

除湿丸的质量标准研究[△]

曾祖平^{1*},王宏¹,钱珊²,彭冰¹,韩旭阳¹,车晓平³,何薇^{1#}(1.首都医科大学附属北京中医医院/北京市中医研究所,北京 100010;2.北京中医药大学东方学院中药系2009级,河北廊坊 065001;3.首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3395-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.30

摘要 目的:为建立除湿丸的质量标准提供参考。方法:采用显微鉴别法、薄层色谱(TLC)法对方中牡丹皮、白鲜皮、当归、茜草、栀子进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定丹皮酚、黄芩苷的含量。色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈,流动相为甲醇-水-磷酸(47:53:0.2, V/V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:显微鉴别中,白鲜皮、牡丹皮的显微特征明显,其他药材无干扰;TLC鉴别中,当归、茜草、栀子的特征斑点清晰,阴性对照无干扰。丹皮酚、黄芩苷进样量分别在0.106 24~2.124 8、0.059 04~1.180 8 μg范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均≤2.06%;平均加样回收率分别为101.56%、100.16%,RSD分别为1.68%、1.13%($n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确、重现性好,可作为除湿丸的质量控制标准。

关键词 除湿丸;薄层色谱法;高效液相色谱法;丹皮酚;黄芩苷;质量标准;显微鉴别

Study on Quality Standard of Chushi Pill

ZENG Zu-ping¹, WANG Hong¹, QIAN Shan², PENG Bing¹, HAN Xu-yang¹, CHE Xiao-ping³, HE Wei¹(1. Beijing Institute of TCM, Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China; 2. Grade 2009, Dongfang College, Beijing University of Chinese Medicine, Hebei Langfang 065001, China; 3. Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Chushi pill. METHODS: Microscopic identification and TLC were adopted for the qualitative identification of *Cortex moutan*, *C. dictamni*, *Angelica sinensis*, *Rubia cordifolia* and *Gardenia fructus* in Chushi pill; HPLC was performed to determine the contents of paeonol and baicalin. It was performed on column of Kromasil 100-5 C₁₈ with mobile phase of methanol-water-phosphoric acid (47:53:0.2, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, the temperature was 25℃ and the volume was 10 μl. RESULTS: The microscopic identification showed microscopic characteristics of *C. moutan* and *C. dictamni*, and characteristics of *A. sinensis*, *R. cordifolia* and *G. fructus* were identified by TLC; the linear range of paeonol was 0.106 24-2.124 8 μg ($r=0.999\ 9$) and baicalin was 0.059 04-1.180 8 μg ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.06%; average recoveries were respectively 101.56% (RSD=1.68%, $n=9$) and 100.16% (RSD=1.13%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quantity control of Chushi pill.

KEYWORDS Chushi pill; TLC; HPLC; Paeonol; Baicalin; Quality standard; Microscopic identification

双氢青蒿素哌啶片现行质量标准收载于《中国药典》2010年版第一增补本^[6]中,其双氢青蒿素含量测定方法为HPLC法,检测波长为210 nm,本文参照国际药典2011 V2.2版^[6]将检测波长改为216 nm,既能保证双氢青蒿素含量测定的灵敏度,同时又能相对减少末端吸收的影响。

现行质量标准流动相为乙腈-水(60:40, V/V),等度洗脱。本试验中发现,等度洗脱时磷酸哌啶的保留时间较长,不易洗脱,而且磷酸哌啶的色谱峰会影响双氢青蒿素的色谱峰,出现峰重叠等现象。因此,本文采用乙腈和水的梯度洗脱方式,将磷酸哌啶洗脱,避免其对双氢青蒿素含量测定的影响。

综上所述,本方法准确、简便、快速,可用于双氢青蒿素哌

啶片中双氢青蒿素的含量测定。

参考文献

- [1] 韦国峰,何有成,黄祖良.双氢青蒿素的制备及其含量测定[J].右江民族医学院学报,2001,23(5):691.
- [2] 王满元.青蒿素类药物的发展历史[J].自然杂志,2012,34(1):44.
- [3] 韩涛,代勇.简述使用青蒿素联合西药疟疾的研究进展[J].当代医药论丛,2015,13(6):10.
- [4] World Health Organization. *The international pharmacopoeia* Fourth Edition Second Supplement[EB/OL]. (2011) [2013-07-25]. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第一增补本[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:271.

