

## 结石通片质量标准的研究

陈华龙<sup>1\*</sup>, 谭小勇<sup>1</sup>, 谭莉萍<sup>2</sup>

(1. 韶关市药品检验所, 广东 韶关 512028; 2. 韶关学院医学院, 广东 韶关 512026)

[摘要] 目的: 研究建立结石通片质量标准。方法: 采用 TLC 法分别对结石通片中广金钱草、车前草、石韦进行了定性鉴别, 采用 HPLC 法对广金钱草中的槲皮素和山奈素进行了含量测定。结果: 结石通片中广金钱草、车前草、石韦的薄层色谱鉴别斑点清晰, 分离较好; HPLC 含量测定结果显示, 槲皮素在 0.128 4 ~ 0.342 4  $\mu\text{g}$  呈线性关系,  $r=0.999\ 3$  ( $n=6$ ), 平均加样回收率 97.7%, RSD 0.8%; 山奈素在 0.118 8 ~ 0.316 8  $\mu\text{g}$  呈线性关系,  $r=0.999\ 5$  ( $n=6$ ), 平均加样回收率 97.3%, RSD 0.7%。结论: 所建立的方法简便准确, 分离度高, 专属性强, 重复性好, 可有效控制结石通片的质量。

[关键词] 结石通片; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0077-04

## Studies on Qualitative and Quantitative Methods for Jieshitong Tablets

CHEN Hua-long<sup>1\*</sup>, TAN Xiao-yong<sup>1</sup>, TAN Li-ping<sup>2</sup>

(1. Shaoguan Institute for Drug Control, Shaoguan 512028, China;

2. Pharmacy College of Shaoguan University, Shaoguan 512026, China)

[Abstract] **Objective:** To study the qualitative and quantitative methods for Jieshitong Tablets. **Method:** *Desmodii Styracifolii Herba*, *Plantaginis Herba* and *Pyrrosiae Folium* in Jieshitong Tablets were identified with the method of TLC. Quercetin and kaempferol were determined with the method of HPLC. **Result:** By TLC, the spots of three herbal drugs were well separated and without interference. Quantitative analysis of HPLC showed that the linear range of quercetin and kaempferol was 0.128 4 ~ 0.342 4  $\mu\text{g}$  and 0.118 8 ~ 0.316 8  $\mu\text{g}$ , respectively. The average recovery of quercetin and kaempferol was 97.7% and 97.3%, respectively. The RSD ( $n=6$ ) was 0.7% and 0.8%, respectively. **Conclusion:** The method set up could effectively control the quality of Jieshitong Tablets.

[Key words] Jieshitong Tablets; quality standards; TLC; HPLC

结石通片由广金钱草、石韦、车前草、茯苓等多味药材组成, 具有清热利尿、通淋排石、镇痛止血之功效。临床多用于治疗泌尿系统感染, 膀胱炎, 肾炎水肿, 尿路结石, 血尿, 淋漓混浊, 尿道灼痛等, 收载于卫生部药品标准中药成方制剂第十三册<sup>[1]</sup>, 质量标准中仅有性状和检查项, 难于控制药品的质量, 为了有效地控制该制剂的质量, 增加广金钱草, 车前草, 石韦的薄层鉴别和广金钱草中槲皮素和山奈素的 HPLC 含量测定方法, 为结石通片的质量标准制

订了简便可行、准确可靠的定性定量检测方法。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agilent-1200 高效液相色谱仪(德国), UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津), CQ2200 超声波清洗器(上海新超超声波仪器有限公司), AG-135 电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 对照品及对照药材均购于中国药品生物制品检定所: 广金钱草对照药材(121248 - 200502), 槲皮素对照品(10081-9905), 绿原酸对照品(110753 - 200413), 熊果酸(110742 - 200415), 山奈素对照品(110861 - 200405); 车前草对照药材(121387-200401), 绿原酸对照品(110753-200212); 结石通片(批号 0804106, 0902105, 0902104, 广东恒

[收稿日期] 20100225(004)

