

· 研究报告 ·

康咳灵合剂质量标准研究

彭敏, 童晓东, 杨水英, 许彦, 姜晓燕 (南通市中医院, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 建立康咳灵合剂的质量标准。**方法** 采用薄层色谱法(TLC)对矮地茶、百部进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定岩白菜素的含量。色谱柱为 Lichrospher C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(20:80);检测波长:275 nm;柱温:30 ℃;流速:1 ml/min。**结果** TLC法能准确鉴别矮地茶和百部,斑点清晰;岩白菜素在0.064 8~0.648 μg ($r=0.9998$)范围内线性关系良好,平均回收率100.24%(RSD为1.9%, $n=6$)。**结论** 本实验建立的方法简便、专属性高、重复性好,结果准确可靠,可用于康咳灵合剂的质量控制。

[关键词] 康咳灵合剂;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)06-0539-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.014

Quality standards for Kangkeling mixture

PENG Min, TONG Xiaodong, YANG Shuiying, XU Yan, JIANG Xiaoyan (Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective** To establish quality standards for Kangkeling mixture. **Methods** Ardisiae Japonicae Herba, Stemonae Radix were identified by TLC. The content of bergenin was determined by HPLC. Lichrospher C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm×250 mm) was used with methanol-water (20:80) as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min. Column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength at 275 nm. **Results** The linear range of bergenin was in the range of 0.064 8-0.648 μg ($r=0.9998$). The average recovery was 100.24% (RSD=1.9%, $n=6$). **Conclusion** The method is simple, specific and sensitive. It can be used to control the quality of Kangkeling mixture.

[Key words] Kangkeling mixture; TLC; HPLC; quality standard

康咳灵合剂是根据南通市中医院临床验方研制而成,由矮地茶、百部、南沙参、天冬、炙枇杷叶、甘草等中药组成,具有润肺、祛痰、止咳、平喘的功效,用于治疗急/慢性、顽固性咳嗽,对病机属热、痰火型咳嗽疗效尤佳。

研发之初仅按照《中华人民共和国药典》制剂通则“合剂”项下的要求对康咳灵合剂作出限定,与现在的中成药制剂质量控制技术相比,在安全性、有效性和质量可控性方面存在严重缺陷,本实验在原有基础上改进康咳灵合剂的质量控制方法,提高其质量标准。

康咳灵合剂组方的君药为矮地茶,具有化痰止咳、清利湿热、活血化瘀的功效^[1],其多种复方制剂

已应用于临床治疗慢性气管炎、支气管哮喘等呼吸系统疾病^[2]。研究表明,矮地茶止咳有效成分为岩白菜素,其作用机制可能是降低咳嗽中枢的兴奋性及保护咽部黏膜^[1],用量低于可待因,连续给药23 d无耐受性^[3],所以测定岩白菜素的含量成为控制矮地茶复方制剂质量的首选。百部为康咳灵合剂的另一重要组成药味,具有润肺下气、止咳、杀虫的功效,善治咳嗽,无论外感、内伤、暴咳、久嗽,均有一定作用。生物碱是百部的主要化学成分,也是明确的具有止咳作用的活性成分^[5],故选择生物碱作为百部薄层鉴别成分。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1260 高效液相色谱仪;二极管阵列检测器;JP-040S 型超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司);EL2401 电子分析天平(梅特勒-托利多有限公司);EPED-S2-30DH 型超纯水器(南京普益达科技发展有限公司);硅胶 G 板(青岛海洋化工)。

[基金项目] 南通市卫生局青年科研基金(WQ2015065)

[作者简介] 彭敏,硕士,中药师,研究方向:医院药学,Email: pengmin8@163.com

[通讯作者] 杨水英,学士,主任中药师,研究方向:医院药学,Email: 2438756110@qq.com

1.2 试药 矮地茶对照药材(中国食品药品检定研究院,批号:121213-0101);百部对照药材(中国食品药品检定研究院,批号:121588-201502);岩白菜素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111532-201203);甲醇为色谱纯,三氯甲烷、乙酸乙酯、甲酸、甲苯、丙酮、浓氨水为分析纯;康咳灵合剂(批号:20150205、20150322、20150406)、阴性对照溶液为医院自制。

2 TLC 鉴别

2.1 矮地茶

2.1.1 溶液的制备 供试品溶液:取本品 30 ml,用稀盐酸调节 pH 值至 2,用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 ml,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 ml 溶解,即得。

