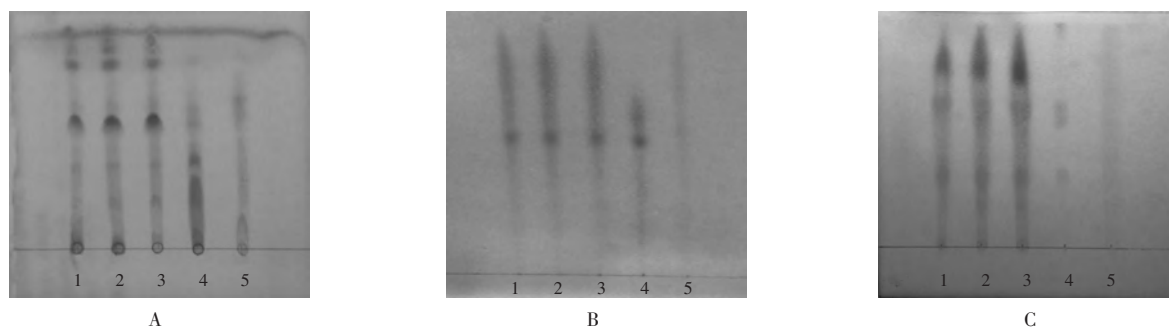
金钱草:取样品,研细,称取40g,加100mL乙醇回流2h,过滤,取滤液,蒸干,加30mL水溶解,分别用10mL乙酸乙酯萃取3次,合并萃取液,蒸干后加甲醇2mL溶解,作为供试品溶液。另取金钱草对照药材1g,粉碎,加50mL水煎煮3次,每次1h,合并煎液并浓缩至30mL,过滤,取滤液,蒸干,残渣加30mL水溶解,用乙酸乙酯萃取,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。再按处方比例称取缺金钱草的处方药材,制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照TLC法试验^[1],分别吸取供试品溶液、对照药材溶液与阴性对照品溶液10,20,20 μL进样,展开剂为甲苯-二氯甲烷-丙酮-甲醇(35:25:30:10, V:V:V:V),展开,取出,晾干,并喷5%磷钼酸乙醇溶液。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点,阴性对照无干扰(图1A)。

鸡内金:取本品,研细,称取40g,加100mL乙醇回流1h,过滤,取滤液,蒸干,加30mL水溶解,醇沉后静置2h,过滤,取滤液,将乙醇蒸干,加30mL水与1mL盐

*基金项目:全军医疗机构制剂标准提高科研专项课题面上项目[14ZJZ16-3]。

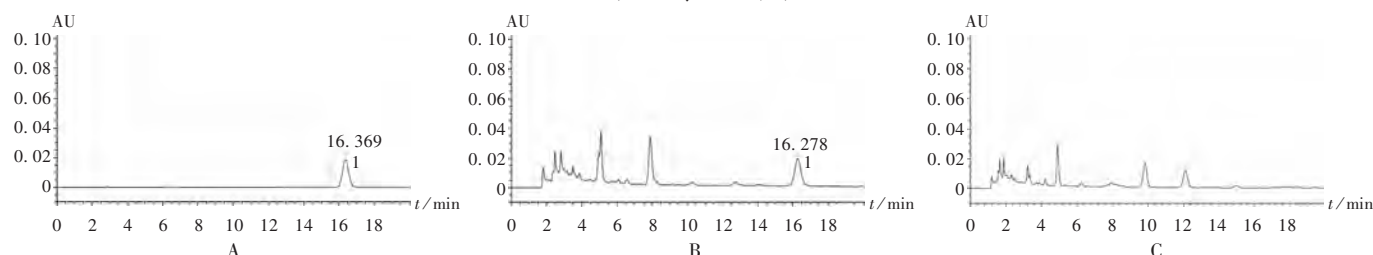
第一作者:崔恩忠,男,大学本科,药师,研究方向为中药制剂,(电话)025-80860343。

[△]通信作者:汤淦,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药制剂新技术,(电子信箱)tang_hao0518@sina.com。



