

清热解毒口服液质量标准研究

白 妮¹ 刘 杰² 张红梅¹ 杨振萍¹

(1 延安市中医医院,延安,716000; 2 延安市疾病预防控制中心,延安,716000)

摘要 目的:建立清热解毒口服液的质量控制方法。方法:选取薄层色谱法,鉴别连翘、黄柏、栀子、赤芍等主要药效成分;采用高效液相色谱法测定方中君药金银花的主要药效成分绿原酸的含量。结果:确立了清热解毒口服液中连翘、黄柏、栀子、赤芍的薄层色谱鉴别方法。在选定的高效液相色谱条件下,建立了清热解毒口服液中绿原酸的含量测定方法,其方法学均符合药典要求。结论:本实验建立的定性鉴别和含量测定方法简便、准确、重复性好,适用于清热解毒口服液的质量控制。

关键词 清热解毒口服液;薄层色谱法;高效液相色谱法;绿原酸;质量标准

Study on the Quality Standard of Qingre Jiedu Oral Solution

Bai Ni¹, Liu Jie², Zhang Hongmei¹, Yang Zhenping¹

(1 Yan 'an Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yan 'an 716000, China;

2 Yan 'an Disease Prevention and Control Center, Yan 'an 716000, China)

Abstract Objective: To improve the quality standard of Qingre Jiedu Oral Solution. **Methods:** TLC (Thin-Layer Chromatography) methods were used for the qualitative identification of Forsythiae Fructus, Cortex Phellodendri, Fructus Gardeniae and Radix Paeoniae Rubra, and HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method was used to determine chlorogenic acids of the main drug Flos Lonicerae. **Results:** Identification method of the TLC about Forsythiae Fructus, Cortex Phellodendri, Fructus Gardeniae and Radix Paeoniae Rubra etc in Oral Solution was established. Under the selected conditions of HPLC, an identification method for chlorogenic acids in Oral Solution was established and the methodology complies with the requirements of Chinese Pharmacopeia. **Conclusion:** The identification and quantitative determination method is simple, accurate and reproducible, which can be applied to the quality control of Qingre Jiedu Oral Solution.

Key Words Qingre Jiedu Oral Solution; Thin-Layer Chromatography; High Performance Liquid Chromatography; Chlorogenic acids; Quality standard

中图分类号:R289.5;R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.02.010

清热解毒口服液由金银花、连翘、黄连、黄芩、黄柏等 10 味中药组成,是延安市中医医院名老中医根据多年经验总结的临床经验方,具有清热解毒、滋阴泻火的功效。适用于热毒内盛所致的发热面赤,烦躁口渴,咽喉肿痛,身起疮疡疔毒,如流感、上呼吸道感染见上述证候者亦可应用。该口服液批准文号为陕药管制字[2001]第 3686 号,临床应用已有 20 余载,患者反映良好。

清热解毒口服液现行质量标准鉴别项目只有绿原酸的薄层色谱鉴别,专属性差,为完善该制剂的质量控制标准,提高患者用药安全度,让患者放心服用该口服液,我们通过薄层色谱法对方中主要药效成分进行了定性鉴别研究,最终选取了连翘、黄柏、栀子、芍药 4 种分离度较好,斑点清晰,重复性好的成分列入质量标准。此外采用高效液相色谱法测定方

中君药金银花的主要药效成分绿原酸的含量。为严格控制清热解毒口服液的质量,提升其质量标准提供了定性定量实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);超声波清洗器(上海安宁科学仪器有限公司);BP210S 型电子天平(德国 SARTORIUS 公司)。ZF-C 型三用紫外分析仪(上海康禾光电仪器有限公司);202-1 型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);HDM-1000 数显控温电热套(北京中兴伟业仪器有限公司);TG328B 分析天平(上海精科天平,精密密度 0.1 mg);XY600-2C 电子分析天平(常州市幸运电子设备有限公司);SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),FW-100D 高速万