对照品溶液:精密称定岩白菜素对照品 0.14 mg,加甲醇 1 ml 溶解,即得。

阴性对照溶液:按处方和供试品溶液制备方法,制备缺矮地茶的阴性对照溶液。

对照药材溶液:取矮地茶对照药材 0.5 g,加水 30 ml,煎煮 30 min,滤过,滤液浓缩至约 10 ml,按供试品溶液制备方法,制备对照药材溶液。

2.1.2 矮地茶的 TLC 鉴别 分别取岩白菜素对照品溶液、阴性对照溶液、3 批供试品溶液各 4 μl,点于同一硅胶 G 板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(21:16:8:0.4)展开,取出,晾干,喷 2% 三氯化铁乙醇溶液或 1% 三氯化铁-1% 铁氰化钾(1:1)混合溶液^[4],于日光下检视,见图 1。结果表明,在与对照品、对照药材一致的位置上,供试品显示相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。

2.2 百部

2.2.1 溶液的制备 供试品溶液:取本品 20 ml,加浓氨试液 3 ml,摇匀,用三氯甲烷萃取 3 次,每次 20 ml,合并三氯甲烷,蒸干,残渣加甲醇 1 ml 溶解,即得。

对照药材溶液:取百部对照药材 1 g,加水 50 ml,煎煮 30 min,过滤,滤液浓缩至 20 ml,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。

阴性对照溶液:按处方和供试品溶液制备方法,制备缺百部的阴性对照溶液。

2.2.2 百部的薄层层析 分别取阴性对照溶液、百部对照药材溶液、3 批供试品溶液各 2 μl,点于同一硅胶 G 板上,以甲苯-丙酮-甲醇(8:3:0.5)为展开剂,展开,取出并晾干,喷以稀碘化铋钾试液,于日光下检视。结果表明,在与对照药材一致的位置上,供

试品显示相同颜色的斑点,同时阴性对照无干扰,见图 2。

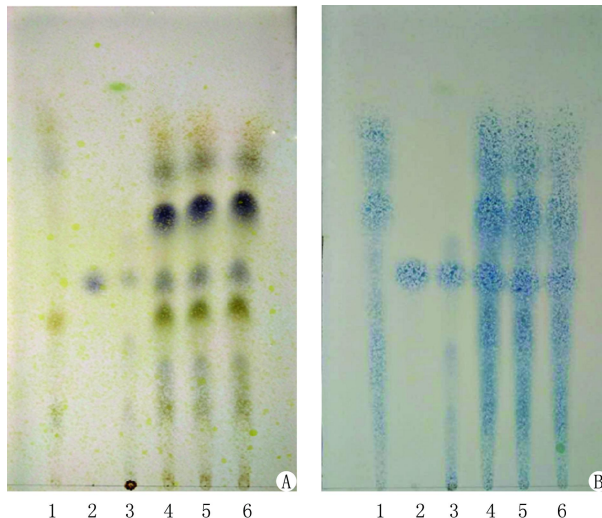


图 1 矮地茶 TLC 图

A.显色剂为 2% 三氯化铁乙醇溶液;B.显色剂为 1% 三氯化铁-1% 铁氰化钾(1:1)溶液;1.阴性对照;2.对照品;3.对照药材;4~6.康咳灵合剂(批号:20150205、20150322、20150406)

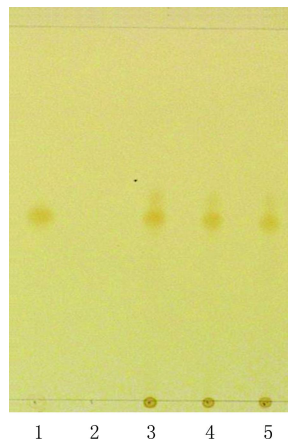


图 2 百部 TLC 图

1. 对照药材;2.阴性对照;3~5.康咳灵合剂(批号:20150205、20150322、20150406)

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱:Lichrospher C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(20:80);检测波长:275 nm;流速:1 ml/min;进样量:5 μl;柱温:30 ℃。

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 精密称定岩白菜素对照品 0.129 6 mg,加甲醇定容至 1 ml,即得。

3.2.2 供试品溶液 精密量取本品 5 ml,加入甲醇,定容至 25 ml,摇匀,过滤,取滤液,即得。

3.2.3 阴性对照溶液 依处方制成缺矮地茶的康

咳灵合剂,按“3.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

3.3 方法学考察

3.3.1 系统适用性试验 将制备好的岩白菜素对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按“3.1”项

下的色谱条件,注入液相色谱仪,记录色谱图。测得样品中岩白菜素的理论塔板数为8990,岩白菜素色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度 >1.50 。供试品在与岩白菜素对照品相同的保留时间处,出现相同的吸收峰;阴性对照在此处无色谱峰干扰,结果见图3。