[通讯作者] 陈华龙, 主管药师, 从事药品质量的研究。Tel: (0751) 8736706; E-mail: xlongs006@126.com

诚制药有限公司); 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂), 甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为纯化水, 无水乙醇为分析纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 薄层色谱法鉴别

**2.1 广金钱草的 TLC** 取本品 5 片, 去包衣, 研细, 加 50% 乙醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸去乙醇, 加水 20 mL, 用乙酸乙酯提取 3 次, 每次 15 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加无水乙醇 1.5 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取广金钱草对照药材 2 g, 加 50% 乙醇 30 mL, 同法制成对照药材溶液。取槲皮素对照品 0.005 81 g, 加无水乙醇 1.5 mL 使溶解, 即得槲皮素对照品溶液。按处方比例及制法, 制成广金钱草的阴性对照样品, 相当于供试品的量, 按供试品溶液的制法, 制成广金钱草对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液和阴性对照液各 10  $\mu$ L, 分别点于同一含 1% 氢氧化钠的 0.3% 羧甲基纤维素钠溶液为黏合剂铺制的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-丁酮(6 1 1) 溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外灯(365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品和对照药材相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 置氨蒸气熏后, 斑点颜色加深, 阴性对照无上述斑点出现。

**2.2 车前草的 TLC** 取结石通片 5 片, 去包衣, 研细, 加水 40 mL, 超声 30 min, 溶解, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次(20 mL, 10 mL), 合并乙酸乙酯, 水洗 2 次, 每次 10 mL, 挥干, 残渣加无水乙醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取车前草对照药材 2 g, 用乙酸乙酯超声处理 30 min, 滤过, 滤液挥干, 残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解, 作为车前草对照药材溶液。取熊果酸对照品 0.010 06 g, 加无水乙醇 10 mL 使溶解, 作为熊果酸对照品溶液。按处方比例及制法, 制成车前草的阴性对照样品, 相当于供试品的量, 按供试品溶液的制法, 制成车前草对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取供试品溶液、车前草对照药材溶液、熊果酸对照品溶液和车前草阴性对照溶液各 2  $\mu$ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇(20 1) 为展开剂展开, 取出晾干, 再展开, 取出, 晾干, 置碘蒸气中显色。供试品色谱中, 在与对照品和对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无上述斑点出现。

**2.3 石韦的 TLC** 取结石通片 5 片, 去包衣, 研细, 加甲醇 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30 mL 使溶解移至分液漏斗中, 加乙醚振摇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并醚液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取绿原酸对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的绿原酸对照品溶液。按处方比例及制法, 制成石韦的阴性对照样品, 相当于供试品的量, 按供试品溶液的制法, 制成石韦对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B) 试验, 取供试品溶液 10  $\mu$ L、绿原酸对照品溶液和阴性对照溶液 5  $\mu$ L, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以苯-丁酮-甲醇(3 1 6) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无上述斑点出现。

## 3 含量测定

**3.1 检测波长的选择** 对槲皮素对照品和山奈素对照品溶液于 200 nm~400 nm 波长范围进行扫描, 其在 367 nm 有最大吸收。

**3.2 色谱条件**<sup>[2-3]</sup> Agilent 1200 高效液相色谱仪, 色谱柱: 依利特 Hypersil ODS2(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m); 以流动相为甲醇-0.4% 磷酸(60 40) 为流动相; 检测波长为 367 nm; 流速为 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>; 进样量 10  $\mu$ L; 柱温 30  $^{\circ}$ C。理论板数按山奈素峰计应不得低于 3 000。

**3.3 对照品溶液的制备** 精密称取已干燥至恒重的槲皮素对照品和山奈素对照品 10.72 mg、9.90 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加入 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含槲皮素 0.021 4 mg 和山奈素 0.019 8 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。

**3.4 供试品溶液的制备** 取 20 片, 除去糖衣, 研细, 取约 1 g, 精密称取, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇溶液 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷至室温, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 10 mL, 加盐酸 5 mL, 置 90  $^{\circ}$ C 水浴中加热水解 1 h, 取出, 迅速冷却, 转移至 25 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