能粉碎机(天津鑫博得仪器有限责任公司)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),超纯水。

1.3 分析样品 绿原酸对照品(批号:161021-201413,99.6%)、连翘苷对照品(批号:160821-201412,99.7%)、栀子苷对照品(批号:160911-201405,99.6%)、芍药苷对照品(批号:160715-201402,99.7%),黄柏对照药材(批号:160625-201502,99.4%)均购自中国药品生物制品检定所;清热解毒口服液(延安市中医医院制剂室,批号为20170226,20170307、20170412,规格:10 mL/瓶)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 连翘薄层鉴别 量取3批次清热解毒口服液各20 mL,用水饱和的正丁醇萃取2次,每次20 mL,合并正丁醇液,先用氨试液(取浓氨溶液20 mL,加水使成50 mL,即得。)40 mL洗涤,弃去氨试液,再用正丁醇饱和的水40 mL洗涤,分取正丁醇液,蒸干,加1 mL甲醇溶解,作为供试品溶液。称取连翘苷对照品,用甲醇制成1 mg/mL对照品溶液。取样品中缺连翘的口服液,按制备供试品溶液方法制得阴性样品溶液。吸取供试品溶液、对照品溶液各15 μ L、5 μ L,点于同一硅胶薄层板上,以氯仿-甲醇(5:1)溶液系统为展开剂,展开,晾干,喷以10%硫酸乙醇液,加热(105 $^{\circ}$ C)至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的紫红色斑点。而阴性样品无此斑点^[14]。见图1。

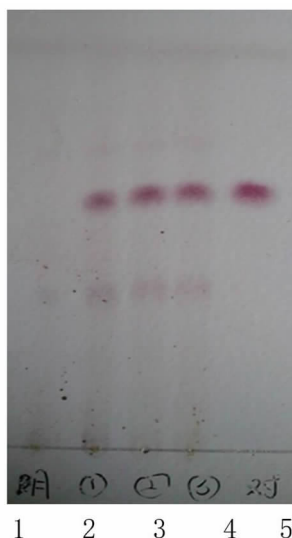


图1 连翘苷 TLC 图

注:1:阴性样品;2~4:供试品;5:连翘苷对照品

2.1.2 赤芍薄层鉴别 量取3批次清热解毒口服液各20 mL,用水饱和的正丁醇40 mL分2次提取,

合并正丁醇液,蒸干,用乙醇1 mL溶解,作为供试品溶液。称取芍药苷对照品,用乙醇制成2 mg/mL对照品溶液。取样品中缺赤芍的口服液,按制备供试品方法制得阴性样品溶液。吸取供试品、对照品溶液各15 μ L、5 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40.5:10:0.2)溶液系统为展开剂,展开,晾干,且喷以5%香草醛硫酸溶液,加热(105 $^{\circ}$ C)至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的蓝紫色斑点。而阴性样品无此斑点^[14]。见图2。

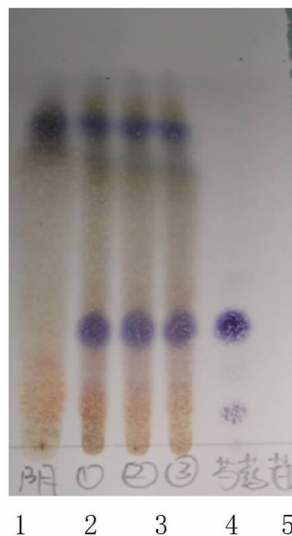


图2 芍药苷 TLC 图

注:1:阴性样品;2~4:供试品;5:芍药苷对照品

2.1.3 栀子薄层鉴别 量取3批次清热解毒口服液各20 mL,加乙酸乙酯30 mL,分两次提取,合并乙酸乙酯液,蒸干用乙醇1 mL溶解,作为供试品溶液。称取栀子苷对照品,加乙醇制成2 mg/mL对照品溶液。取样品中缺栀子的口服液,按制备供试品溶液方法制得阴性样品溶液。吸取供试品溶液、对照品溶液各15 μ L、5 μ L,点于同一硅胶薄层板上,以醋酸乙酯-丙酮-甲酸-水(5:5:1:1)溶液系统为展开剂,展开,取出,晾干,以10%硫酸乙醇液为显色剂,加热(105 $^{\circ}$ C)至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同土红色的斑点,而阴性样品无此斑点。见图3。