1-3. 供试品溶液(批号分别为 150316, 150504, 15213) 4. 对照药材溶液 5. 阴性对照品溶液
A. 金钱草 B. 鸡内金 C. 甘草

图1 薄层色谱图



1. 绿原酸

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 专属性试验高效液相色谱图

酸,加热回流 1 h,放冷,用 15 mL 正丁醇萃取 3 次,合并萃取液,蒸干,加甲醇 2 mL 溶解,作为供试品溶液。另取鸡内金对照药材 1 g,粉碎,加 50 mL 水与 1 mL 盐酸,煎煮 3 次,每次 1 h,合并煎液并浓缩至 30 mL,醇沉,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。再按处方比例称取缺鸡内金的处方药材,制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照 TLC 法试验^[1],吸取上述 3 种溶液各 20 μ L 进样,展开剂为正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5, V: V: V)的上层溶液,展开,取出,晾干,并喷 0.2% 茚三酮乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘约 5 min 至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点,阴性对照无干扰(图 1 B)。

甘草:取本品,研细,称取 30 g,加 50 mL 甲醇超声 30 min,过滤,取滤渣,挥干,加适量水溶解,用 20 mL 乙酸乙酯萃取 2 次,合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。另取甘草对照药材 0.25 g,粉碎,加 20 mL 乙醚超声 30 min,弃去乙醚液,滤渣挥干,加 20 mL 甲醇超声 30 min,过滤,残渣蒸干后加甲醇 1 mL 溶解,作为对照药材溶液。再按处方比例称取缺甘草的处方药材,制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照 TLC 法试验^[1],吸取上述 3 种溶液各 4 μ L 进样,展开剂为正丁醇-冰醋酸-水(4:1:5, V: V: V)的上层溶液,展开,取出,晾干,并喷 0.2% 茚三酮乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘约 5 min 至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相

同颜色的斑点,而阴性对照无干扰(图 1 C)。

2.2 绿原酸含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.4% 冰醋酸溶液(20:80, V: V);检测波长:327 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液制备

取绿原酸对照品适量,精密称定,加甲醇适量,制成每 1 mL 含 35.6 μ g 的溶液,即得对照品溶液。取样品 10 g,精密称定,置 100 mL 烧杯中,加约 90 mL 沸水,搅拌溶解,放冷后离心 5 min(5 000 r/min),取上清液,加水定容至 100 mL,搅匀,即得供试品溶液。按比例称取处方药材饮片(除金钱草、石韦、篇蓄、白茅根、车前子外),根据制剂工艺制备消石通颗粒阴性样品,依法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取 2.2.2 项下 3 种溶液各 10 μ L,按拟订色谱条件进样测定,结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应保留时间处有同一色谱峰,而阴性对照无干扰。详见图 2。

线性关系考察:分别精密量取对照品溶液 8,6,5,4,2 mL,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制成质量浓度为 35.6,28.48,21.36,17.14,14.24,7.12 μ g/mL 的系列对照品溶液,各吸取 10 μ L,按拟订

色谱条件测定,以进样质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 29\,121X + 25\,142$, $r = 0.999\,2$ ($n = 6$)。结果表明,绿原酸质量浓度在 $7.12 \sim 35.60\, \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一对照品溶液,精密吸取 $10\, \mu\text{L}$,按拟订色谱条件连续进样 5 次,记录绿原酸峰面积。结果的 RSD 为 0.69% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为 150316)适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样,在常温下分别于 $0, 2, 4, 6, 8, 12\, \text{h}$ 时进样,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.80% ($n = 6$),表明供试品溶液在 $12\, \text{h}$ 内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为 150316)6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定峰面积,计算含量。结果的 RSD 为 2.13% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取绿原酸对照品 $17.80\, \text{mg}$,精密称定,置 $100\, \text{mL}$ 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得 $178\, \mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备液。取已知含量的样品(批号为 150316,绿原酸含量为 $0.145\, \text{mg/g}$),研细,取粉末 9 份各 $5.00\, \text{g}$,平均分成 3 组,分别精密加入对照品贮备液 $3.30, 4.00, 5.00\, \text{mL}$,依法制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果见表 1。

