

通淋颗粒的质量标准研究

安君^{1*}, 彭慧², 王云¹, 崔刚^{1#} (1. 中日友好医院药学部, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

中图分类号 R283.627; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1399-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.18

摘要 目的: 建立通淋颗粒的质量标准。方法: 采用薄层色谱(TLC)法对方剂中的蒲公英、鱼腥草、桂枝、蒲黄进行定性鉴别; 采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中咖啡酸的含量; 色谱柱为Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(11:89, V/V), 检测波长为323 nm。结果: 在TLC图中能清晰地检出蒲公英、鱼腥草、桂枝、蒲黄的特征斑点, 且阴性对照无干扰、专属性强。咖啡酸的质量浓度在1.68~107.60 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9995$); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%; 低、中、高质量浓度对照品对应的平均加样回收率分别为99.07%、99.10%、100.17%, RSD分别为1.21%、0.41%、0.61% (n 均为3)。结论: 所建标准可用于通淋颗粒的质量控制。

关键词 通淋颗粒; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准; 蒲公英; 鱼腥草; 桂枝; 蒲黄; 咖啡酸

Quality Standard of Tonglin Granules

AN Jun¹, PENG Hui², WANG Yun¹, CUI Gang¹ (1. Dept. of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. College of TCM, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Tonglin granule. METHODS: Taraxaci Herba, *Houttuynia cordata*, *Cinnamomum cassia* and Typhae Pollen were identified by TLC. The content of caffeic acid was detected by HPLC. The determination was performed on Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid(11:89, V/V); the detection wavelength was set at 323 nm. RESULTS: TLC spots of them could be detected clearly and were specific without interference from negative control. The linear range of caffeic acid were 1.68-107.60 μg/ml ($r=0.9995$); RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; the average recoveries were 99.07% (RSD=1.21%, $n=3$), 99.10% (RSD=0.41%, $n=3$) and 100.17% (RSD=0.61%, $n=3$) at low, medium and high concentrations. CONCLUSIONS: The standard can be used for quality control of Tonglin granule.

KEYWORDS Tonglin granule; TLC; HPLC; Quality standard; Taraxaci Herba; *Houttuynia cordata*; *Cinnamomum cassia*; Typhae Pollen; Caffeic acid

通淋颗粒是由蒲公英、鱼腥草、石韦、桂枝、蒲黄等中药制成的医院制剂, 具有清热解毒、利湿通淋的功效, 临床用于下焦湿热所致的热淋, 症见尿频、尿急、尿痛、尿道灼热甚或尿血, 或尿浊, 少腹拘急胀痛、口苦、大便秘结, 舌苔黄或白而腻, 脉弦数或滑数, 以及急性下尿路感染见上述证候者的治疗。为了更好地控制该药品质量, 建立其完善的质量标准, 笔者采用薄层色谱(TLC)法对方剂中蒲公英、鱼腥草、桂枝、蒲黄4味中药进行了定性鉴别, 并采用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中的咖啡酸进行了含量测定。

1 材料

1.1 仪器

LC-10A_{VP}型HPLC仪, 含LC-10AT_{VP}型泵、CTO-10A_{VP}型柱温箱、SPD-10A_{VP}型紫外检测器、Class-VP型色谱工作站(日本岛津公司); KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SX2-2.5-10型箱式电阻炉、DH-101型电热恒温鼓

风干燥箱、ZK-2BS型电热真空干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司); SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); EYELA N-1000型旋转蒸发器(日本东京理化株式会社); ZF-90型暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂); LIBROR EB-280型电子天平、LIBROR L-200M型十万分之一电子天平(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

通淋颗粒(批号: 20070925、20071011、20071017)及各项阴性样品均由中日友好医院药学部制剂室提供; 咖啡酸(批号: 885-200001)、桂皮醛(批号: 111710-200513)、异鼠李素(批号: 110860-200406)、异鼠李素-3-O-新橙皮苷(批号: 111571-200503)、香蒲新苷(批号: 111573-200503)对照品与鱼腥草对照药材(批号: 1046-200001)均购自中国食品药品检定研究院; 硅胶G、硅胶GF₂₅₄(青岛海洋化工厂); 水为Millipore超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 蒲公英、鱼腥草的TLC鉴别^[1] 取本品约10 g, 加水60