2.1.4 黄柏薄层鉴别 量取3批次清热解毒口服液各20 mL,蒸至10 mL,用浓氨调pH值至10,用相同体积的氯仿萃取2次,合并氯仿液,蒸干,加甲醇1 mL溶解,作为供试品溶液。称取黄柏对照药材0.1 g,加1%醋酸甲醇20 mL,超声波处理20 min,滤过,滤液蒸至2 mL,作为对照药材溶液。取样品中缺黄柏的口服液,按制备供试品溶液方法制得阴性样品

溶液。分别吸取供试品溶液、对照药材溶液 20 μL 、10 μL ，点于同一硅胶薄层板上，以正丁醇-冰醋酸-水(7:2:5)溶液系统为展开剂，展开，以稀碘化铋钾为显色剂，加热(105 $^{\circ}\text{C}$)至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照品色谱图相应的位置上，显相同颜色的亮黄色斑点，而阴性样品无此斑点。见图 4。



图3 槲子苷 TLC 图

注:1:阴性样品;2~4:供试品;5:槲子苷对照品



图4 黄柏 TLC 图

注:1:阴性样品;2~4:供试品;5:槲子苷对照品

2.2 绿原酸含量测定

2.2.1 色谱条件 岛津 Shim-pack VP-ODS C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(25:75:1), 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 328 nm; 在上述色谱条件下, 待测组分达到了基线分离。理论板数以绿原酸计 ≥ 6000 , 分离度 > 1.5 , 进样量 20 μL [5-10]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品(5 mg)置于 50 mL 容量瓶中, 用 50% 甲醇溶解, 定容至 50 mL, 摇匀, 备用(每 1 mL 中含绿原酸 100 μg)。

2.2.3 供试品溶液的制备 量取清热解毒口服液 4.0 mL 置 50 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇稀释到刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2.4 专属性试验 精密称取除金银花以外的其他药材, 按照口服液制备工艺, 制成口服液, 再按制备供试品的方法制成阴性对照样品。取供试品、对照品溶液溶液, 阴性样品各 20 μL , 注入高效液相色谱测定仪, 记录色谱图, 结果显示, 阴性样品对测定无干扰。见图 5。

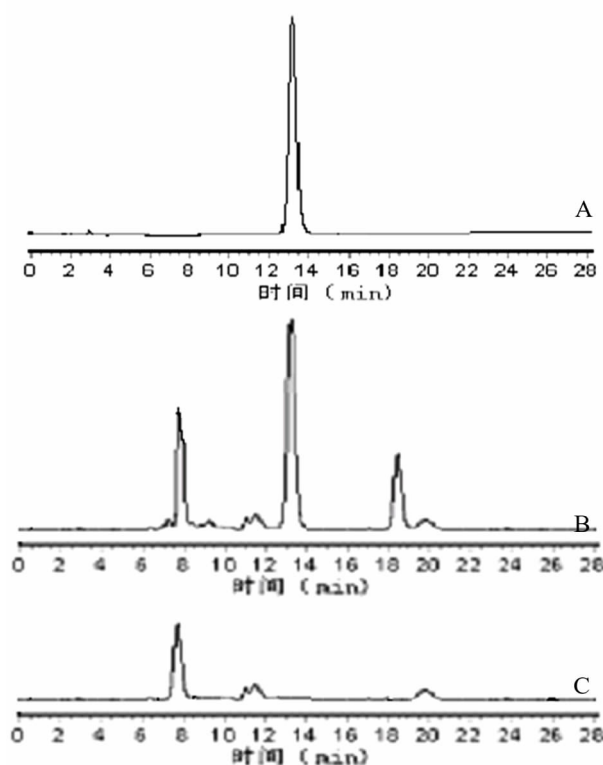


图5 清热解毒口服液中绿原酸高效液相色谱图

注:A:绿原酸对照品;B:供试品;C:阴性样品对照

2.2.5 线性关系考察 精密量取对照品溶液, 加 50% 甲醇制成绿原酸浓度分别为 4.0、8.0、12.0、16.0、24.0、32.0、48.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液, 按上述色谱条件, 进样 20 μL , 记录峰面积。进行回归分析, 得绿原酸线性方程为: $Y = 2.442X + 189.14$ ($r = 0.9996$), 表明绿原酸的在 4.0 ~ 48.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 中间精密度试验 精密吸取绿原酸对照品溶液, 连续进样 6 次, 绿原酸峰面积 RSD 为 0.64%。结果表明, 所选仪器精密度优良。

