

痛风立消复方制剂质量标准

高雅风¹, 孙大中², 王俊淞³, 张小东¹, 王沛^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 广州中医药大学第一临床学院, 广州 510006;
3. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650000)

[摘要] **目的:**建立痛风立消制剂的质量标准。**方法:**采用薄层色谱法对土茯苓、木瓜、石菖蒲、乌药、萆薢等进行定性鉴别;采用紫外分光光度法对制剂中柚皮苷进行含量测定;采用高效液相色谱法对制剂中绿原酸进行含量测定。**结果:**柚皮苷在0.056~0.196 mg ($r=0.9999$)与吸收度呈良好的线性关系,平均回收率99.31%,RSD 0.56%;绿原酸在0.32~1.92 μg ($r=0.9997$)与峰面积呈良好的线性关系。平均回收率99.66%,RSD 0.415%。**结论:**该方法简便易行、结果准确可靠,重复性好,可作为痛风立消制剂质量控制标准。

[关键词] 痛风立消复方制剂; 柚皮苷; 绿原酸;

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0069-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130069

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1535.020.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 15:35

Quality Standard for Tongfenglixiao Preparations

GAO Ya-feng¹, SUN Da-zhong², WANG Jun-song³, ZHANG Xiao-dong¹, WANG Pei^{1*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. The first Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 3. College of Life Science and Technology of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of the Tongfenglixiao preparations. **Method:** Qualitative identification was performed by thin layer chromatography on *Dioscorea collettii*, Papaya, Shichangpu, *Aggregata*, *Smilax glabra*; the content was measured with UV spectrophotometry the naringin in the formulations, with HPLC method for the content of chlorogenic acid in the it. **Result:** The naringin and chlorogenic acid showed good linear relationship ($r=0.9999$, $r=0.9997$) in the range of 0.056-0.196 mg, 0.32-1.92 μg . The average recovery was 99.31%, 99.66% with RSD 0.56%, 0.415%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reliable, reproducible and can be used as agents of Tongfenglixiao quality control standards.

[Key words] Tongfenglixiao preparations; naringin; chlorogenic acid

痛风立消复方制剂是一种纯中药制剂,针对嘌呤代谢性障碍,血尿酸增高引起组织损伤所致的炎

症、疼痛,克服了秋水仙碱和别嘌呤醇等常用西药的毒副作用较大的问题,如明显的胃肠道反应以及肝肾损害、骨髓抑制,甚至呼吸抑制等的临床不良症状。该制剂主要是以萆薢、土茯苓泄浊解毒、健脾燥湿、通利关节,木瓜清热舒经活络。佐以乌药、石菖蒲等理气、活血、散寒、去湿、止痛,诸药同用共奏清热利湿解毒、活血通络止痛之功,能明显改善症状,降低血尿酸浓度,增强疗效^[1-2]。为了保证药物的临床疗效,我们对该药制剂的质量控制研究做了如下工作。

[收稿日期] 20131013(001)

[基金项目] 吉林省中管局中药研究课题(2012-049)

[第一作者] 高雅风,实验师,从事中药研发与质量监控研究, Tel: 0431-86172366, E-mail: wzh1965@yahoo.com.cn

[通讯作者] *王沛,教授,研究生导师,从事药物新剂型及新药开发研究, Tel: 0431-86172694, E-mail: Wapa1988@163.com

1 材料

1.1 仪器 薄层拍摄成像系统(瑞士,CAMAG), KQ250B 型超声微波清洗仪器(申花超声仪器有限公司), UV-2401PC 型紫外-可见分光光度计(日本,岛津), 2695 型高效液相色谱仪(Waters 公司), AL-204 型电子天平(北京仪器股份有限公司)。

1.2 药品与试剂 绿原酸(批号 110753-200614)、柚皮苷(批号 110723-200610)、齐墩果酸(批号 110709-200505)对照品,均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用。

草薢(批号 12091-200610)、土茯苓(批号 1084-9903)、木瓜(批号 121222-200601)、乌药(批号 120904-200601)、石菖蒲(批号 110831-200602)对照药材均购自中国药品生物制品检定所。

痛风立消制剂(批号 111001, 111002, 111003, 111101, 111102, 111103, 自制)是由草薢、土茯苓、木瓜、乌药等经提取后,加入适当辅料,制成;阴性对照药(自制)。