(收稿日期:2014-12-04 修回日期:2015-06-03)

(编辑:刘柳)

△基金项目:北京市中医研究所苗圃科研项目(No.MP-2013-01)

*主任药师,硕士。研究方向:中药制剂及中药成分分析。电话:010-52176919。E-mail:zpz600@sohu.com

#通信作者:主任药师。研究方向:中药化学和中药制剂。电话:010-52176919。E-mail:hewei571124@163.com

除湿丸为皮外科泰斗赵炳南先生的临床经验方制成的水丸^[1],在首都医科大学附属北京中医医院临床应用数十年,收载于《医疗单位制剂规程》中,为北京市医疗机构制剂法定制剂,在多家医疗机构使用。除湿丸由地黄、白鲜皮、黄芩、牡丹皮、茜草、紫草、茯苓皮、炒栀子、泽泻、连翘、猪苓、当归、威灵仙13味药组成,具有清热凉血、燥湿止痒之功效,用于血热湿热所致的湿疹、脂溢性皮炎^[2]。原质量标准只有一些试管反应作为鉴别内容,缺乏专属性强的鉴别手段。为了保证临床疗效,控制制剂质量,本研究增加了牡丹皮、白鲜皮的显微鉴别和当归、茜草、栀子的薄层色谱(TLC)鉴别,并在同一色谱条件下测定了丹皮酚和黄芩苷的含量。按制定的质量标准检测了两家医疗机构的5批样品,结果表明该方法重现性好,简便易行,可有效地控制本品质量。

1 材料

1.1 仪器

1100系列高效液相色谱(HPLC)仪,包括二元泵、自动进样器、多波长检测器(美国Agilent公司);DM2500M显微镜(德国Leica公司);YOKO-ZS紫外线分析摄影仪(武汉药科新技术开发公司);XS205 DU专业型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);SK7210HP型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率:350 W,频率:59 kHz);Milli-Q纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

除湿丸(首都医科大学附属北京中医医院,批号:120601、120602、120603;北京国济中医医院,批号:110108、120120);除湿丸处方饮片(北京杏林药业有限责任公司,批号:地黄12052902、白鲜皮11110601、黄芩12010603、牡丹皮11090701、茜草11101501、紫草10121501、茯苓皮10112701、炒栀子11090802、泽泻10092201、连翘11082303、猪苓10111602、当归12022503、威灵仙11040901,规格:1 kg/袋);当归对照药材(120927-200613)、茜草对照药材(1049-9701)、栀子对照药材(120986-201108)、丹皮酚(110708-200506)、黄芩苷(110715-201016)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层层析预制板(中国青岛海洋化工集团);乙腈为色谱纯(美国Fisher公司),水为纯净水(纯水仪自制),甲醇、乙醚、乙醇、正己烷、乙酸乙酯、石油醚(60~90℃)、丙酮、甲酸均为分析纯(北京化学试剂公司)。

2 方法与结果

2.1 鉴别

2.1.1 白鲜皮的显微鉴别^[3-4] 取本品适量,置显微镜下观察:纤维单数散在,黄色,直径25~100 μm,壁厚,层纹明显,为白鲜皮,详见图1;草酸钙簇晶存在于无色薄壁细胞中,有时数个排列成行,为牡丹皮,详见图2。

2.1.2 当归的TLC鉴别^[3,5] 取本品10 g,研细,加乙醚30 ml,超声处理10 min,滤过,滤液挥干,残渣加乙醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。取当归药材0.5 g,加乙醚20 ml,超声处理10 min,滤过,滤液挥干,残渣用乙醇1 ml溶解作为当归对照药材溶液。按处方比例称取除当归以外的其他药材饮片适量,粉碎,称取10 g,照上述供试品溶液的制备方法制成缺当归的阴性对照溶液。照薄层色谱法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液和缺当归的阴性对照溶液各10 μl,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂



图1 白鲜皮显微特征

Fig 1 Microscopic characteristics of *C. dictamnii*



图2 牡丹皮显微特征

Fig 2 Microscopic characteristics of *C. moutan*

的硅胶G薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,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;阴性对照无干扰,详见图3。

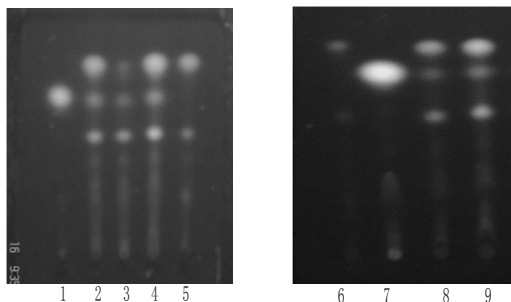


图3 当归的薄层色谱图

1、7.当归对照药材;2~4.3批供试品(北京中医医院);5~6.缺当归的阴性对照;8~9.2批供试品(北京国济中医医院)