2.2.7 供试品溶液稳定性试验 精密吸取一份供试品溶液,分别在0,2,4,6,8,10,12,24 h 进样,以绿原酸的峰面积为参考值,结果绿原酸峰面积 *RSD* 为0.36%,结果表明供试品溶液在24 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批号清热解毒口服液(批号:20170226),按供试品溶液前处理方法制备6份供试品溶液,各进样20 μL 测得绿原酸的平均含量(*n* = 6)为212.6 μg/ mL;*RSD* 分别为1.16%,表明该方法重复性良好。

2.2.9 回收率试验 精密量取已知含量的供试品溶液1 mL,共6份,置10 容量瓶中,分别精密加入对照品溶液1 mL,加50% 甲醇稀释并定容,依法测定。见表1。

表1 绿原酸加样回收试验结果(<i>n</i> = 6)					
样品量 (mg)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	回收率 (%)	平均 (%)	<i>RSD</i> (%)
0.212 1	0.3	0.513 5	100.5	99.8	0.34
0.212 8	0.3	0.511 4	99.5		
0.212 9	0.3	0.511 9	99.7		
0.213 2	0.3	0.512 3	99.7		
0.213 1	0.3	0.512 5	99.8		
0.212 9	0.3	0.511 8	99.6		

2.2.10 样品测定结果 取不同批号的清热解毒口服液3个批次,按“2.2.3”项下方法分别制成供试品溶液,精密吸取对照品溶液、供试品溶液注入高效液相色谱仪,按2.2.1项下色谱条件进行测定,使用外标法计算样品中绿原酸的含量分别为211.7、212.8、211.2 μg/mL。

3 讨论

3.1 薄层鉴别条件筛选 梔子、赤芍的薄层鉴别方法主要参照《中华人民共和国药典》(2010 版)(以下简称《药典》)中梔子、赤芍项下方法,各斑点显示清晰,重现性好,操作简便。连翘薄层鉴别采用药典方法时,连翘苷斑点 *Rf* 值较小,拖尾严重,经参考相关文献^[11-13],调整展开剂比例,以氯仿-甲醇(5:1)为展开剂,其展开系统样品的相容性、分离效果均较好,*Rf* 适中,薄层板对应部位连翘苷斑点清晰,呈紫红色,阴性无干扰,该鉴别条件简单易行,重现性好。黄柏薄层鉴别采用药典方法时,斑点显示不清晰,工艺复杂,经参考相关文献^[14-17],采取正丁醇-冰醋酸-水(7:2:5)溶系统液为展开剂,展开,以稀碘化铋钾为显色剂,加热(105 ℃)至斑点显色清晰。该方法,样品分离效果均较好,斑点清晰,*Rf* 值适中。方中其他几味中药经《药典》及其他文献方法,鉴别

结果欠佳,背景通道干扰明显,斑点分离清晰,后续将进一步研究其他几味中药薄层色谱方法,为清热解毒口服液的质量控制提供更好的依据。

3.2 绿原酸含量测定研究 绿原酸含量测定时,首先选用《药典》中绿原酸高效液相色谱法进行测定,即流动相:乙腈-0.4% 磷酸溶液(13:87)为流动相;检测波长为327 nm,流速为1 mL/min,进样量10 μL,结果由于清热解毒口服液复方制剂成分复杂,高效液相色谱图各组分相互影响,色谱峰分离不清晰,干扰较多,为减少其他色谱峰的干扰,研究发现,调整流动相为:甲醇-水-冰醋酸(25:75:1)。另外从清热解毒口服液的紫外扫描图分析,得出绿原酸的最大吸收波长为328 nm。进样量20 μL,其他色谱条件不变,所得的绿原酸色谱峰,分离度优良,峰型对称,系统适应性好,重复性好,阴性样品对照无干扰^[18-27]。由于实验条件限制,本研究暂测定主要药效成分绿原酸的含量,后续将逐步进行其他药效成分的定性、定量研究,为完善该制剂的质量控制标准,提高患者用药安全性提供科学依据。

