

呼吸通口服液的质量标准提高研究[△]

景霞*,许静#,湛雯,孙芳(南京医科大学附属南京儿童医院,南京 210008)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5137-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.31

摘要 目的:提高呼吸通口服液的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中百部、黄芩、牛蒡子进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中黄芩苷的含量;色谱柱为Agilent Eclipse Plus-C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(48:52,V/V),流速为0.8 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μl。结果:百部、黄芩、牛蒡子的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。黄芩苷检测进样量线性范围为0.378 0~3.779 5 μg($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为96.52%~104.95%(RSD=1.28%, $n=9$)。结论:提高的标准能更加有效地控制呼吸通口服液的质量。

关键词 呼吸通口服液;质量标准;百部;黄芩;牛蒡子;薄层色谱法;黄芩苷;高效液相色谱法

Study on the Quality Standard of Huxitong Oral Solution

JING Xia, XU Jing, ZHAN Wen, SUN Fang (Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Huxitong oral solution. METHODS: TLC was conducted for the qualitative identification of *Stemona japonica*, *Scutellaria baicalensis* and *Fructus arctii*; HPLC was adopted for the content determination of baicalin: the column was Agilent Eclipse Plus-C₁₈ with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (48:52, V/V) at a flow rate of 0.8 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, column temperature was 25 ℃, injection volume was 20 μl. RESULTS: TLC spots of *S. japonica*, *S. baicalensis* and *F. arctii* were clear and well separated, with no interference in negative control. The linear range of baicalin was 0.378 0-3.779 5 μg ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 96.52%-104.95% (RSD=1.28%, $n=9$). CONCLUSIONS: The improved standard can more effectively control the quality of Huxitong oral solution.

KEYWORDS Huxitong oral solution; Quality standard; *Stemona japonica*; *Scutellaria baicalensis*; *Fructus arctii*; TLC; Baicalin; HPLC

呼吸通口服液(批准文号:苏药制字Z04001263)由百部、黄芩、牛蒡子、天花粉、芫花、桔梗6味药材共制而成。方中黄芩具有清热燥湿、泻火解毒之功效;百部具有润肺下气、止咳之功效;牛蒡子可疏散风热、宣肺利咽^[1-2]。诸药共奏清热解毒、止咳化痰之功,临床广泛用于上呼吸道感染、支气管炎、低热、咳嗽等症的治疗。原呼吸通口服液质量标准(BJ-ZJ5-06)通过盐酸镁粉反应和碘化铋钾反应对其中的黄酮类和生物碱类成分进行化学鉴别,不符合现代中药制剂质量控制的要求。近年有对其中成分进行高效液相色谱(HPLC)检测的报道^[3-5],但对其主要药味的薄层色谱(TLC)鉴别未见报道。由此可见,本制剂质量标准亟待提高与完善。本研究中,笔者通过对呼吸通口服液的主要药味进行TLC鉴别,并对其中君药黄芩有效成分黄芩苷进行含量测定,旨在更加有效地控制其质量。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括二元泵、二极管阵列检测器(美国Agilent公司);MS205DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KH3200V型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:40 W,频率:150 kHz);TH-II型数控薄层显色加热器(上海科哲生化科技有限公司);ZF-20C型暗箱式紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂)。

1.2 药品与试剂

呼吸通口服液(本院自制,批号:140326-1、140326-2、140326-3、140423-3、140425-3、141013-1、141013-2、141013-3,规格:10 ml/支;本院委托江苏康缘药业股份有限公司生产,批号:141201,规格:10 ml/支);黄芩苷对照品(批号:110715-201117,纯度:91.7%)、对叶百部对照药材(批号:121221-201003)、直立百部对照药材(批号:121588-201101)、黄芩对照药材(批号:120955-201309)、牛蒡子对照药材(批号:120903-201109)均购于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,

[9] 赵琼,孙仁弟,杨瑞花,等.不同产地丹参药材对丹参多酚

△基金项目:南京医科大学科技发展基金项目(No.2012NJMU068)

*主管药师。研究方向:医院制剂检验与质量标准。E-mail:jing_xiaxia@163.com

#通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:025-83117221

酸盐质量的影响[J].上海医药,2014,35(9):53.

[10] 黄铁英,石苏英,周黎琴.注射用丹参多酚酸盐的稳定性再评价[J].中国生化药物杂志,2016,36(3):157.

