

款冬花配方颗粒的质量标准研究^Δ

许洪波^{1*}, 蔡兴航^{1#}, 毛晶晶², 杨康³, 许怀礼¹(1. 陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西咸阳 712083; 2. 杨凌科森生物制药有限责任公司, 西安 712100; 3. 西安市中医医院药剂科, 西安 710021)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1898-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.06

摘要 目的: 为建立款冬花配方颗粒的质量标准提供参考。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对款冬花配方颗粒进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定款冬花配方颗粒中款冬酮的含量, 色谱柱为 Thermo ODS Hypersil C₁₈, 流动相为甲醇-水(85:15, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 20 μL。结果: 款冬酮 TLC 图斑点清晰、分离度良好, 阴性对照对测定无干扰。款冬酮检测质量浓度的线性范围为 1.39~27.75 μg/mL($r=0.999\ 9$); 定量限、检测限分别为 0.153 87、0.051 42 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%; 加样回收率为 97.12%~103.96% (RSD=2.60%, $n=6$)。结论: 该方法操作简单、准确、重复性好, 可用于款冬花配方颗粒的质量控制。

关键词 款冬花配方颗粒; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 款冬酮

Study on Quality Standard for *Tussilago farfara* Formula Granules

XU Hongbo¹, CAI Xinghang¹, MAO Jingjing², YANG Kang³, XU Huaili¹ (1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of TCM Resources Industrialization, Shaanxi University of TCM, Shaanxi Xianyang 712083, China; 2. Yangling Charisma Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 712100; 3. Dept. of Pharmacy, Xi'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Xi'an 710021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the establishment of quality standard of *Tussilago farfara* formula granules. METHODS: TLC method was used for qualitative identification of tussilagone in *T. farfara* formula granules. The content of tussilagone in *T. farfara* formula granule was determined by HPLC. The determination was performed on a Thermo ODS Hypersil C₁₈ column with the mobile phase consisted of methanol-water (85:15, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 220 nm, the column temperature was 25 °C. Sample size was 20 μL. RESULTS: TLC spots of tussilagone were clear and well-separated, without interference from negative control. The linear range of tussilagone was 1.39-27.75 μg/mL ($r=0.999\ 9$). The limits of quantification and detection were 0.153 87 and 0.051 42 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%. The recoveries were 97.12%-103.96% (RSD=2.60%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and suitable for quality control of *T. farfara* formula granules.

KEYWORDS *Tussilago farfara* formula granules; Quality standard; TLC; HPLC; Tussilagone

[8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861.

[9] VEERARAGHAVAN S, VISWANADHA S, THAPPALI S, et al. Simultaneous quantification of lenalidomide, ibrutinib and its active metabolite PCI-45227 in rat plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.11.041.

[10] ROOD JJM, VAN HOPPE S, SCHINKEL AH, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81603284); 陕西省教育厅科学研究计划项目(No.18JK0222)

* 讲师, 博士。研究方向: 中药药效物质与中药质量控制。电话: 029-38182203。E-mail: xhb2005@sntcm.edu.cn

通信作者: 讲师, 硕士。研究方向: 中药制备工艺。电话: 029-38182204。E-mail: cai0101001@126.com

the simultaneous determination of the irreversible BTK inhibitor ibrutinib and its dihydrodiol-metabolite in plasma and its application in mouse pharmacokinetic studies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.10.033.

[11] 林密真, 张美敬, 房盛楠, 等. 磷脂复合物技术与制剂新技术在中药中联合应用的研究进展[J]. *中国药房*, 2016, 27(34): 4864-4867.

[12] 王彦明, 钟武, 周辛波. 口服布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂: 依鲁替尼[J]. *临床药物治疗杂志*, 2015, 13(4): 21-24.

[13] BEG S, RAZA K, KUMAR R, et al. Improved intestinal lymphatic drug targeting via phospholipid complex-loaded nanolipospheres of rosuvastatin calcium[J]. *RSC Adv*, 2016. DOI: 10.1039/C5RA24278A.

(收稿日期: 2018-11-15 修回日期: 2019-05-05)

(编辑: 张元媛)

款冬花配方颗粒是以款冬花饮片为原料,经现代制药技术提取、浓缩、分离、干燥、制粒、包装而成的颗粒剂,具有润肺下气、止咳化痰之功效,是中医临床常用的药物之一^[1]。目前市售不同厂家的款冬花配方颗粒虽有各自的质量标准,但质量良莠不齐,且尚无统一的行业或国家质量标准;此外,现行的企业标准主要从性状、鉴别、检查、浸出物等方面对款冬花配方颗粒的质量进行控制,较少有涉及含量测定的内容^[2]。因此,建立款冬花配方颗粒简便可行的定性、定量检测方法显得尤为重要。基于此,本研究采用薄层色谱法(TLC)对款冬花配方颗粒进行定性鉴别,采用高效液相色谱法(HPLC)对该方的特征成分款冬酮进行定量分析,旨在为其质量控制及质量标准的建立提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括CBM-20A型控制器、LC-20AT型双泵、SPD-20A型紫外检测器、CTO-20A型柱温箱、lab Solutions色谱工作站(日本Shimadzu公司);HT-2109型电磁炉(广东美的生活电器制造有限公司);N-1100型旋转蒸发仪(日本EYELA公司);Vaco 5型冷冻干燥机(德国Zirbus公司);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CPA2250型电子天平(德国Sartorius公司);PTL型电子天平(福州华志科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