* 主管药师。研究方向: 临床药学。电话: 010-84205129

通信作者: 副主任药师, 硕士。研究方向: 药品分析、治疗药物监测、方剂成药性。电话: 010-84205563。E-mail: cuigang0929@163.com

ml、乙酸乙酯30 ml,加热回流1 h,滤过,分离乙酸乙酯液,水溶液再用乙酸乙酯振摇提取2次,每次20 ml,合并乙酸乙酯液,用活性炭细粉2 g脱色,滤过,滤液水浴蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取缺蒲公英、石韦的阴性样品约10 g,同法制成缺蒲公英、石韦的阴性对照溶液。取缺鱼腥草的阴性样品约10 g,同法制成缺鱼腥草的阴性对照溶液。再取咖啡酸对照品,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为咖啡酸对照品溶液。最后取鱼腥草对照药材4 g,加水40 ml,加热回流1 h,滤过,滤液以乙酸乙酯振摇提取2次,每次10 ml,合并乙酸乙酯液,水浴蒸干,残渣加乙酸乙酯1 ml使溶解,作为鱼腥草对照药材溶液。照TLC法^[2]试验,吸取上述溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(5:1:1:0.2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果表明,供试品色谱中,在与咖啡酸对照品、鱼腥草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。蒲公英、鱼腥草的TLC图见图1。

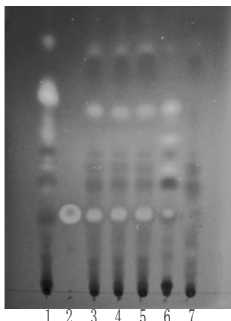


图1 蒲公英、鱼腥草的TLC图

1.阴性对照(缺蒲公英、石韦);2.咖啡酸对照品;3~5.供试品;6.鱼腥草对照药材;7.阴性对照(缺鱼腥草)

Fig 1 TLC of Taraxaci Herba and *H. cordata*

1. negative control(without Taraxaci Herba and Pyrrrosiae Folium);2. caffeic acid control;3-5. test samples; 6.Houttuyniae Herba reference substance; 7. negative control(without *H. cordata*)

2.1.2 桂枝的TLC鉴别^[3] 取本品约10 g,加水60 ml,连接挥发油提取器,按挥发油测定法^[2],加乙酸乙酯1 ml,加热回流1 h,分离乙酸乙酯液,作为供试品溶液。另取缺桂枝的阴性样品约10 g,同法制成缺桂枝的阴性对照溶液。再取桂皮醛对照品,加乙酸乙酯制成每1 ml含1 μ l的溶液,作为对照品溶液。照TLC法^[2]试验,吸取上述溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(17:3, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2,4-二硝基苯肼乙醇试液,日光下检视。结果表明,供试品色谱中,在与桂皮醛对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的橙红色斑点;阴性对照无干扰。桂枝的TLC图见图2。

2.1.3 蒲黄的TLC鉴别^[4] 取本品两份,标为A、B,每份10 g。A份加80%乙醇120 ml,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯10 ml,加热使溶解,滤过,滤液浓缩至2 ml,作为供试品溶液A。另取缺蒲黄的阴性样品约10 g,同法制成缺蒲黄的阴性对照溶液A。再取异鼠李素对照品,加乙酸乙酯制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液A。照TLC法^[2]试验,

吸取上述溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。结果表明,供试品A色谱中,在与对照品A色谱相应的位置上,显相同的黑色斑点;阴性对照A无干扰。蒲黄的TLC图I见图3。

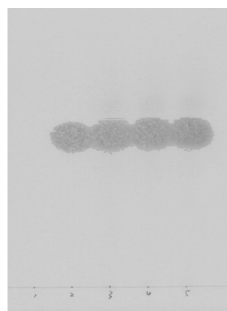


图2 桂枝的TLC图

1.阴性对照(缺桂枝);2.桂皮醛对照品;3~5.供试品

Fig 2 TLC of *C. cassia*

1. negative control (without *C. cassia*); 2.cinnaldehydum control;3-5.test samples