(收稿日期:2016-01-15 修回日期:2016-08-19)

(编辑:刘柳)

水为纯化水。

1.3 饮片

蜜百部饮片(批号:15031401)、炒黄芩饮片(批号:15032201)、炒牛蒡子饮片(批号:14121001)、天花粉饮片(批号:14122401)、制芫花饮片(批号:14120101)、桔梗饮片(批号:14122001)均购于安徽协和成药业饮片有限公司。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 百部的薄层鉴别 取本品20 ml,加浓氨溶液1 ml,再加乙醚20 ml振摇提取,乙醚液蒸干,残渣加甲醇2 ml使溶解,作为供试品溶液。另分别取直立百部和对叶百部对照药材各0.5 g,加甲醇10 ml,超声处理30 min,滤过,滤液作为对照药材溶液。再按呼吸通口服液处方和制备工艺制备缺百部的阴性样品,并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》(四部)]^[2]试验,吸取上述4种溶液5~10 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-甲醇-浓氨溶液(10:5:4:0.5, V/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,喷以稀碘化铋钾溶液显色,再喷以5%亚硝酸钠溶液(溶剂为70%乙醇)去底色,置可见光下检视。结果,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,阴性对照无干扰,详见图1。

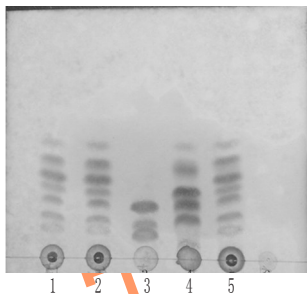


图1 百部的薄层色谱图

1, 2, 5.供试品;3.直立百部对照药材;4.对叶百部对照药材;6.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *S. Japonica*

1, 2, 5.test samples;3.reference substance of *Stemona sessilifolia*;4.reference substance of *Radix stemona*; 6.negative control

2.1.2 黄芩的薄层鉴别 取本品1 ml,加75%乙醇5 ml,摇匀,作为供试品溶液。另取黄芩对照药材0.5 g,加75%乙醇20 ml,超声处理30 min,滤过,滤液作为对照药材溶液。再按呼吸通口服液处方和制备工艺制备缺黄芩的阴性样品,并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》(四部)]^[2]试验,吸取上述3种溶液3~5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以36%乙酸为展开剂,展开,取出,晾干,喷以1%三氯化铁乙醇溶液显色,置可见光下检视。结果,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,阴性对照无干扰,详见图2。

2.1.3 牛蒡子的薄层鉴别 取“2.1.2”项下供试品溶液作为本项试验供试品溶液。另取牛蒡子对照药材,加75%乙醇20 ml,超声处理30 min,滤过,滤液作为对照药材溶液。再按呼吸通口服液处方和制备工艺制备缺牛蒡子的阴性样品,并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》(四部)]^[2]试验,吸取上述3种溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(40:8:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置可见光下检视。结果,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,阴

性对照无干扰,详见图3。

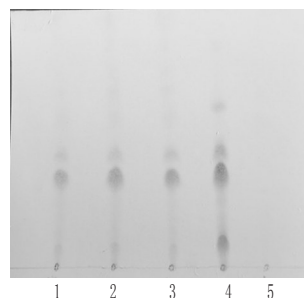


图2 黄芩的薄层色谱图

1~3.供试品;4.黄芩对照药材;5.阴性对照品

Fig 2 TLC chromatograms of *S. Baicalensis*

1-3.test samples; 4.reference substance of *S. Baicalensis*; 5.negative control

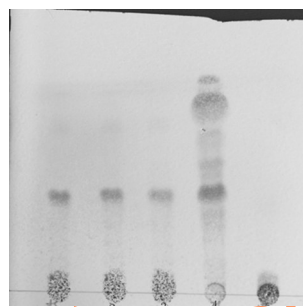


图3 牛蒡子的薄层色谱图

1~3.供试品;4.牛蒡子对照药材;5.阴性对照

Fig 3 TLC chromatograms of *F. arctii*

1-3.test samples; 4.reference substance of *F. arctii*; 5.negative control

2.2 含量测定^[3-5]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Agilent Eclipse Plus-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(48:52, V/V);流速:0.8 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ l。在上述色谱条件下,理论板数以黄芩苷峰计不少于5 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图4。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品适量,加50%甲醇溶解,制成质量浓度约为200 μ g/ml的对照品贮备液(实际质量浓度为188.975 4 μ g/ml)。精密量取上述对照品贮备液4.0 ml,置于10 ml量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取样品1 ml,置于25 ml量瓶中,加50%甲醇适量,超声处理2 min,放冷,加50%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按呼吸通口服液处方和制备工艺制备缺黄芩的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下黄芩苷对照品贮备液1, 2, 4, 6, 8, 10 ml,置于10 ml量瓶中,加50%甲醇定容,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各20 μ l,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以黄芩苷进样量(x, μ g)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得黄芩苷回归方程为 $y=5.15\times 10^3x-1.73\times 10^2$ ($r=0.9999$)。结果表明,黄芩苷检测进样量线性范围为0.378 0~3.779 5 μ g。

