

感冒伤风咳茶的质量标准提高研究

林清^{1*},符小英²,林志绣^{1#}(1.广东医学院附属医院药学部,广东湛江 524001;2.广东恒诚制药有限公司,广东湛江 524022)

中图分类号 R283.627;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1705-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.40

摘要 目的:提高感冒伤风咳茶的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中防风、甘草进行鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中厚朴酚、和厚朴酚的含量;色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈,流动相为甲醇-水(77:23,V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为294 nm,柱温为室温,进样量为5 μl。结果:防风、甘草的TLC图斑点清晰,分离度好。厚朴酚、和厚朴酚检测质量浓度线性范围分别为3.13~100.2、3.05~97.6 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为98.2%~99.5%(RSD=0.5%, $n=6$)、98.6%~99.6%(RSD=0.4%, $n=6$)。结论:经提高的标准可用于感冒伤风咳茶的质量控制。

关键词 感冒伤风咳茶;薄层色谱法;厚朴酚;和厚朴酚;高效液相色谱法;含量测定

Study on the Quality Standard of Ganmao Shangfengke Tea

LIN Qing¹,FU Xiaoying²,LIN Zhixiu¹(1.Dept. of Pharmacy, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524001, China; 2.Guangdong Hengcheng Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Zhanjiang 524022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard for Ganmao shangfengke tea. METHODS: TLC was used to identify the *Saposhnikovia divaricata* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in the preparation. HPLC was used to determine the content of magnolol and honokiol: the column was Phenomenex Luna C₁₈ with mobile phase of methanol-water (77:23, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 294 nm, column temperature was room temperature, and the injection volume 5 μl. RESULTS: The TLC spots of *S. divaricata* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* were clear and well separated. The linear range was 3.13-100.2 μg ($r=0.999\ 9$) for magnolol and 3.05-97.6 μg ($r=0.999\ 9$) for honokiol; RSDs of precision, stability and accuracy tests were lower than 2%; recoveries were 98.2%-99.5% (RSD=0.5%, $n=6$) and 98.6%-99.6% (RSD=0.4%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The improved standard can be used for the quality control of Ganmao shangfengke tea.

KEYWORDS Ganmao shangfengke tea; TLC; Honokiol; Magnolol; HPLC; Content determination

感冒伤风咳茶由桔梗、浙贝母、荆芥、枇杷叶、厚朴、天花粉、桑叶、紫苏叶、薄荷、防风、前胡、甘草等药材组成,收载于原卫生部药品标准《中药成方制剂:第十四册》^[1],具有祛风、解表、止咳的功效,临床多用于治疗伤风咳嗽、发热头痛、流涕鼻塞、喷嚏喉痒。其中厚朴是木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et wils.或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd. et wils. var. *biloba* Rehd. et wils.的干燥杆皮、根皮和枝皮,具有明显的抗菌、抗炎、抗过敏、钙拮抗和抗过氧化等作用^[2]。感冒伤风咳茶原质量标准简单,只有厚朴一项薄层色谱(TLC)鉴别,缺乏含量测定项目,造成其质量难以控制。为此,笔者在原质量标准的基础上采用TLC法定性鉴别该制剂中防风、甘草,采用高效液相色谱(HPLC)法测定其中厚朴酚、和厚朴酚的含量,以有效控制其质量。

1 材料

1.1 仪器

LC-10A型HPLC仪,包括SPD-10A型紫外检测器(日本Shimadzu公司);HN1006型超声清洗机(中国华南超声设备厂);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司)。

* 副主任药师。研究方向:药物分析。电话:0759-2387681。E-mail:zhanjiangwh@126.com

通信作者:副主任药师。研究方向:药物分析。电话:0759-2387626。E-mail:Linzhixiuyy@sina.com

1.2 药品与试剂

感冒伤风咳茶(广东恒诚制药有限公司,批号:14071001、14071002、14071003,规格:15 g/盒);厚朴酚对照品(批号:110729-200412,纯度>98%)、和厚朴酚对照品(批号:110730-201112,纯度>98%)、升麻素苷对照品(批号:111522-201008,纯度>98%)、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号:111523-201206,纯度>98%)、防风对照药材(批号:120947-201108)、甘草对照药材(批号:120904-201318)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 防风 取样品10 g,超声(功率:250 W,频率:33 kHz,下同)处理20 min,加乙醇100 ml,加热回流30 min,滤过,滤液置水浴中浓缩至约10 ml,过中性氧化铝柱(100~200目,5 g,内径1.5 cm),用20 ml乙醇洗脱,合并乙醇液,蒸干,残渣加甲醇2 ml使溶解,静置,取上清液,作为供试品溶液。另取升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品各适量,加甲醇制成每1 ml分别含升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷各1 mg的混合对照品溶液。再取防风对照药材1 g,按供试品溶液制备方法制得对照药材溶液。最后,按感冒伤风咳茶处方和制备工艺制备缺防风的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照

溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(一部)]^[9]试验,吸取上述4种溶液各4 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,置于紫外光灯(254 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,详见图1。