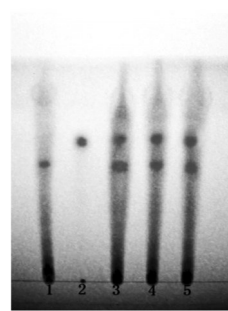


图3 蒲黄的TLC图I

1.阴性对照A;2.异鼠李素对照品;3~5.供试品A

Fig 3 TLC of Typhae Pollen I

1.negative control A; 2.isorhamnetin control;3-5.test samples A

B份加水30 ml、水饱和和正丁醇20 ml,密塞,超声处理(功率:300 W,频率:40 kHz)1 h,滤过,水液再用水饱和和正丁醇萃取2次,每次20 ml,合并正丁醇液,水浴蒸干,残渣加甲醇2 ml使溶解,作为供试品溶液B。另取缺蒲黄的阴性样品约10 g,同法制成缺蒲黄的阴性对照溶液B。再取异鼠李素-3-O-新橙皮苷、香蒲新苷对照品,加甲醇分别制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液B、C。照TLC法^[2]试验,吸取上述溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,日光下检视。结果表明,供试品B色谱中,在与对照品B、C色谱相应的位置上,显相同的黑色斑点;阴性对照B无干扰。再喷以3%三氯化铝乙醇溶液,晾干后置紫外光灯(365 nm)下检视。结果表明,供试品B色谱中,在与对照品B、C色谱相应的位置上,显相同的黄绿色荧光斑点;阴性对照B无干扰。蒲黄的TLC图II见图4。

2.2 咖啡酸的含量测定

2.2.1 色谱条件^[5] 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(11:89, V/V);流速:1 ml/min;检测波长:323 nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ l。

2.2.2 对照品贮备液的制备 精密称取咖啡酸对照品5.38 mg,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为107.60 μ g/ml的对照品贮备液。

2.2.3 供试品溶液的制备^[6] 取本品粉末约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入含5%甲酸的甲醇溶液25 ml,密塞,称定质量,超声处理(功率:300 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用含5%甲酸的甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,用干燥滤器滤过,精确量取续滤液10 ml,蒸干,残渣用甲醇溶解并定容,置5 ml量瓶中,摇匀,用微孔滤膜(0.22 μ m)滤过,取

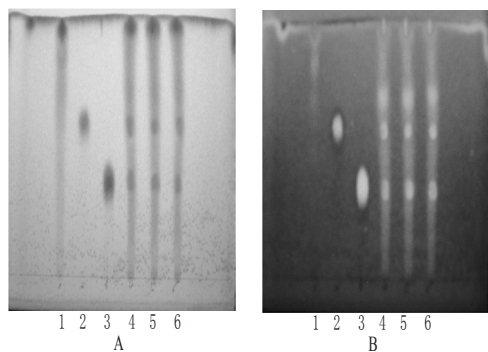


图4 蒲黄的TLC图Ⅱ

A.日光下;B.365 nm紫外灯下;1.阴性对照B;2.异鼠李素-3-O-新橙皮苷对照品;3.香蒲新苷对照品;4~6.供试品B

Fig 4 TLC of Typhae Pollen II

A.in daylight; B.under UV lamp at 365 nm; 1.negative control B; 2.isorhamnetin-3-O-neohesperidosioid; 3.typhaneoside; 4-6. test samples B 滤液作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取缺蒲公英、石韦的阴性样品适量,按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取对照品贮备液适量,加甲醇分别制成质量浓度为1.68、3.36、6.72、13.45、26.90、53.80、107.60 $\mu\text{g/ml}$ 的咖啡酸对照品溶液,依次注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积积分值(y)为横坐标,对照品溶液质量浓度(x)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=0.023x-0.632$ ($r=0.9995, n=7$)。结果表明,咖啡酸质量浓度在1.68~107.60 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.6 专属性试验 精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各10 μl ,分别注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果表明,阴性对照溶液中其他成分对咖啡酸的测定无干扰。色谱见图5。

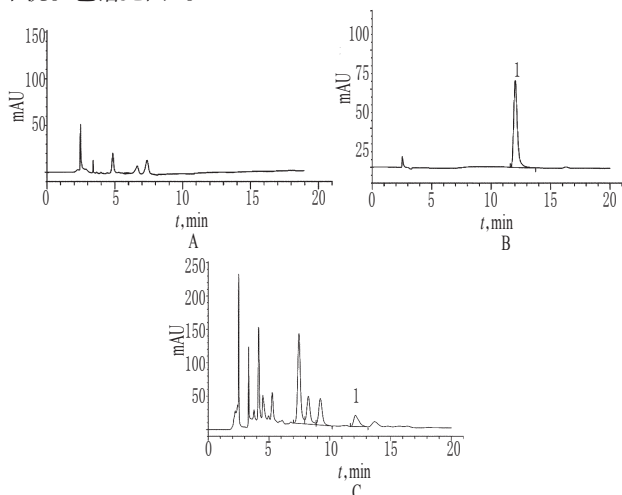


图5 高效液相色谱图

A.阴性对照;B.咖啡酸对照品;C.供试品;1.咖啡酸($t_R=12.1\text{ min}$)

Fig 5 HPLC chromatograms

A.negative control; B.caffeic acid control; C.test sample; 1.caffeic acid ($t_R=12.1\text{ min}$)