2.2.6 精密度的试验 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,黄芩苷峰面积的RSD=0.76%($n=6$),表明仪器精密度良好。

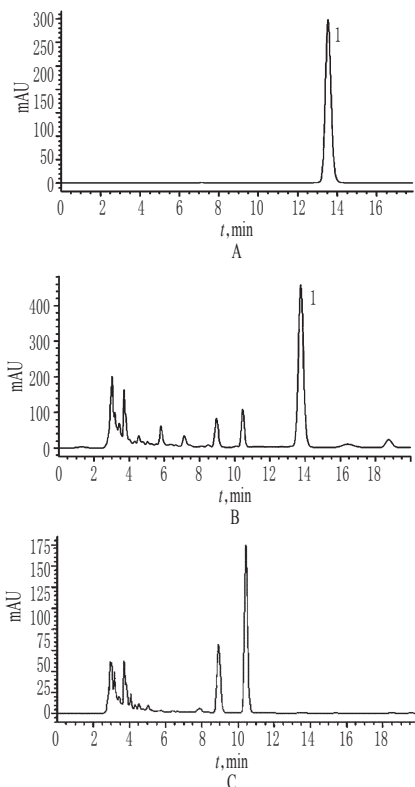


图4 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照品; 1. 黄芩苷

Fig 4 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. baicalin

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:140423-3)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,黄芩苷峰面积的RSD=0.78% (n=6),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密量取同一批样品(批号:140423-3)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,记录峰面积。结果,黄芩苷峰面积的RSD=1.26% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号:140423-3)适量,共9份,每份5 ml,分别加入低、中、高质量的黄芩苷对照品,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=9)

Tab 1 results of recovery test(n=9)

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, %
1.9013	1.2286	3.0872	96.52	100.09	1.28
1.9013	1.2286	3.1005	97.57		
1.9013	1.2286	3.1907	104.95		
1.9013	1.9658	3.8965	101.50		
1.9013	1.9658	3.8992	101.63		
1.9013	1.9658	3.8810	100.70		
1.9013	2.4572	4.2903	97.22		
1.9013	2.4572	4.3645	100.24		
1.9013	2.4572	4.3723	100.56		

2.2.10 样品含量测定 取9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,

记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of contents determination of samples(n=3)

样品批号	黄芩苷含量, mg/ml
140326-1	2.70
140326-2	2.90
140326-3	3.00
140423-3	3.80
140425-3	3.94
141013-1	4.36
141013-2	4.15
141013-3	3.95
141201	2.47

3 讨论

百部中含有多种生物碱类成分,2015年版《中国药典》的鉴别采用了化学鉴别方法,国内的文献中也少有报道其TLC鉴别的方法。本试验参考文献[6]优选展开系统进行百部的TLC研究,用甲醇代替该展开系统中的丙酮,用普通的硅胶G薄层板代替高效板,所得图谱斑点清晰。但由于百部分为3种基源,即对叶百部、直立百部、蔓生百部,其中的生物碱类成分差异也较大。本试验在采用对叶百部和直立百部为对照药材进行研究的过程中,发现二者所含生物碱种类及含量均有较大差异;并且,不同产地药材中含有生物碱的种类和含量也不一致。因此,百部可参考金银花与山银花、黄柏与关黄柏分类标准,按“一物一名”的原则分类,分别建立各自的质量标准,以便更好地对药材质量进行控制。所以在TLC鉴别中,应根据所用药材的基源进行对照药材的挑选或使用其共有成分对照品作为对照。

在9个批次制剂的含量测定中,黄芩苷的含量从2.47~4.36 mg/ml不等,相差较大,这与各省中药材炮制规范的差异、制剂工艺过程的控制水平都存在密切的关系。本制剂工艺为水煎煮-醇沉-水沉工艺,在制剂过程中对于煎煮时间、醇沉和水沉时间均应严格控制,对制剂每一个步骤的工艺进行验证,以期进一步提高其有效成分的溶出率,得到较为均一的制剂质量。

综上所述,本研究所建标准能更加有效地控制呼吸通口服液的质量。

参考文献

- [1] 张永,廖清船.HPLC同时测定呼吸通口服液中黄芩苷和牛蒡子苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):25.
- [2] 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.
- [3] 李洪.复方芩连清解颗粒的质量控制[J].中国医院药学杂志,2014,34(19):1681.
- [4] 王亦存.HPLC法测定青果丸中黄芩苷的含量[J].中国药房,2014,25(32):3057.
- [5] 邝薛洪,谭伯森.HPLC法测定黄芩清肺片中黄芩苷的含量[J].海峡药学,2014,26(6):75.
- [6] 张亚中,袁杰.蔓生百部质量标准研究[J].药物分析杂志,2014,34(10):1856.

(收稿日期:2016-02-16 修回日期:2016-07-04)

(编辑:张静)