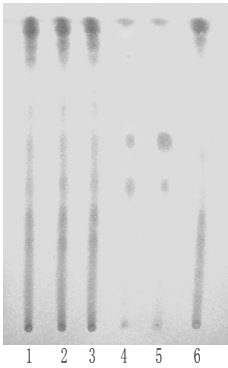


图1 防风的薄层色谱图

1~3.供试品;4.对照药材;5.混合对照品;6.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Saposhnikovia divaricata*

1-3.test samples;4.control medicinal;5.mixed reference substance;6.negative control

2.1.2 甘草 以“2.1.1”项下供试品溶液作为本项试验供试品溶液。另取甘草对照药材0.5 g,超声处理20 min,加乙醇50 ml,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。再按感冒伤风咳嗽茶处方和制备工艺制备缺甘草的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(一部)]^[9]试验,吸取上述3种溶液各4 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷-三氯甲烷-甲醇(2:7:1, V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃下加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,详见图2。

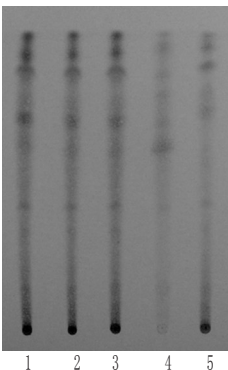


图2 甘草的薄层色谱图

1~3.供试品;4.对照药材;5.阴性对照

Fig 2 TLC chromatograms of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

1-3.test samples;4.control medicinal;5.negative control

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(77:23, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:294 nm;柱温:室温;进样量:5 μl。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取厚朴酚对照品0.010 02 g、和厚朴酚对照品0.009 88 g,置于同一100 ml量瓶

中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得单一对照品贮备液。分别取上述单一对照品贮备液5 ml,置于25 ml量瓶中,加甲醇定容,制成每1 ml分别含厚朴酚20.04 μg、和厚朴酚19.76 μg的单一对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末3 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入甲醇50 ml,超声处理40 min,放冷,滤过,用适量甲醇洗涤滤渣和滤纸,洗涤液并入滤液中,置于100 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按感冒伤风咳嗽茶处方和制备工艺制备缺厚朴的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性试验 精密吸取“2.2.2”“2.2.3”“2.2.4”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各5 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图3。由图3可见,厚朴酚、和厚朴酚峰与相邻峰分离良好($r > 1.5$),理论板数以厚朴酚峰计不低于4 000,且阴性对照对测定无干扰。

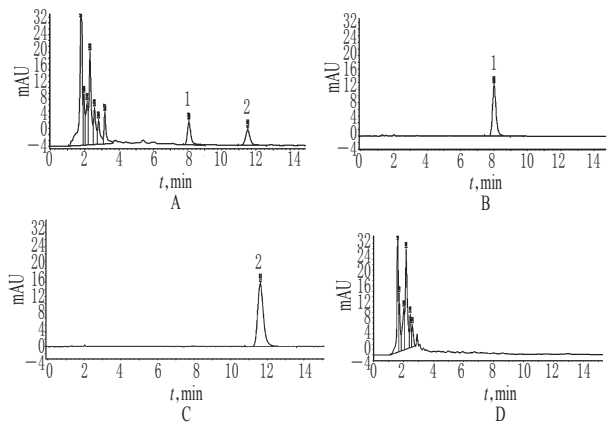


图3 高效液相色谱图

A.供试品;B.和厚朴酚对照品;C.厚朴酚对照品;D.阴性对照;1.和厚朴酚;2.厚朴酚

Fig 3 HPLC chromatograms

A.test sample;B.honokiol reference substance;C.magnolol reference substance;D.negative control

2.2.6 线性关系考察 精密称取厚朴酚对照品适量,加甲醇分别制成每1 ml含厚朴酚3.13、6.26、12.52、25.05、50.10、100.20 μg的系列对照品溶液;精密称取和厚朴酚对照品适量,加甲醇分别制成每1 ml含和厚朴酚3.05、6.10、12.20、24.40、48.80、97.60 μg的系列对照品溶液。分别精密量取上述系列对照品溶液各5 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以厚朴酚、和厚朴酚质量浓度(x , μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y = 8.31 \times 10^{-5}x - 3.26 \times 10^{-2}$ ($r = 0.999 9$)、 $y = 7.99 \times 10^{-5}x - 3.47 \times 10^{-2}$ ($r = 0.999 9$)。结果表明,厚朴酚、和厚朴酚检测质量浓度线性范围分别为3.13~100.2、3.05~97.6 μg/ml。

2.2.7 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,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,厚朴酚、和厚朴酚峰面积和的RSD=1.1% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:14071001)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时进样测定,记录峰面积。结果,厚朴酚、和厚朴酚峰面积和的RSD=0.9% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:14071001)适量,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并计算含量。结果,厚朴酚和厚朴酚总含量为1.36 mg/g, RSD=1.0% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:14071001)适量,共6份,分别加入一定质量的厚朴酚和厚朴酚对照品,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 test(n=6)