款冬花配方颗粒(批号:180401、180402、180403,规格:10 g/袋)、缺款冬花的阴性样品(批号:180407,规格:10 g/袋)均由陕西中医药大学协同创新中心实验室自制;款冬酮对照品(批号:111884-201704,纯度:99.1%)、款冬花对照药材(批号:121449-201704)均由中国食品药品检定研究院提供;硅胶GF254薄层板(青岛海浪硅胶干燥剂有限公司,批号:20160702);甲醇为色谱醇,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 药材

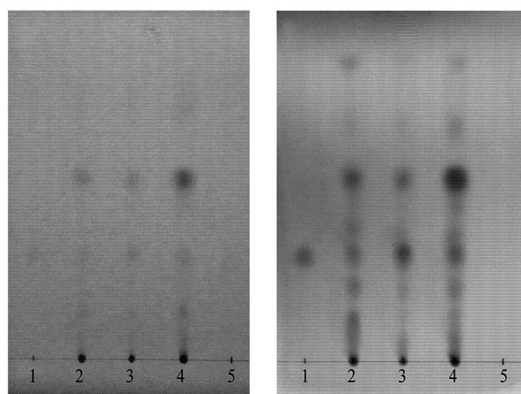
款冬花饮片(批号:0180303)购自西安药材市场(药材产地为内蒙古),经陕西中医药大学药学院王薇教授鉴定为菊科植物款冬(*Tussilago farfara* L.)的干燥花蕾。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

取款冬花配方颗粒1 g,研细,加甲醇10 mL,超声(功率:300 W,频率:40 kHz,下同)处理1.5 h,滤过,蒸干,残渣加乙酸乙酯1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取款冬花饮片1 g,加乙醇10 mL,超声提取1.5 h,滤过,蒸干,残渣加乙酸乙酯1 mL使溶解,作为饮片样品溶液。取款冬花对照药材1 g,按饮片样品溶液制备方法制成款冬花对照药材溶液。另取款冬酮对照品5 mg,加乙酸乙酯5 mL,制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶

液。取缺款冬花的阴性样品1 g,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按2015年版《中国药典》(四部)通则中“TLC法”^[3]操作,吸取上述5种溶液各5 μL,分别点于同一硅胶GF254薄层板上,以石油醚(60~90 ℃)-丙酮(10:1, V/V)为展开剂(温度为21 ℃,湿度为47%),展开,取出,晾干,再以同一展开剂展开,取出,晾干,置于紫外光灯(254 nm)下检视,再喷以硫酸-乙醇溶液,加热至斑点清晰,记录斑点位置。结果,供试品色谱中,在与对照药材相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图1。



A. 紫外光灯

B. 硫酸-乙醇

注:1.对照品;2.对照药材;3.饮片样品;4.供试品;5.阴性对照

Note: 1. substance control; 2. reference substance; 3. sample of decoction piece; 4. test sample; 5. negative control

图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Thermo ODS Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(85:15, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 25 ℃; 进样量: 20 μL。

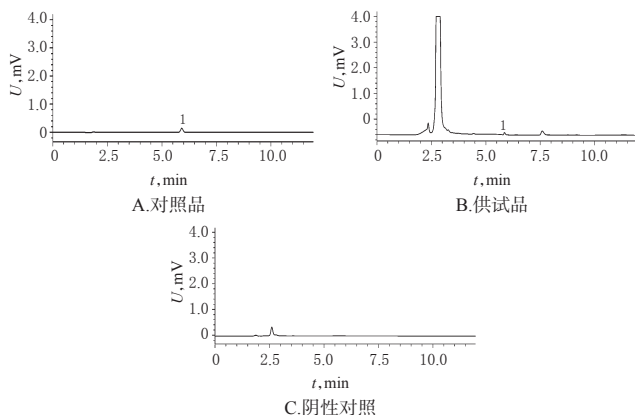
2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取款冬酮对照品11.20 mg(实际质量为11.10 mg),加流动相适量,制成质量浓度为27.75 μg/mL的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取款冬花配方颗粒1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加甲醇10 mL,称定质量,超声处理1.5 h,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取缺款冬花的阴性样品1 g,按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.2.5 系统适用性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2。结果,在上述色谱条件下,理论板数按款冬酮峰计不低于5 000,分离度>1.5,其他成分对测定无干扰。