Fig 3 TLC of *A. sinensis*

1、7.reference substance of *A. sinensis*; 2-4.3 batches of test samples (Beijing Hospital of TCM); 5-6.negative control without of *A. sinensis*; 8-9.2 batches of test samples (Beijing Guoji TCM Hospital)

2.1.3 茜草的TLC鉴别^[3] 将“2.1.2”中乙醚提取后的残渣挥尽溶剂,加乙酸乙酯-甲醇(3:1, V/V)混合溶液20 ml,超声处理20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。取茜草药材0.5 g,加甲醇10 ml,超声处理30 min,滤过,滤液浓缩至约1 ml,作为茜草对照药材溶液。按处方比例称取除茜草以外的其他药材饮片适量,粉碎,称取10 g,加乙醚30 ml,超声处理10 min,滤过,滤液弃去,药渣按照供试品溶液的制备方法制成缺茜草的阴性对照液。按薄层色谱法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]试验,吸取“2.1.3”中供试品

溶液、缺茜草的阴性对照溶液各 10 μ l 和对照药材溶液 5 μ l, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-丙酮(4:1, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果, 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; 阴性对照无干扰, 详见图 4。

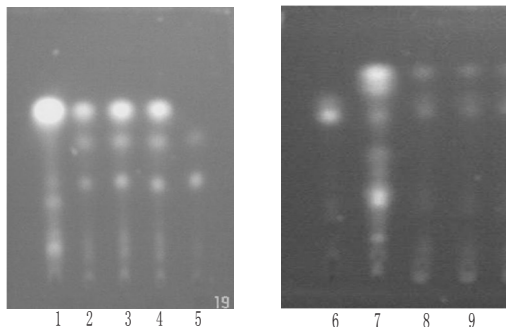


图 4 茜草的薄层色谱图

1、7. 茜草对照药材; 2~4.3 批供试品(北京中医医院); 5~6. 缺茜草的阴性对照; 8~9.2 批供试品(北京国济中医医院)

Fig 4 TLC of *R. cordifolia*

1、7. reference substance of *R. cordifolia*; 2-4.3 batches of test samples (Beijing Hospital of TCM); 5-6. negative control without of *R. cordifolia*; 8-9.2 batches of test samples (Beijing Guoji TCM Hospital)

2.1.4 栀子的 TLC 鉴别^[3,5] 取本品 10 g, 研细, 加乙醚 30 ml, 超声处理 10 min, 滤过, 滤渣挥尽溶剂, 加乙酸乙酯-甲醇(3:1, V/V)混合溶液 20 ml, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。取栀子药材 1 g, 加 50% 甲醇 10 ml, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液作为栀子对照药材溶液。按处方配比称取除栀子以外的其他药材饮片, 粉碎, 称取 10 g, 加乙醚 30 ml, 超声处理 10 min, 滤过, 滤液弃去, 药渣按照“2.1.3”中供试品溶液的制备方法制成缺栀子的阴性对照溶液。按薄层色谱法[2010 年版《中国药典》(一部)附录 VI B]试验, 吸取上述供试品溶液、缺栀子的阴性对照溶液各 10 μ l 和对照药材溶液 5 μ l, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水(5:5:1:1, V/V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 热风吹至斑点显色清晰, 置于日光下检视。结果, 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; 阴性对照无干扰, 详见图 5。

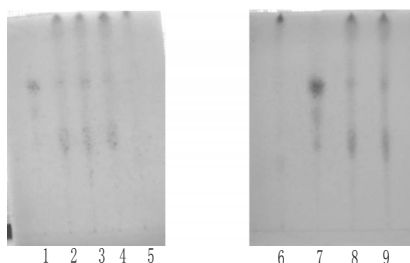


图 5 栀子的薄层色谱图

1、7. 栀子对照药材; 2~4.3 批供试品(北京中医医院); 5~6. 缺栀子的阴性对照; 8~9.2 批供试品(北京国济中医医院)

Fig 5 TLC of *G. fructus*

1、7. reference substance of *G. fructus*; 2-4.3 batches of test samples (Beijing Hospital of TCM); 5-6. negative control without of *G. fructus*; 8-9.2 batches of test samples (Beijing Guoji TCM Hospital)

2.2 含量测定^[8,9]