表 1 绿原酸加样回收试验结果 ($n = 9$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
5.04	0.730 80	0.587 4	1.337 7	103.32		
5.08	0.736 60	0.587 4	1.307 2	97.14		
5.03	0.729 35	0.587 4	1.335 3	103.16		
5.04	0.730 80	0.712 0	1.439 2	99.49		
5.07	0.735 15	0.712 0	1.435 9	98.42	101.29	2.29
5.05	0.732 25	0.712 0	1.465 4	102.97		
5.02	0.727 90	0.890 0	1.638 7	102.34		
5.03	0.729 35	0.890 0	1.644 1	102.78		
5.06	0.733 70	0.890 0	1.641 6	102.01		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品(批号分别为 151213, 160627, 161115),依法制备供试品溶液,进样测定峰面积。结果含量分别为 $0.081, 0.129, 0.169\, \text{mg/g}$ 。

3 讨论

薄层鉴别项选择:经查阅文献并经试验考察发现,2015 年版《中国药典(一部)》暂未收录处方中冬瓜皮、石韦的薄层鉴别标准^[6],海金沙、瞿麦、萹蓄、白茅根均有阴性干扰,故最终筛选金钱草、鸡内金及甘草作为薄层鉴别项。

含量测定指标选择:2015 年版《中国药典(一部)》暂未收录处方中海金沙、鸡内金、瞿麦、白茅根、冬瓜皮 5 味药材含量测定项;而车前子、徐长卿和甘草中所含

京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、丹皮酚、甘草酸和甘草苷等化学成分^[7-9]的含量太低;此外,金钱草、石韦和萹蓄等药中均含有槲皮素、山柰酚和绿原酸等成分,但因该制剂制备工艺中所有药材均为水提取,导致成品中这 3 种成分含量并不高。现代药理学研究表明,绿原酸为众多药材和中成药抗菌解毒、消炎利胆的主要有效成分,同时也是质量控制的重要指标^[10-12]。鉴于绿原酸在制剂临床疗效中发挥重要作用,且根据课题审评会专家意见,最终选择绿原酸总量作为制剂质量控制指标。

色谱条件选择:参考 2015 年版《中国药典(一部)》金银花药材中绿原酸的含量测定方法,选择最大吸收波长为 $327\, \text{nm}$ 。根据文献研究和试验考察,流动相选择甲醇- 0.4% 冰醋酸溶液 ($20:80, V:V$) 时,色谱峰有较好的分离度,且峰形良好,故确定文中流动相。

提取溶剂用量选择:考察了 5 倍、10 倍、15 倍水提取条件下绿原酸的提取率,结果 10 倍水提取时,样品中总绿原酸已基本提取完全,故最终选择 10 倍水提取。

专属性试验:根据文献检索及预试验考察,金钱草、石韦、萹蓄、白茅根及车前子中均含有绿原酸,故阴性样品制备中去除这几味饮片,结果阴性对照无干扰。

综上所述,本研究中建立的金钱草、鸡内金和甘草的 TLC 鉴别方法及总绿原酸的 HPLC 含量测定方法,稳定、可靠,可用于消石通颗粒的质量控制。

参考文献:

- [1] 姚能,严常开,吴宁,等. 小儿葛黄止泻颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2018,27(18):14-17.
- [2] 郭小红,冷静,徐冲,等. 柔肝宝颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2018,27(3):8-11.
- [3] 金丽,蔡培培,杭娟,等. 铁必复颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2018,27(1):31-34.
- [4] 崔恩忠,陈美惠,贡磊,等. 寒痹丸质量标准的研究[J]. 东南国防医药,2016,18(3):281-283.
- [5] 于森,原源. HPLC 法测定益心酮片中四种黄酮类成分的含量[J]. 东南国防医药,2015,17(2):157-165.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:7-8.
- [7] 王劭华,罗光明,曾金祥,等. 中药车前子的化学成分及药理学研究进展[J]. 亚太传统医药,2008,4(9):133-135.
- [8] 赵丽萍. 徐长卿研究进展[J]. 中国药业,2011,20(2):79-80.
- [9] 刘育辰,陈有,王丹. 甘草化学成分研究[J]. 药物分析杂志,2011,31(7):1251-1255.
- [10] 吴卫华,康桢,欧阳冬生,等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物与研发,2006,18(4):691-694.
- [11] 陈绍华,王亚琴,罗立新. 天然产物绿原酸的研究进展[J]. 食品科技,2008,33(2):195-197.
- [12] 张鞍灵,马琼,高锦明,等. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. 中草药,2001,32(2):173-176.

(收稿日期:2018-08-08)