甲醇(色谱纯,Merck 公司),纯净水(杭州娃哈哈纯净水有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 粉草薢 取制剂粉末 2 g,加甲醇 50 mL,水浴回流 1 h,放冷,过滤,蒸干,残渣加蒸馏水 25 mL 溶解,加乙醚 25 mL 萃取,弃去乙醚液,取水层加盐酸 2 mL,加热回流 1.5 h,放冷,用乙醚振摇萃取 2 次,每次 30 mL,合并乙醚层,水浴挥干乙醚,残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解,即为供试品溶液^[3]。再取缺粉草薢的阴性对照 2 g 及对照药材 1 g,按上述方法分别制成阴性对照溶液和对照药材溶液。依照 2010 年版《中国药典》薄层色谱法(附录 VI D)试验吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-丙酮(9:1)为展开剂,展开、晾干,喷以磷钼酸试液,在供试品色谱中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此斑点。

2.2 土茯苓 取制剂粉末 2 g,加甲醇 20 mL,超声提取 30 min,放冷滤过作为供试品溶液^[4]。再取不含土茯苓药材的阴性对照 2 g,土茯苓对照药材 1 g,按上述方法方法分别制成阴性对照溶液和对照药材溶液。依照 2010 年版《中国药典》薄层色谱法(附录 VI D)试验吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(13:32:9)为展开剂展开、晾干,喷以三氯化铝试液,放置 5 min,于紫外光灯(365 nm)下检视。在供试品

色谱中与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无此斑点。

2.3 木瓜 取制剂粉末 2 g,加三氯甲烷 10 mL,超声提取 30 min,过滤,滤液置水浴上蒸干,残渣加甲醇-三氯甲烷(1:3)混合溶液 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。称取不含木瓜的阴性对照粉末 2 g,木瓜对照药材粉末 1 g,按上述方法分别制成阴性对照溶液和对照药材溶液。称取熊果苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的对照品溶液。按照 2010 年版《中国药典》薄层色谱法(附录 VI D)试验吸取上述 4 种溶液各 2~10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-丙酮-甲酸(6:0.5:1:0.1)为展开剂展开,晾干,喷以 10% 的硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,分别至日光或紫外灯(365 nm)下检视。在供试品色谱中与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无此斑点。

2.4 乌药 取制剂研细成粉末 2 g,加石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)30 mL,放置 30 min,超声提取 10 min,放冷,过滤,挥干滤液,残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液^[5]。称取不含乌药药材的阴性对照品粉末 2 g,乌药对照药材粉末 1 g,按上述方法分别制成阴性对照溶液和对照药材溶液。按照 2010 年版《中国药典》薄层色谱法(附录 VI D)试验吸取上述 4 种溶液各 2~10 μ L,分别点于同一硅胶 H 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯(15:1)为展开剂展开,晾干,喷以 1% 香草醛溶液。在供试品色谱中与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色斑点,阴性对照无此斑点。

2.5 石菖蒲 取制剂粉末 2 g,加石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)20 mL,水浴回流 1 h,放冷滤过,滤液水浴蒸干,残渣加石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)1 mL,溶解作为供试品溶液^[6]。称取不含石菖蒲药材的阴性对照品 2 g,石菖蒲对照药材 1 g,按上述方法分别制成阴性对照溶液和对照药材溶液。按照 2010 年版《中国药典》薄层色谱法(附录 VI D)试验吸取上述 3 种溶液各 2~10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(4:1)为展开剂展开,晾干,放置 1 h,于紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中与对照药材相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无此斑点。再以碘蒸气熏至斑点显色清晰,在供试品色谱中与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无此斑点。

3 柚皮苷含量测定

3.1 对照品溶液的制备 取柚皮苷对照品,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得到每 1 mL 中含柚皮苷 0.10 mg 的对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备 取制剂适量,研细,取约 2.0 g,精密称定,加 64% 乙醇 100 mL,水浴加热回流 1 h,放冷,滤过,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移并定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微膜过滤,即得供品供试溶液。

3.3 阴性对照溶液制备 按处方比例称取不含土茯苓药材的组方药物,依照供试样品溶液相同的方法制成阴性对照溶液。

3.4 标准曲线制备 分别吸取供试品溶液、柚皮苷对照品溶液、阴性对照溶液适量,加入 10% 的氢氧化钾溶液,室温放置 5 min 显色。以甲醇为空白,200~700 nm 进行扫描。结果对照品溶液和样品溶液在 415 nm 处均有最大吸收,阴性对照溶液在此处无干扰,确定最佳吸收波长为 415 nm^[7]。