2.2.1 色谱条件和系统适用性试验 色谱柱: Kromasil 100-5C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水-磷酸(47:53:0.2, V/V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ l。理论板数按黄芩苷峰计算 $>$ 2 500, 分离度 $>$ 1.5; 按丹皮酚计算 $>$ 5 000, 分离度 $>$ 1.5。

2.2.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液。精密称取已干燥(60 $^{\circ}$ C 减压干燥 4 h)的黄芩苷对照品 0.003 69 g, 以甲醇定容于 25 ml 量瓶中, 制成每 1 ml 含 0.147 6 mg 的黄芩苷对照品溶液。精密称取丹皮酚对照品 0.006 64 g, 以甲醇定容于 25 ml 量瓶中, 制成每 1 ml 含 0.265 6 mg 的丹皮酚对照品溶液。(2) 供试品溶液。取除湿丸粉末(50 目)1 g, 精密称定, 置于 50 ml 量瓶中, 加入 70% 乙醇 45 ml, 超声处理 30 min, 放至室温, 以 70% 乙醇定容, 摇匀, 取上清液, 经微孔滤膜(0.45 μ m)滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 空白干扰试验 按处方比例制备不含黄芩和牡丹皮的药品, 按照上述供试品溶液制备方法制备缺黄芩和牡丹皮的阴性对照溶液。取“2.2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和上述缺黄芩和牡丹皮的阴性对照溶液各适量, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示, 在与黄芩苷和丹皮酚保留时间相应的位置上未见相关吸收峰, 说明本品中其他成分对黄芩苷和丹皮酚的测定无干扰。色谱见图 6。

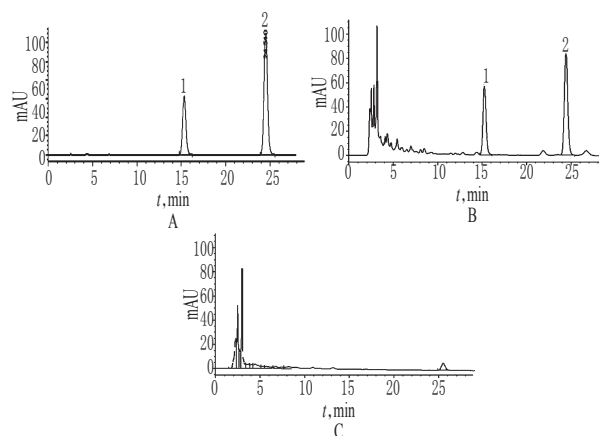


图 6 除湿丸的高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 缺黄芩、牡丹皮的阴性对照品; 1. 黄芩苷; 2. 丹皮酚

Fig 6 HPLC chromatograms of Chushi pill

A. control sample; B. test sample; C. negative control sample without of *Scutellaria baicalensis* and *C. moutan*; 1. baicalin; 2. paeonol

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下两种对照品溶液各 2 ml, 置于同一 5 ml 量瓶中, 以甲醇定容至刻度, 制成黄芩苷(59.04 μ g/ml)和丹皮酚(106.24 μ g/ml)的混合对照品溶液。分别进样 1、2、4、8、12、16、20 μ l, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录黄芩苷和丹皮酚峰面积。分别以黄芩苷和丹皮酚峰面积积分值(y)为纵坐标, 以进样量为横坐标(x , μ g), 进行线性回归, 得黄芩苷的回归方程: $y=3\ 432x-5.280$ ($r=0.999\ 9$), 丹皮酚的回归方程: $y=4\ 419x-18.67$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明, 黄芩苷、丹皮酚的进样量分别在 0.059 04~1.180 8、0.106 24~2.124 8 μ g 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.4”项下混合对照品溶液 10 μ l, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 记录黄芩苷和丹皮