2.2.6 线性关系考察 取“2.2.2”项下对照品溶液0.5、1、2、4、8、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为1.39、2.78、5.55、11.10、



注: 1. 款冬酮

Note: 1. tussilagone

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

22.20、27.75 $\mu\text{g/mL}$ 的系列线性关系标准溶液, 取适量, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以待测成分质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得款冬酮的回归方程为 $y=43\ 103.13x+33.58$ ($r=0.999\ 9$)。结果, 款冬酮检测质量浓度线性范围为 1.39~27.75 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.7 定量限与检测限考察 取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 倍比稀释, 以信噪比 10:1、3:1 分别测定定量限、检测限。结果, 款冬酮的定量限为 0.153 87 $\mu\text{g/mL}$, 检测限为 0.051 42 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.8 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 款冬酮峰面积的 RSD 为 0.94% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.9 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号: 180402)适量, 分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 款冬酮峰面积的 RSD 为 0.86% ($n=6$), 表明供试品溶液于室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.2.10 重复性试验 取配方颗粒样品适量(批号: 180402), 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按回归方程计算样品中款冬酮的含量。结果, 款冬酮的平均含量为 0.003 2%, RSD 为 1.88% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.11 加样回收率试验 取已知含量的配方颗粒样品(批号: 180402)适量, 共 6 份, 精密称定, 分别加入一定量的款冬酮对照品, 按“2.2.3”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, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

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,%
0.030 0	0.027 8	0.058 7	103.24	101.44	2.60
0.031 4	0.027 8	0.058 4	97.12		
0.030 9	0.027 8	0.058 3	98.56		
0.030 8	0.027 8	0.059 2	102.16		
0.032 3	0.027 8	0.061 2	103.96		
0.031 7	0.027 8	0.060 5	103.60		

2.2.12 耐用性试验 精密称取配方颗粒样品(批号: 180402)适量, 按“2.2.3”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, 考察不同色谱柱(Thermo ODS Hypersil C_{18} 、Agilent TC- C_{18} 、Hyperil BDS C_{18})、流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、柱温(20、25、30 $^{\circ}\text{C}$)对样品含量测定结果的影响, 结果见表 2。结果表明, 当色谱柱、流速和柱温发生一定程度变化时, 本方法能满足试验要求, 本方法耐用性良好。

表 2 耐用性试验结果

Tab 2 Results of durability tests

项目	分项	含量,%	平均含量,%	RSD,%
色谱柱	Thermo ODS Hypersil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)	0.003 23	0.003 14	2.13
	Agilent TC- C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)	0.003 12		
	Hyperil BDS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)	0.003 07		
流速	0.8 mL/min	0.003 16	0.003 17	0.36
	1.0 mL/min	0.003 17		
	1.2 mL/min	0.003 19		
柱温	20 $^{\circ}\text{C}$	0.003 06	0.002 99	1.78
	25 $^{\circ}\text{C}$	0.002 97		
	30 $^{\circ}\text{C}$	0.002 93		

2.2.13 样品含量测定 取 3 批配方颗粒样品各适量, 按“2.2.3”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, 记录峰面积并按回归方程计算样品含量, 结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Results of content determination of samples ($n=3$)

批号	含量,%	平均含量,%
180401	0.003 4	0.003 4
180402	0.003 1	
180403	0.003 7	

3 讨论

现代药理学研究表明, 款冬花除具有止咳祛痰^[4-5]、平喘^[6]、抗炎^[7-10]、抗氧化^[11-13]、抗肿瘤^[14-15]、止泻^[7]等作用外, 对心血管、血流动力学及血小板活化因子亦具有一定的影响^[16]。近年来, 配方颗粒等现代中药用药形式的出现, 弥补了传统中药汤剂的服用量大、不易携带、不易保存等缺陷^[17-18]。款冬花配方颗粒保持了款冬花饮片的性味与功效, 可直接用于中医辨证施治, 具有不需煎煮、服用方便、吸收迅速、剂量准确、安全清洁、携带方便等

优点^[19];但目前尚缺乏统一的质量标准。为此,本研究采用TLC法对款冬花配方颗粒进行定性鉴别,采用HPLC法测定了款冬花配方颗粒中款冬酮的含量。

本研究采用2015年版《中国药典》(一部)^[20]方法进行TLC,但发现以石油醚-丙酮(6:1, V/V)为展开剂时极性偏大,主要斑点靠近展开前沿,因此笔者在参考2015年版《中国药典》(一部)^[20]TLC法的基础上,将石油醚-丙酮的极性调小(体积比为10:1),后发现款冬花配方颗粒中主要斑点分离度良好,斑点清晰。