2.2.7 精密度试验 精密吸取咖啡酸对照品溶液(53.80 $\mu\text{g/ml}$)

10 μl ,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,重复进样测定6次。结果显示, $RSD=0.17\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液10 μl ,按上述色谱条件分别于制备后0、2、4、6、8、10 h重复进样,测定峰面积。结果显示, $RSD=1.23\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在10 h内稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批样品(批号:20070925)适量,共6份,精密称定,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件测定峰面积,计算样品含量。结果显示,样品中咖啡酸的平均含量为35.52 $\mu\text{g/g}$, $RSD=1.34\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量的同一批样品(含量:35.31 $\mu\text{g/g}$,批号:20070925)1.00 g,共9份,精密称定,每3份为一组,分别精密加入低、中、高质量浓度的对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=3$)

取样量,g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1.032	36.44	26.90	62.89	98.33		
1.025	36.19	26.90	62.67	98.43	99.07	1.21
1.034	36.51	26.90	63.53	100.44		
1.023	36.12	32.28	67.98	98.69		
1.088	38.42	32.28	70.54	99.51	99.10	0.41
1.026	36.23	32.28	68.22	99.11		
1.012	35.73	43.04	78.96	100.43		
1.017	35.91	43.04	79.21	100.60	100.17	0.61
1.024	36.16	43.04	78.97	99.47		

2.2.11 样品含量测定 取3批样品各适量,精密称定,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液。精密吸取咖啡酸对照品溶液和供试品溶液各10 μl ,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,按外标法以峰面积计算样品中咖啡酸的含量。结果表明,批号为20070925、20071011、20071017的样品中咖啡酸含量分别为35.31、36.73、38.15 $\mu\text{g/g}$ ($n=3$)。

3 讨论

在蒲公英的TLC鉴别过程中,笔者最先按照2010年版《中国药典》(一部)中蒲公英的鉴别方法^[2]操作,发现所得TLC图谱中咖啡酸的 R_f 值过高;后改用文中所选的前处理方法及TLC展开系统,咖啡酸的 R_f 值较为合适。在做干扰试验时发现,单一缺蒲公英的阴性样品在咖啡酸的相应位置处有干扰,经查阅文献发现,处方中的石韦也含有咖啡酸,故最后制备的是缺蒲公英和石韦的双阴性样品。

在鱼腥草的TLC鉴别过程中发现,前文确定的蒲公英鉴别方法同样适用于鱼腥草,故最终二者采用同一方法来进行鉴别以提高效率。从图1可以看出,虽然鱼腥草对照药材在咖啡酸的对应位置有斑点,但其为黄色,与咖啡酸的荧光斑点颜色不同,故不造成对蒲公英的鉴别干扰。在试验过程中,笔者还选用过5%磷酸溶液、10%硫酸乙醇溶液、茚三酮溶液等显色的方法,结果均不理想^[7-8]。

在蒲黄的TLC鉴别过程中,B份样品最先采用80%乙醇加热回流的方法处理,结果供试品溶液展开后呈黑色带状,无法进行有效的鉴别;后改为超声波提取、水饱和正丁醇萃取的方法,效果满意。从图4可以看出,薄层板再喷以3%三氯化铝乙醇溶液后,在紫外光灯(365 nm)下看到的斑点为黄绿色,更加清晰、可辨^[9]。

蒲公英为本方君药,其主要有效成分为咖啡酸,故笔者在本质量标准研究中建立了咖啡酸的含量测定方法。咖啡酸为多羟基酚酸类化合物,以游离型及有机酸盐的形式共同存在,加入少量甲酸可使有机酸盐转变为游离酸,故笔者采用含5%甲酸的甲醇溶液为提取溶剂^[6]。2010年版《中国药典》^[2]以及不少文献^[10-12]均采用甲醇-磷酸盐缓冲液系统作为咖啡酸含量测定的流动相,但笔者照此试验后发现其分离效果不佳,且流动相配制烦琐,并在较高柱温情况下对色谱柱损害较大。后经反复试验,选用乙腈-0.2%磷酸溶液(11:89, V/V)作为流动相,溶液配制简便,样品分离度较好。

综上,所建标准可用于通淋颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 陈美红,曾晓英.复方制剂中苦参与蒲公英的鉴别[J].湖南中医杂志,1997,13(S1):89.
- [2] 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:附录34、附录63、

331.