酚的峰面积。结果,黄芩苷、丹皮酚的RSD分别为0.61%、0.87% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品(批号:120120)溶液适量,每隔2 h左右进样测定一次,连续测定14 h。结果,黄芩苷、丹皮酚峰面积的RSD分别为0.74%、0.82%,表明供试品溶液在14 h内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批次除湿丸(批号:120120)适量,粉碎,过筛(50目),精密称取6份,每份约1 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,除湿丸中黄芩苷平均含量为1.13 mg/g, RSD=2.06%,丹皮酚平均含量为1.68 mg/g, RSD=1.40%,表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批(批号:120120,黄芩苷平均含量为1.13 mg/g,丹皮酚平均含量为1.68 mg/g)除湿丸粉末适量,并加入一定量的黄芩苷(0.644 4 mg/ml)和丹皮酚(1.185 6 mg/ml)混合对照品溶液,其余操作同“2.2.2”项下供试品溶液制备方法,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果详见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	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,%
黄芩苷	0.334 3	0.377 8	1.933 2	2.330 6	101.01	100.16	1.13
	0.350 3	0.395 8	1.933 2	2.344 3	100.79		
	0.328 4	0.371 1	1.933 2	2.330 6	101.36		
	0.500 6	0.565 7	1.288 8	1.828 4	97.97		
	0.501 9	0.567 1	1.288 8	1.844 5	99.12		
	0.502 1	0.567 4	1.288 8	1.852 7	99.73		
	0.800 0	0.904 0	0.644 4	1.545 4	99.53		
	0.804 6	0.909 2	0.644 4	1.560 3	101.04		
	0.801 4	0.905 6	0.644 4	1.555 8	100.90		
	丹皮酚	0.334 3	0.561 6	3.556 8	4.239 2		
0.350 3		0.588 5	3.556 8	4.302 1	104.41		
0.328 4		0.551 7	3.556 8	4.221 0	103.16		
0.500 6		0.841 0	2.371 2	3.219 7	100.32		
0.501 9		0.843 2	2.371 2	3.224 9	100.44		
0.502 1		0.843 5	2.371 2	3.251 6	101.56		
0.800 0		1.344 0	1.185 6	2.540 5	100.92		
0.804 6		1.351 7	1.185 6	2.529 4	99.33		
0.801 4		1.346 4	1.185 6	2.538 1	100.51		

2.2.9 样品含量测定 取5批除湿丸样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算黄芩苷和丹皮酚的含量,结果详见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 2 Content determination results of sample($n=3$, mg/g)

批号	平均含量	
	黄芩苷	丹皮酚
110108	0.69	1.21
120120	1.14	1.67
130311	3.94	1.95
130312	5.24	1.91
130313	3.28	1.84

3 讨论

3.1 定性鉴别

除湿丸为中药复方制剂,由中药细粉用水制成丸剂。定性鉴别时首先考虑了简便快速的显微鉴别,结果方中白鲜皮、牡丹皮的显微特征明显,其他药味无干扰。TLC研究中,笔者曾经尝试鉴别处方中其他药味。结果,供试品与紫草、泽泻对照药材无明显对应斑点,与地黄、威灵仙、茯苓皮、猪苓对照药材有对应斑点,但阴性有干扰,故未纳入标准。

3.2 含量测定

黄芩苷是黄芩的主要活性成分,具有抗炎和抗变态反应、抗微生物等药理作用^[7-10];丹皮酚是牡丹皮中的主要活性成分,具有抗菌、抗变态反应及免疫作用^[11]。这些药理作用与除湿丸功效密切相关,也是除湿丸的药效成分,因此有必要控制其含量。含量测定制备供试品时,曾对供试品提取溶剂[甲醇、70%乙醇、甲醇-乙酸乙酯(1:3, V/V)]进行了筛选,最终确定70%乙醇为供试品溶液的提取溶剂。筛选溶剂用量时,考察了100、50、25 ml用量。结果,50 ml与100 ml的提取量相当,故确定以50 ml作为提取溶剂用量。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、重现性好,可作为除湿丸的质量控制方法。

参考文献

- [1] 北京中医医院.赵炳南临床经验集[M].北京:人民卫生出版社,1975:298.
- [2] 北京市卫生局.医疗单位制剂规程[S].1984-06-01.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:160、218、231、1102.
- [4] 徐国钧.中药材粉末显微鉴定[M].北京:人民卫生出版社,2009:160、233.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:中药材薄层色谱彩色图集[S].北京:人民卫生出版社,2009:547、1242.
- [6] 胡北,马宏达,张朝坤,等.和肝胆胆颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2014,25(39):3679.
- [7] 邝枣园,黄衍寿,吴伟,等.黄芩苷对肺炎衣原体诱导的内皮细胞黏附因子表达的影响[J].广州中医药大学学报,2004,21(6):454.
- [8] 邝枣园,黄衍寿,吴伟.黄芩苷对肺炎衣原体诱导的可溶性细胞黏附因子及IL-8的调节作用[J].浙江中医杂志,2004,39(11):502.
- [9] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:204.
- [10] 顾红缨,郭焱,罗晶.黄芩苷对I型变态反应豚鼠超微结构的影响[J].长春中医学院学报,2002,18(4):40.
- [11] 郭齐,李贻奎,王志国,等.丹皮酚药理研究进展[J].中医药信息,2009,26(1):20.

(收稿日期:2014-10-02 修回日期:2015-03-24)

(编辑:余庆华)