在指标成分选择方面,有文献以芦丁为指标成分^[21],但芦丁既不是款冬花含量较高的成分,也不是其专属成分,考虑到款冬酮是款冬花的特征成分,且该成分具有抗炎、升压等药理作用^[22]。因此,本研究以款冬酮为款冬花配方颗粒的指标成分进行含量测定。但在研究过程中笔者发现,款冬酮在款冬花配方颗粒中含量较低。其原因可能为:一方面,款冬酮在款冬花药材中含量较低,2015年版《中国药典》(一部)中规定,款冬花药材中款冬酮含量不得少于0.070%^[20];另一方面,因款冬酮为亲脂性成分,而款冬花配方颗粒在制备时以水为提取溶剂,因此导致部分款冬酮未被提取出来,以致其在款冬花配方颗粒中含量较低。笔者认为,款冬酮作为款冬花中的特征成分,目前可作为款冬花配方颗粒含量测定的控制项;但同时因其含量较低,故有必要寻找款冬花中其他含量较高的特征成分以替代款冬酮对其进行含量控制。TLC结果显示,在款冬花药材、饮片样品及款冬花配方颗粒TLC图谱中,均出现了一个与款冬酮显相似颜色的清晰斑点(图1B中位于款冬酮上方最为清晰的斑点),该斑点是否为款冬酮的类似物,以及是否可作为款冬花配方颗粒含量测定的指标性成分仍有待后续研究进一步探讨。

综上所述,本研究方法操作简单、准确、重复性好,可用于款冬花配方颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 李静,高丽,高耀,等.基于网络药理学的款冬花止咳化痰活性成分靶点探究[J].中草药,2018,49(1):179-187.
- [2] 广东省食品药品监督管理局.广东省中药配方颗粒标准:第2册[M].广州:花城出版社,2015:223.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57-58.
- [4] 韩毅丽,武伟伟,贺润丽,等.生品款冬花不同化学成分的镇咳祛痰作用[J].时珍国医国药,2016,27(6):1347-1349.
- [5] 凌珊,易炳学,龚千锋,等.生品和蜜炙款冬花不同提取物的镇咳祛痰作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):187-190.
- [6] 吴琪珍,张朝凤,许翔鸿,等.款冬花化学成分和药理活性

研究进展[J].中国野生植物资源,2015,34(2):33-36.

- [7] 朱自平,张明发,沈雅琴,等.款冬花抗炎及其对消化系统作用的实验研究[J].中国中医药科技,1998,5(3):160-163.
- [8] 李聪,黄芳,窦昌贵,等.紫菀,款冬花配伍对抗炎作用的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(2):155-159.
- [9] WU QZ, ZHAO DX, XIANG J, et al. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara*[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(7): 1117-1124.
- [10] LEE J, KANG U, SEO EK, et al. Heme oxygenase-1-mediated anti-inflammatory effects of tussilagonone on macrophages and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.02.026.
- [11] 刘彩红,张莹,李玉琴,等.款冬花黄酮抗氧化性能测定[J].中国医院药学杂志,2010,30(19):1628-1630.
- [12] 宋道,段玺,唐志书,等.微波辅助提取款冬花多糖的工艺及抗氧化活性研究[J].中国医学创新,2016,13(23):27-30.
- [13] KIM MR, LEE JY, LEE HH, et al. Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L.[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(8): 1299-1307.
- [14] 罗强,李迎春,任鸿,等.款冬花多糖对肺腺癌A549细胞生长及凋亡的影响[J].河北北方学院学报(自然科学版),2013,29(4):63-66.
- [15] SAFONOVA EA, LOPATINA KA, RAZINA TG, et al. Modification of the myelotoxic and antitumor effects of polychemotherapy by polysaccharides from *Tussilago farfara* L.[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2018, 166(2): 197-200.
- [16] 侯阿娇,郭新月,满文静,等.款冬花的化学成分及药理作用研究进展[J].中医药信息,2019,36(1):107-112.
- [17] 严铁,姜南.浅谈中药汤剂[J].吉林医学,2005,26(9):1011-1012.
- [18] 尤建敏.在困境中谋发展:开拓中药饮片市场的思考[J].上海中医药杂志,1999(8):22-23.
- [19] 周志龙.中药配方颗粒治疗糖尿病慢性并发症举隅[J].世界中医药,2011,6(1):48-49.
- [20] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:332.
- [21] 刘可越,汤自豪,刘海军,等.款冬花配方颗粒制备工艺优化及质量控制[J].时珍国医国药,2010,21(1):162-163.
- [22] 贾岩,邢婕,雷振宏,等.款冬花药材质量评价方法的研究现状及分析[J].中草药,2017,48(21):4578-4583.

(收稿日期:2018-12-19 修回日期:2019-04-09)

(编辑:陈宏)