**3.5 线性关系考察** 分别精密吸取上述对照品溶液 6, 8, 10, 12, 14, 16  $\mu$ L, 按上述条件分别注入色谱

仪测定,以进样量( $X$ )对峰面积( $Y$ )进行回归,得槲皮素回归方程  $Y = 8.53 \times 10^2 X - 1.28$ ,  $r = 0.9993$ , 在  $0.1284 \sim 0.3424 \mu\text{g}$  线性关系良好;山奈素回归方程  $Y = 1.29 \times 10^3 X - 1.15$ ,  $r = 0.9995$ , 在  $0.1188 \sim 0.3168 \mu\text{g}$  线性关系良好。

**3.6 专属性试验** 取除广金钱草的其余药味,按制

备工艺要求制成不含金钱草的制剂,按供试品溶液制备项下的方法制备阴性对照溶液。按上述色谱条件进行测定,结果在槲皮素对照品和山奈素对照品相同保留时间处无干扰峰出现,表明方中其它药味对槲皮素对照品和山奈素对照品的测定无干扰,见图 1。

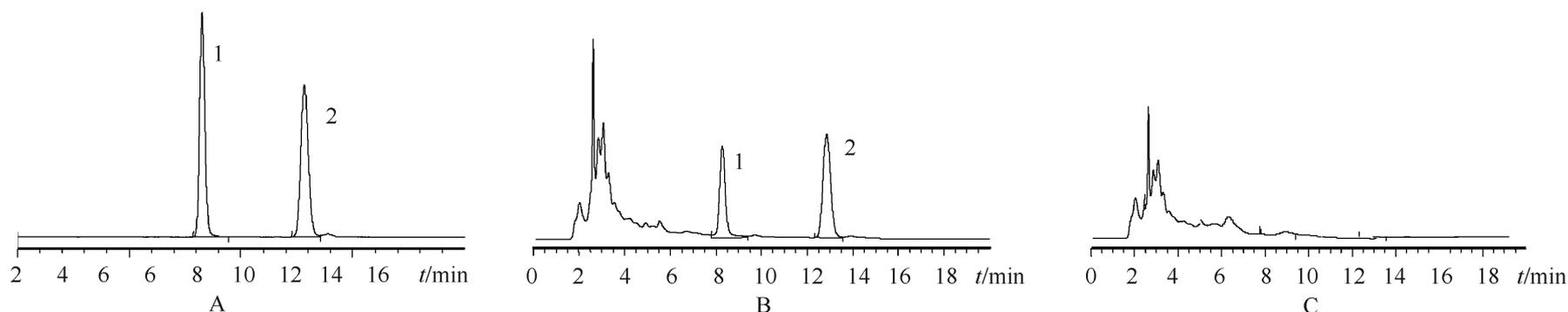


图 1 结石通片 HPLC 色谱图

A. 槲皮素对照品和山奈素对照品; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液  
1. 槲皮素; 2. 山奈酚

**3.7 精密度试验** 精密吸取上述对照品溶液  $10 \mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 重复进样 5 次。结果槲皮素峰面积积分值 RSD 为 0.5%, 山奈素峰面积积分值 RSD 为 0.8%。

**3.8 稳定性试验** 取上述供试品溶液(批号 0804106) 分别于配制后 0, 3, 6, 9, 12, 15 h 测定槲皮素和山奈素峰面积, 进样量  $10 \mu\text{L}$ 。结果槲皮素峰面积积分值 RSD 为 0.7% ( $n=6$ ), 山奈素峰面积积分值 RSD 为 0.5% ( $n=6$ ), 表明供试品溶液在 15 h 内稳定, 稳定性良好。

**3.9 重复性试验** 取相同批号样品(批号 0804106) 制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件测

定, 分别进样  $10 \mu\text{L}$ , 测定槲皮素和山奈素峰面积。结果槲皮素峰面积积分值 RSD 为 0.3% ( $n=6$ ), 山奈素峰面积积分值 RSD 为 0.7% ( $n=6$ ), 结果表明本方法重现性良好。