中医认为热毒内盛多因外感风热之邪或内有湿火而又外感风热之邪,两相搏结,郁而化火。证见高热口渴,烦躁,咽喉肿痛,或见疮疡肿毒。清热解毒口服液中金银花苦寒,归肺、心、胃经,其气味芳香,即善清血分之热,又可疏散肺经风热。连翘苦、微寒,归肺、心、小肠经,清心而祛上焦诸热,散结消肿而治痰。二药合用,清热解毒,疏散风热、散结消肿为君药。黄连、黄芩、黄柏清热燥湿,泻火解毒;诸药合用共奏清热解毒,消肿散结之功,与病机相符。本研究对清热解毒口服液中连翘、赤芍、梔子、黄柏4味中药进行了定性鉴别,所选方法简单易行,斑点清晰,分离度好;成分定量测定分析时间短,准确度高,重复性好。对方中君药金银花中的主要有效成分绿原酸进行了含量测定,其方法学均符合《药典》要求,所建立方法较现行清热解毒口服液标准有较大提高,可初步用于清热解毒口服液的质量标准控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:50.
[2] 孙丹丹,闫雪生,李岩. 菊葛天麻颗粒质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):86-88.
[3] 王艺纯,唐秋竹. 通窍耳聋丸的质量标准研究[J]. 中国当代医药,2017,24(3):115-119.
[4] 吴桐,张巧丽,姚树坤. 清肝化痰方质量标准研究[J]. 世界中医药,2017,12(10):2457-2461.
[5] 高洁. 金银花复方制剂的质量控制方法研究[D]. 石家庄:河北医

- 科大学,2009;63.
- [6] 闫辉,高欢,崔清华,等. HPLC 同时测定桑白皮中 4 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):53-56.
- [7] 孙莲,孟磊,勉强辉,等. HPLC 同时测定新疆药桑枝中 6 种成分的含量[J]. 中国现代应用药学,2013,30(6):660-663.
- [8] 郝乘仪,昌盛. 高效液相色谱法同时测定牛黄清宫丸中 5 种成分的含量[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(1):80-83.
- [9] 刘中均,朱力阳,冯光富,等. HPLC 测定紫蒲痛风合剂中的绿原酸[J]. 华西药学期刊,2016,31(6):638-639.
- [10] 李沁,杨臣,游勇基. HPLC-DAD 法同时测定小儿退热合剂中绿原酸、栀子苷、黄芩苷和丹皮酚的含量[J]. 药物分析杂志,2017,37(1):153-160.
- [11] 白翠兰,李昭日格图,萨仁格日乐,等. 消食十味丸的质量标准[J]. 中成药,2015,37(9):1951-1955.
- [12] 陶春,薛丹平,黄爱文,等. 蓝翘解毒口服液的质量标准的提高[J]. 中国药师,2016,19(9):1763-1765,1766.
- [13] 杨堃. 小儿感冒颗粒的质量标准研究[J]. 世界中医药,2015,10(3):427-430.
- [14] 赵伟峰,车晓平,钱珊,等. 薄层色谱法鉴定芙蓉散中的主要成分[J]. 世界中医药,2014,9(6):792-795.
- [15] 王志萍,黎芳,陈勇,等. 壮药妇雅净颗粒质量标准研究[J]. 中成药,2013,35(11):2422-2426.
- [16] 司席席,孙洪胜. 复方金苓片的质量标准研究[J]. 中国药房,2016,27(3):415-417.
- [17] 吴琼,马宏达,胡北,等. 水调散质量标准研究[J]. 中国药师,2016,19(1):175-177.
- [18] 骆霞,张晓燕,魏娟,等. 双波长 HPLC 法同时测定复方肤清洗剂中 3 种指标性成分含量[J]. 中国药师,2018,21(1):151-153.
- [19] 左霞,刘春霞,杨金霞,等. HPLC 法测定不同来源不同采收期忍冬藤和金银花中绿原酸含量[J]. 中国药师,2015,18(4):682-684.
- [20] 陈叶青. RP-HPLC 法测定盆炎净胶囊中绿原酸的含量[J]. 中国药师,2010,13(8):1205-1206.
- [21] 王敏,贺蕊,龚慕辛,等. HPLC 法测定银黄片中黄芩苷和绿原酸的溶出度[J]. 世界中医药,2017,12(2):408-410,413.
- [22] 陈述,席桂同. 高效液相色谱法测定银花感冒冲剂中绿原酸含量[J]. 世界中医药,2015,10(1):97-99.
- [23] 崔小兵,李伟,文红梅,等. UPLC 法测定白术不同炮制品中 5-羟甲基糠醛及糠醛的含量[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(5):477-478.
- [24] 冯波,朱鹤云,关皎,等. HPLC 同时测定龙胆中 4 种活性成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):82-85.
- [25] 刘瑞新. HPLC 同时测定龙胆泻肝丸中龙胆苦苷和栀子苷的含量[J]. 中成药,2007,29(8):1170-1172.
- [26] 李海兵,张霞,周永妍,等. 龙胆配方颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房,2016,27(15):2097-2098,2099.
- [27] 杨荣兵,莫胜丹,吴蔓. 柴葛洗剂的制备工艺及临床应用研究[J]. 河北医学,2012,18(6):782-784.