分别精密量取 3.1 项下对照品溶液 0.6, 0.8, 10, 12, 1.4, 1.6 mL, 置于 10 mL 量瓶中,加入 10% 的氢氧化钾溶液 0.5 mL, 室温放置 5 min 显色, 甲醇定容至刻度。以色谱甲醇作为空白, 415 nm 处测定吸光度^[8]。以对照品的质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得回归方程 $Y = 0.5420X - 0.0909$ ($r = 0.9993$), 柚皮苷在 0.06~0.16 g·L⁻¹ 线性关系良好。

3.5 精密度试验 分别精密量取 3.1 项下对照品溶液 6 份, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 10% 的氢氧化钾溶液 0.5 mL, 室温放置 5 min 显色, 甲醇稀释至刻度。以色谱甲醇作为空白, 在 415 nm 处测定其吸光度, RSD 0.62%, 表明仪器精密度良好。

3.6 稳定性试验 精密吸取 3.2 项下方法制备的同一样品溶液, 室温放置, 分别在 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 时取样, 每次取样 1 mL, 同时加入 10% 的氢氧化钾溶液 0.5 mL, 室温放置 5 min 显色, 用色谱甲醇定容至 10 mL。以色谱甲醇作为空白, 在 415 nm 处测定其吸光度, RSD 0.66%, 表明样品溶液在 5 h 内稳定。

3.7 回收率试验 精密称取已知柚皮苷含量的样品 6 份, 再精密加入柚皮苷对照品, 按 3.2 项下方法制备, 室温放置。分别取样 1 mL, 同时加入 10% 的氢氧化钾溶液 0.5 mL, 室温放置 5 min 显色, 用甲醇定容至 10 mL。以色谱甲醇作为空白, 在 415 nm 处测定其吸光度, 结果见表 1。

3.8 样品含量测定 取样品 6 批, 按 3.2 项下方法

表 1 痛风立消制剂中柚皮苷加样回收率试验

No.	样品中量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.101	0.199	98.00	98.33	1.23
2	0.104	0.201	97.00		
3	0.108	0.207	99.00		
4	0.110	0.210	100.00		
5	0.101	0.198	97.00		
6	0.102	0.201	99.00		

注: 加入量均为 0.10 mg。

制备, 依照上述色谱条件测定。6 批供试品的吸光度分别为 0.448, 0.452, 0.442, 0.437, 0.467, 0.451; 柚皮苷含量分别是 0.151 9, 0.154 0, 0.148 6, 0.145 9, 0.162 2, 0.153 5 mg/粒。

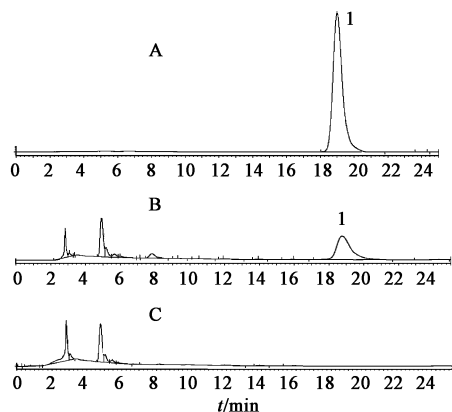
4 绿原酸含量测定

4.1 对照品溶液的制备 取经 80 °C 干燥至恒重的绿原酸对照品 8 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 中约含 0.32 mg 的绿原酸储备液。

4.2 供试品溶液的制备 取痛风立消制剂适量, 研细, 精密称定 10 g, 加 65% 乙醇 50 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加流动相 5 mL 溶解, 用 0.22 μm 微膜滤过, 取滤液, 作为供试品溶液。

4.3 阴性对照溶液制备 按处方比例取不含木瓜的其他药材, 按 4.2 项下操作, 最终制得阴性对照溶液, 备用。

4.4 系统适应性试验 Autanlit C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.05% 三氟乙酸水溶液 (24:76), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 327 nm, 柱温 30 °C, 阴性对照对供试品测定无干扰。理论塔板数不低于 10 000。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 绿原酸

图 1 痛风立消制剂 HPLC

4.5 标准曲线的制备 精密吸取 4.1 项下的绿原

酸对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。制成含绿原酸 0.16 ~ 1.6 g·L⁻¹ 的待测液, 分别吸取 20 μL 进样, 依照色谱条件测定峰面积。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 4\,407\,504.55X - 1\,248\,761.6$ ($r = 0.999\,7$)。结果显示, 绿原酸进样量在 0.32 ~ 1.92 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