**3.10 加样回收率试验** 精密称取已知含量的样品(批号 0804106, 槲皮素含量  $1.245 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 山奈素含量  $0.947 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 适量 6 份, 分别精密加入对照品的量为样品量的 80%、100% 和 120%, 混匀, 按“3.4”项中供试品溶液的制备方法制备, 按上述色谱条件测定, 计算加样回收率, 槲皮素的平均加样回收率 97.7%, RSD 0.8%, 山奈素的平均加样回收率 97.3%, RSD 0.7%, 说明加样回收率良好, 该方法

表 1 槲皮素、山奈素加样回收率试验 ( $n=6$ )

称样量/g	样品含量/ $\mu\text{g}$		加入量/ $\mu\text{g}$		测得值/ $\mu\text{g}$		回收率/%		平均回收率/%		RSD/%	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.5798	0.1155	0.0879	0.0937	0.0712	0.2025	0.1528	96.8	96.0				
0.5628	0.1121	0.0853	0.0937	0.0712	0.2031	0.1530	98.7	97.8				
0.5588	0.1113	0.0847	0.1157	0.0839	0.2198	0.1634	96.8	96.9				
0.5932	0.1182	0.0899	0.1157	0.0839	0.2279	0.1692	97.4	97.4	97.7	97.3	0.8	0.7
0.5358	0.1067	0.0812	0.1295	0.1062	0.2328	0.1826	98.6	97.4				
0.5679	0.1131	0.0860	0.1295	0.1062	0.2372	0.1884	97.8	98.0				

注: A 为槲皮素, B 为山奈素。

稳定可行。结果见表 1。

**3.11 样品含量测定** 取 3 批样品按供试品溶液制备方法制备, 并按上述色谱条件测定峰面积, 每批样品测定 2 份, 以外标法计算含量, 取其含量平均值, 结

果见表 2。

#### 4 讨论

**4.1** 采用 TLC 法对本品中的广金钱草、车前草、石

韦进行鉴别,专属性强,分离效果好,操作简便。

**4.2 含量测定供试品溶液提取条件的选择** 分别采用将样品水溶、离心,上清液直接进样及不同含水比例的甲醇、乙醚、乙醇超声、回流提取的方法,结果表明用 80% 甲醇超声提取含量较高,而以水溶、其它含水比例的甲醇、乙醇提取含量较低,且超声提取省时、方法简便,效果佳,故选择 80% 甲醇超声提取方法;由不同超声时间比较可知,超声时间 30 min 与 60 min 对样品提取结果无显著影响,超声 20 min 含量略偏低,故选择超声 30 min。

表 2 槲皮素、山奈素含量测定 ( $n=3$ )

No.	槲皮素含量 /(mg/片)	山奈素含量 /(mg/片)	RSD/%
0804106	0.338	0.248	1.3
0902105	0.359	0.232	1.0
0902104	0.361	0.258	1.1

**4.3 含量测定流动相的选择** 比较了不同比例的甲醇-水、甲醇-乙腈-水、甲醇-冰醋酸作流动相进行试验,结果表明以甲醇 - 0.4% 磷酸 (60 : 40) 为流动相槲皮素和山奈素的峰形好<sup>[4]</sup>,保留时间适中,柱效高,分离度大,与其他干扰峰能很好的分离。

[参考文献]

- [1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 第十三册. 1997: 159.
- [2] 张集盘, 叶国梁, 石晶萍, 等. RP-HPLC 法测定金钱草中槲皮素和山奈素两种黄酮成分的含量 [J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(1): 31.
- [3] 江维克, 王丽, 周涛. HPLC 法测定脑心清片中槲皮素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(5): 12.
- [4] 李正言, 翟延君, 滕宇, 等. 不同商品柘木中槲皮素和山萘酚的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2186.

[责任编辑 顾雪竹]