(2018-02-06 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 300 页)

研究的目的是分析不同净制工艺对三七质量的影响,从而优化三七净制工艺。在实验中,参考各种指标,对不同的净制方法进行数据化、客观化的质量评价,实现对净制工艺的质量控制,为三七加工技术的进一步研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2015:37.
- [2] Yun TK. Brief introduction of Panax ginseng C. A. Meyer[J]. J Korean Med Sci,2001,16 Suppl:S3-5.
- [3] 胡金林,刘尚领,潘伟英. 中药净制的探讨[J]. 时珍国药研究,1996,7(2):102-103.
- [4] 卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京:人民卫生出版社,1988:73-74.
- [5] 杨俊杰,李平,郝敏,等. 中药材产地加工与炮制一体化的现代研究进展[J]. 中草药,2018,49(20):4726-4730.
- [6] 刘大会,徐娜,郭兰萍,等. 三七药材质量特征和商品规格等级标准研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(5):776-785.
- [7] 黎江华,李涛,黄永亮,等. 三七“生消熟补”的炮制机制研究现状和思考[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2016,42(6):654-659.
- [8] 孙小玲. 三七的研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2005,26(6):44-46.
- [9] 夏鹏国,张顺仓,梁宗锁,等. 三七化学成分的研究历程和概况[J]. 中草药,2014,45(17):2564-2570.
- [10] 江水泉,张海东,刘木华. 真空冷冻干燥技术在三七加工中的应用[J]. 粮食与食品工业,2003,1(1):36-38.
- [11] 沙孟晨,周永峰,张海珠,等. 三七不同部位化学成分的差异性研究[J]. 中国现代中药,2018,20(7):832-836.
- [12] 李春英. 三七传统药用部位化学成分及质量控制方法分析[J]. 四川中医,2018,36(3):75-78.
- [13] Behl T, Kotwani A. Chinese herbal drugs for the treatment of diabetic retinopathy[J]. J Pharm Pharmacol,2017,69(3):223-235.
- [14] Yoshikawa M, Morikawa T, Kashima Y, et al. Structures of new dammarane-type Triterpene Saponins from the flower buds of Panax notoginseng and hepatoprotective effects of principal Ginseng Saponins[J]. J Nat Prod,2003,66(7):922-927.
- [15] Sun H, Yang Z, Ye Y. Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of Panax notoginseng[J]. Int Immunopharmacol,2006,6(1):14-25.

(2018-05-23 收稿 责任编辑:杨觉雄)