4.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液(储备液稀释 10 倍 0.032 g·L⁻¹) 20 μL, 连续进样 6 次, 测定, 色谱峰面积 RSD 0.20%, 结果表明仪器精密度良好。

4.7 稳定性试验 取供试品适量, 精密称定, 按照 4.2 项下方法制备, 室温条件下放置, 分别于 0, 1, 2, 3, 4, 6 h 测定峰面积, 供试品溶液含量 RSD 0.55%。结果表明供试品溶液在 6 h 内稳定性良好。

4.8 重复性试验 取批号 100501 的样品 6 份各 2 g, 加入 70% 乙醇, 加热回流 1 h, 过滤, 水浴蒸干, 加流动相转移并定容至 25 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过。进样, 测定。绿原酸含量 RSD 1.03%, 结果表明供试品重复性良好。

4.9 加样回收率试验 取已知含量的供试品 6 份, 精密称定, 分别准确加入一定量的绿原酸对照品, 按 4.2 项下方法制备, 测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 痛风立消剂中绿原酸加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品 中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	10.00	1.067	2.080	99.61	99.66	0.415
2	10.00	1.067	2.076	99.42		
3	10.00	1.067	2.091	100.14		
4	15.00	1.534	2.560	100.19		
5	15.00	1.534	2.534	99.17		
6	15.00	1.534	2.541	99.45		

注: 加入量均为 1.021 mg。

4.10 样品测定 分别取 6 批样品, 每份 5.0 g, 精密称定, 按 4.2 项下方法制备, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 测定, 以外标法计算样品中绿原酸的含量, 结果含量分别为 0.406 6, 0.406 3, 0.405 8, 0.401 2, 0.411 6, 0.409 8, 0.406 9 mg/粒。

5 讨论

紫外分析方法比起高效液相色谱法简便易行,

然而不够精准, 所以我们就分别选择了紫外分析方法和高效液相色谱法两种方法。在考虑到药物成分于检测可行性方面, 选用了柚皮苷, 而没有选用芦丁, 因为复方中土茯苓含有二氢黄酮类成分^[9], 使用理化性质与二氢黄酮相似的柚皮苷作为对照品, 利用二氢黄酮在氢氧化钾的碱性环境下, 转化成为查尔酮, 使其紫外吸收部位由紫外区移至到可见区^[10], 达到检测目的。

该组方属于中药复方制剂, 成分比较复杂, 考虑到在含量测定时杂质的干扰, 对样品的溶解度进行了测定试验^[11-13]。按《中国药典》2010 年版一部的标准规定, 对样品和绿原酸对照品进行了流动相溶解测定考察, 通过使用甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙腈等试剂进行比较, 结果使用甲醇-0.05% 三氟乙酸水溶液 (24:76) 作为流动相效果最佳。

本方法简便快捷, 结果准确可靠, 为该中药复方制剂的质量监控提供可行的方法。

[参考文献]

[1] 胡仕其, 朱广平, 吴振华. 中西医结合治疗痛风性关节炎 22 例疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(3): 256.

[2] 左宏笛, 鲍家科, 茅向军. HPLC 法测定萆薢分清丸中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 692.

[3] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 17, 71, 85, 311.

[7] 范晓清, 李雪婷, 王沛. 紫外分光法测定痛风宁微丸中柚皮苷的含量[J]. 中国卫生工程学, 2011, 3(10): 247.

[8] 陈丽华, 冯怡, 徐德生, 等. 含甘草总黄酮效应组分微丸的制备及性质考察[J]. 中药材, 2008, 31(3): 434.

[9] 袁久志, 窦德强, 陈英杰, 等. 土茯苓二氢黄酮醇类成分研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 867.

[10] 周斌, 常军, 刘可越, 等. 紫外分光光度法测定甘草中总黄酮的含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15246.

[11] 刘影, 于治国, 袁璐, 等. 茵陈药材中的绿原酸的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(5): 207.

[12] 管玉云, 万庆, 程正. 抗菌消炎片中绿原酸的含量测定[J]. 安徽医药, 2008, 12(9): 797.

[13] 刘晓芳, 马新玉, 周钢. 中国药典菊花绿原酸含量测定方法的探讨. [J]. 新疆中医药, 2006, 24(5): 78.

[责任编辑 顾雪竹]