待测成分	取样量, g	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, %
厚朴酚	1.492 3	0.731 2	0.801 6	1.521 1	98.5	98.6	0.5
	1.503 2	0.736 6	0.801 6	1.528 2	98.8		
	1.497 4	0.733 7	0.801 6	1.522 4	98.4		
	1.504 4	0.737 2	0.801 6	1.524 3	98.2		
	1.502 1	0.736 0	0.801 6	1.533 9	99.5		
	1.498 3	0.734 2	0.801 6	1.522 5	98.3		
和厚朴酚	1.492 3	1.089 4	1.073 6	2.148 3	98.6	99.0	0.4
	1.503 2	1.097 3	1.073 6	2.162 7	99.2		
	1.497 4	1.093 1	1.073 6	2.152 4	98.7		
	1.504 4	1.098 2	1.073 6	2.159 8	98.9		
	1.502 1	1.096 5	1.073 6	2.161 7	99.2		
	1.498 3	1.093 8	1.073 6	2.162 6	99.6		

2.2.11 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“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并计算含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=2)

Tab 2 Results of content determination of sample(n=2)

批号	取样量, g	厚朴酚、和厚朴酚总含量, mg/g	平均值, mg/g
14071001	3.123 80	1.32	1.35
	3.145 01	1.38	
14071002	2.960 68	1.23	1.22
	3.132 59	1.2	
14071003	3.049 34	1.31	1.32
	2.910 41	1.32	

3 讨论

TLC法鉴别感冒伤风咳茶中甘草时供试品溶液制备选用了上中性氧化铝柱(100~200目),主要因甘草化学成分中含有黄酮类结构,黄酮类化合物大多数具有酚羟基,可被中性氧化铝吸附,而与不含酚羟基的成分分离^[4],如果不采用上柱吸附处理,除去杂质斑点,点样后就会出现斑点过多现象,不利于分离甘草的有效成分。

在考虑甘草展开剂时,笔者参考文献[5-7],分别选用三氯甲烷-甲醇-水(40:10:1, V/V/V)、乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2, V/V/V/V)、环己烷-乙酸乙酯-甲酸(13:7:2, V/V/V)和正己烷-三氯甲烷-甲醇(2:7:1, V/V/V)进行试验。结果,前3种展开斑点不理想,只有正己烷-三氯甲烷-甲醇(2:7:1, V/V/V)的斑点清晰,无阴性干扰,可用于甘草有效成分鉴别。

在流动相的条件考察时,笔者参考文献[8-12],先后采用乙腈-水-冰醋酸(60:38:2, V/V/V)、甲醇(0.05 mol/L)-醋酸铵-冰醋酸(65:35:0.5, V/V/V)、甲醇-异丙醇-0.1%磷酸(36:21:40, V/V/V)、乙腈-0.1%磷酸(57:43, V/V)、甲醇-水(75:25, V/V)进行试验。结果表明,以上流动相对厚朴酚、和厚朴酚及其他色谱峰未达到基线分离,后改用甲醇-水(77:23, V/V)为流动相,所得厚朴酚、和厚朴酚峰形较好,且分离度良好。

在进行提取方法和时间的考察时,笔者比较了超声提取20、30、40、50 min与回流提取,结果样品中厚朴酚、和厚朴酚成分使用超声提取40 min时含量较高。另外,经考察甲醇、50%甲醇、70%甲醇、乙醇、50%乙醇、70%乙醇^[12]共6种不同的溶剂超声提取,结果甲醇提取较完全。

综上所述,经提高的标准可用于感冒伤风咳茶的质量控制。

参考文献

- [1] 卫生部.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂:第十四册[S]. 2009.
- [2] 蔡海敏, 范伟, 王旭东. 木兰属植物化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(39): 3 735.
- [3] 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: 86, 149.
- [4] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 271, 280.
- [5] 李湘平, 袁槎樑, 李汶. 薄层色谱鉴别胃可舒片中的陈皮、甘草、木香[J]. 中国医药指南, 2014, 12(10): 52.
- [6] 王京军, 任可. 解表祛风止痒颗粒治疗尿毒症患者皮肤瘙痒[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(9): 691.
- [7] 李智勇, 孙冬梅, 王洛临. 痒宁颗粒质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 100.
- [8] 马艳. 高效液相色谱法测定温肺止咳胶囊中甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚及厚朴酚的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(12): 1 063.
- [9] 姜雪敏, 王云龙, 杨立志, 等. 高效液相色谱法测定调胃丹中厚朴酚与和厚朴酚的含量[J]. 中国药业, 2011, 20(24): 37.
- [10] 田琳, 莫兰芳, 冯文周. 高效液相色谱法测定霍香正气片中厚朴酚与和厚朴酚的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(15): 1 337.
- [11] 林秋晓, 刘晓琼, 刘晓琦, 等. 厚术胶囊质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(23): 2 184.
- [12] 周军, 江永萍, 杨林娜, 等. HPLC法测定济坤丸中丹皮酚、和厚朴酚及厚朴酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1 153.

(收稿日期:2015-09-09 修回日期:2015-11-08)

(编辑:张 静)