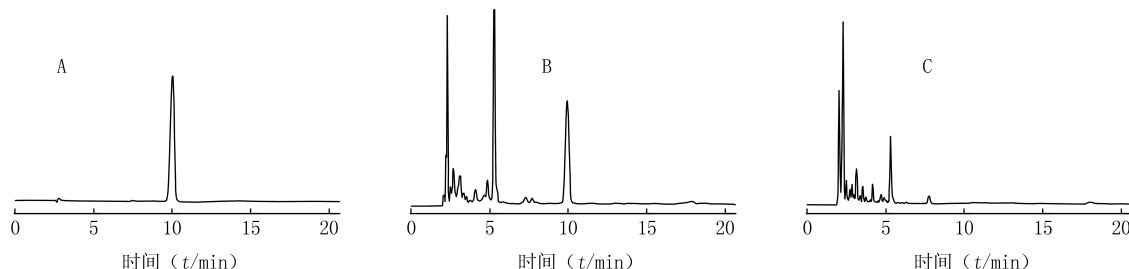


图3 康咳灵合剂 HPLC 图

A. 对照品; B. 康咳灵合剂; C. 阴性对照

3.3.2 线性关系考察 分别精密吸取岩白菜素对照品溶液(0.1296 mg/ml)0.5、1、2、3、4、5 μ l,注入液相色谱仪,按“3.1”项下的色谱条件测定,以岩白菜素的进样量(X/μ g)为横坐标,峰面积的积分值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程: $Y = 1263.6578X + 4.5752$, $r = 0.9998$,线性范围0.0648~0.648 μ g。

3.3.3 精密度试验 取岩白菜素对照品溶液(0.1296 mg/ml),按“3.1”项下方法,连续进样6次,每次5 μ l,测定峰面积值,RSD为0.19% ($n=6$),说明仪器的精密度良好。

3.3.4 重复性试验 取批号为20150205的样品6份,按“3.2.2”项下方法制备6份,测得岩白菜素平均含量为0.327 mg/ml,RSD为0.76% ($n=6$),说明此法的重复性良好。

3.3.5 稳定性试验 取批号为20150205的样品,按照“3.2.2”项下方法制备样品溶液,分别在0、2、4、8、12、16 h进样,进样量5 μ l,测定峰面积,RSD为0.75%,说明样品溶液在16 h内稳定。

3.3.6 加样回收率试验 取已知含量的样品6份,每份2 ml,分别精密加入岩白菜素对照品,按“3.2.2”项下方法制备样品溶液,分别进样5 μ l,计算回收率及RSD,结果见表1。

3.3.7 含量测定 取3批样品(批号:20150205、20150322、20150406),按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“3.1”项下色谱条件,测定样品峰面积,并计算含量,结果见表2。

4 讨论

4.1 方解 康咳灵合剂是由矮地茶、百部、南沙参、

表1 加样回收率试验结果

取样量 (V/ml)	样品含量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2	0.654	0.6480	1.3202	102.81	100.24	1.90
2	0.654	0.6480	1.2991	99.54		
2	0.654	0.6480	1.2950	98.93		
2	0.654	0.6480	1.3184	102.53		
2	0.654	0.6480	1.2936	98.70		
2	0.654	0.6480	1.2951	98.93		

表2 样品含量测定结果(mg/ml)

批号	岩白菜素含量	平均含量
20150205	0.332	0.325
20150322	0.327	
20150406	0.315	

天冬、炙枇杷叶、甘草、重楼、桃仁、麦芽等中药煎煮、浓缩而成,组方中矮地茶具有化痰止咳、清利湿热的功效^[6],善治各种新久咳嗽,喘满痰多,为方中君药;百部为臣药,具有润肺止咳的功效;南沙参、炙枇杷叶、重楼共为佐药,清热、祛痰、止咳;桃仁、麦芽辅助君药和臣药消积滞、祛痰,为使药。本方组成共奏润肺、祛痰、止咳、平喘的功效,善治热、痰火型咳嗽。

4.2 TLC 条件的选择 在对矮地茶鉴别的过程中,比较了三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(5:4:2)^[5]、二氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇:甲酸(5:4:2:0.4)、三氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇:甲酸(21:16:8:0.4)等多种展开系统。其中,三氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇:甲酸(21:16:8:0.4)效果最佳,斑点分离清晰,无干扰,重现性较好。同时,比较了两种显色剂的显色效果,以1%三氯化铁-1%铁氰化钾