- [3] 夏华玲,韩军涛,何广宏.芪伸腰舒丸质量标准的研究[J].中医正骨,2005,17(8):76.
- [4] 张水寒,王实强,刘春海,等.蒲黄药材的质量标准研究[J].中国中药杂志,2000,25(3):136.
- [5] 张才煜,孙权,刘敬阁.不同地区蒲公英中咖啡酸的含量测定[J].中国中药杂志,2006,31(9):776.
- [6] 席文胜,张艳玲.蒲公英冲剂质量标准研究[J].中华中医药学刊,2007,25(12):2640.
- [7] 王晓华,胡惠平,吴宗好.慢咽宁袋泡茶质量标准研究[J].中药新药与临床药理,2000,11(4):234.
- [8] 吕沅珊,华伟义,刘兰英,等.妇炎净颗粒质量标准的研究[J].中草药,2001,32(3):221.
- [9] 刘斌,王晓强,王伟.蒲黄配方颗粒质量标准的研究[J].中成药,2003,25(8):624.
- [10] 潘见,梁娟,谢慧明,等.蒲公英提取物的质量标准研究[J].时珍国医国药,2008,19(9):2064.
- [11] 李喜凤,师绘敏,陈随清,等.HPLC同时测定蒲公英中咖啡酸和绿原酸的含量[J].中成药,2008,30(10):1553.
- [12] 张雪玲,于晓秋,王颖,等.HPLC法同时测定咖啡酸片的主药和有关物质含量[J].中国药房,2012,23(1):72.

(收稿日期:2013-04-02 修回日期:2013-11-06)

国家卫生和计划生育委员会副主任、国家中医药管理局局长王国强建议将中医药发展列为国家战略

本刊讯 2014年3月4日,国家卫生和计划生育委员会副主任、国家中医药管理局局长王国强在全国政协十二届二次会议医卫、体育界委员联组会上就将中医药发展列为国家战略建言献策。他说,当前,中医药发展处于难得的新的战略机遇期。中国特色社会主义“五位一体”总布局和中国梦的提出,为中医药事业发展带来了历史性新机遇。一是中医药作为我国独特的卫生资源,可以为深化医改、维护健康、改善民生发挥更大作用。中医药临床疗效确切、预防保健作用独特、治疗方式灵活、费用比较低廉,十分符合公共卫生和基本医疗服务的要求,有助于建立政府承受得了、群众负担得起、财政可持续保障、中西医并重的中国特色医疗保障制度和医疗卫生发展模式。二是中医药作为潜力巨大的经济资源,可以为加快转变经济发展方式发挥更大作用。中医药健康产业,贯穿整个产业链,是发展潜力巨大的重要战略性新兴产业。三是中医药作为具有原创优势的科技资源,可以为实施创新驱动发展战略发挥更大作用。中医药是我国为数不多具有原创优势的领域,可以也应当成为我国科技创新的突破口和增长点。四是中医药作为优秀的文化资源,可以为培育和弘扬社会主义核心价值观发挥更大作用。中医药是中华民族优秀传统文化,是我国文化软实力的重要体现。繁荣发展中医药文化,有助于建设社会主义核心价值观体系,增强中华文化国际影响力。五是中医药作为重要的生态资源,可以为推进生态文

明建设发挥更大作用。中医药产业是典型的绿色产业、生态产业,有助于推进绿色发展、低碳发展。此外,积极发展中医药服务贸易,推动中医药海外发展,有助于我国公共外交、经济外交,促进我国开放型经济发展。但也应该清醒地看到,中医药发展还面临着不少困难和挑战,中医药特色与优势还没有得到充分发挥,符合中医药特点规律和发展要求的政策机制、制度体系还不健全,还需从国家战略的高度进行顶层设计,统筹规划。

为加快推进中医药发展,使中医药更好地服务于中国特色社会主义“五位一体”总布局和民族复兴的伟大中国梦,为全面建成小康社会做出更大贡献,他建议:

(一)将中医药发展列为国家战略,编制实施国家中医药中长期发展专项规划。希望在国务院的支持和指导下,按照《国务院关于扶持和促进中医药事业发展的若干意见》的要求,编制实施国家中医药中长期发展专项规划。

(二)完善中药发展跨部门协调机制。建议由国务院领导牵头,涉及中药的国务院相关部门负责同志为成员,办公室挂靠的部门承担协调联络工作,以研究解决中医药工作中的重点、难点问题,完善政策机制,推动政策措施的贯彻落实。

(三)加快推进中医药立法立法进程。中医药法草案已提交国务院法制办,希望抓紧对法律草案进行修改完善,尽快提交国务院常务会议审议。