(1:1)^[5]的混合溶液作为显色剂,在日光下所有斑点都显示蓝色,呈条带状,前后斑点分界不清晰,专属性差;以2%三氯化铁乙醇溶液作为显色剂,显色明显,专属性较好。但在图1中,与对照品相对应的位置上,对照药材的斑点显色较浅,排除显色剂喷淋不均匀、点样量较小的因素,可能是由于对照药材取样量较少、浓度较低引起的。

沉淀反应是鉴别百部中生物碱最方便快捷的方法,常用的沉淀试剂有碘化汞钾、碘化铋钾、碘化钾碘等,由于本品颜色较深,虽有少量沉淀物析出,但无法识别颜色。本实验选择了稀碘化铋钾溶液作为百部薄层鉴别的显色剂,具有显色明显、专属性高的优点。同时,在薄层展开前,可使用浓氨水预先饱和,可避免斑点拖尾的现象。

4.3 提取溶剂与 HPLC 条件的选择 在对供试品前处理的过程中,比较了50%甲醇、70%甲醇、100%甲醇等不同提取溶剂对岩白菜素含量的影响,结果表明,以100%甲醇作为提取溶剂,测得的生物样品中,岩白菜素的含量相对较高,故确定以100%

甲醇作为提取溶剂。同时参考《中华人民共和国药典(2015年版)》^[6]关于矮地茶中岩白菜素含量测定的方法,选用甲醇:水(20:80)作为流动相。

【参考文献】

- [1] 刘伟林,杨东爱,余胜民,等.矮地茶药理作用研究[J].时珍国医国药,2009,20(12):3002-3003.
- [2] 陈向东,张光大,刘法锦,等.HPLC法同时测定矮地茶配方颗粒中岩白菜素和槲皮苷[J].广东药学院学报,2012,28(5):522-525.
- [3] 董成梅,杨丽川,邹澄,等.岩白菜素的研究进展[J].昆明医学院学报,2012,(1):150-154.
- [4] 王春艳,张立新,宋成君.垂盆草颗粒质量标准研究[J].黑龙江医药,2009,22(2):128-130.
- [5] 胡君萍,张因,毛一脚,等.《中国药典》3种百部的止咳作用比较[J].中国中药杂志,2009,34(23):3096-3104.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:361.

[收稿日期] 2017-01-13 [修回日期] 2017-04-10

[本文编辑] 李睿旻

(上接第494页)

- [35] Brincat M, Gambin J, Brincat M, *et al.* The role of vitamin D in osteoporosis[J]. *Maturitas*, 2015, 80(3):329-332.
- [36] Papadimitropoulos E, Wells G, Shea B, *et al.* Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VIII: Meta-analysis of the efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(4):560-569.
- [37] Francis RM, Aspray TJ, Bowring CE, *et al.* National Osteoporosis Society practical clinical guideline on vitamin D and bone health[J]. *Maturitas*, 2015, 80(2):119-121.
- [38] Reginster JY, Brandi ML, Cannata-Andía J, *et al.* The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis[J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(6):1667-1671.
- [39] Meunier PJ, Roux C, Seeman E, *et al.* The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(5):459-468.
- [40] Payer J. Treatment of post-menopausal osteoporosis by strontium ranelate in everyday practice-DUAL study[J]. *Clin Exp Pharmacol*, 2015, 5(5):188-192.
- [41] Abdul-Majeed S, Mohamed N, Soelaiman IN. The use of delta-tocotrienol and lovastatin for anti-osteoporotic therapy [J]. *Life Sci*, 2015, 125:42-48.
- [42] Dai L, Xu M, Wu H, *et al.* The functional mechanism of simvastatin in experimental osteoporosis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2016, 34(1):23-32.
- [43] Du J, Wei YJ, Peng C, *et al.* Establishment of a luciferase assay-based screening system for detecting estrogen receptor agonists in plant extracts[J]. *Bone*, 2011, 49(3):572-579.
- [44] Zhang Q, Qin L W, He W, *et al.* Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity[J]. *Planta Med*, 2007, 73(1):13-19.
- [45] Zhang QY, Qin LP, Huang BK, *et al.* Study on effects of total coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on osteoporosis in ovariectomized rats[J]. *Chin Pharmac J*, 2003, 38(2):101-103.
- [46] Cao DP, Zheng YN, Qin LP, *et al.* *Curculigo orchoides*, a traditional Chinese medicinal plant, prevents bone loss in ovariectomized rats[J]. *Maturitas*, 2008, 59(4):373-380.
- [47] Ma XQ, Zhenga CJ, Zhang Y, *et al.* Antiosteoporotic flavonoids from *Podocarpium podocarpum*[J]. *Phytochemistry Lett*, 2013, 6(1):118-122.

[收稿日期] 2017-08-24 [修回日期] 2017-10-16

[本文编辑] 李睿旻