

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.014

止咳化痰合剂质量标准改进

徐丹洋, 周 谧, 张金星, 王素素

(江苏省南通市食品药品监督管理局, 江苏 南通 226006)

摘要:目的 完善止咳化痰合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别制剂中的桔梗、前胡、浙贝、紫菀;采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中橙皮苷、黄芩苷、连翘苷的含量,色谱柱为 Agilent - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃,检测波长为 210 nm,进样量为 10 μL。结果 TLC 图中特征斑点明显,分离度好,阴性对照无干扰。橙皮苷、黄芩苷、连翘苷质量浓度分别在 5.80~290.00 μg/mL($r=0.999\ 8$)、5.66~283.00 μg/mL($r=0.999\ 6$)、1.90~95.30 μg/mL($r=0.999\ 2$)范围内与峰面积线性关系良好;平均回收率分别为 93.28%, 93.77%, 94.68%, RSD 分别为 1.45%, 2.03%, 1.67% ($n=9$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%。结论 所建立的 TLC 法专属性强、灵敏度高, HPLC 法简便快速,结果准确、重复性、稳定性均良好,可用于止咳化痰合剂的质量控制。

关键词:止咳化痰合剂;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)01-0047-04

Improvement of the Quality Control Standard for Zhike Huatan Mixture

XU Danyang, ZHOU Mi, ZHANG Jinxing, WANG Susu

(Nantong Food and Drug Control Center, Nantong, Jiangsu, China 226006)

Abstract: **Objective** To improve the quality control standard for Zhike Huatan Mixture. **Methods** The contents of *Platycodonis radix*, *Peucedani radix*, *Fritulariae thunbergii* and *Asteris radix* were identified by TLC method. The contents of hesperidin, baicalin and forsythiaside were determined by HPLC method with Agilent C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) with a flow rate of 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 210 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** Characteristic spots could be detected and well separated without the interference of negative samples by TLC. The mass concentrations of hesperidin, baicalin and forsythiaside showed good linear relationship with the peak area in the range of 5.80-290.00 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 5.66-283.00 μg/mL ($r=0.999\ 6$), and 1.90-95.30 μg/mL ($r=0.999\ 2$) respectively, the average recovery rates were 93.28%, 93.77%, 94.68%, the RSDs were 1.45%, 2.03%, and 1.67% respectively ($n=9$), the RSDs of precision, stability, and repeatability tests were all less than 2%. **Conclusion** The established TLC method has strong specificity and high sensitivity; the HPLC method is simple and fast, and the results are accurate, repeatable and stable, which can be applied for the quality control of Zhike Huatan Mixture.

Key words: Zhike Huatan Mixture; quality control standard; Thin-Layer Chromatography; High-Performance Liquid Chromatography

止咳化痰合剂有清热、止咳、化痰功效,用于治疗各种疾病引起的咳嗽、痰难咳出及咳嗽痰多诸症。该合剂为黄棕色有少量沉淀液体,由陈皮、桔梗、浙贝、黄芩、连翘、前胡、紫菀等 11 味中药饮片及 1 味中药提取物组方,临床长期使用,效果较好,但一直缺少严格的质量控制方法。本研究中通过薄层色谱(TLC)法,对该合剂中桔梗、前胡、浙贝、紫菀 4 味中药进行定性鉴别,通过高效液相色谱(HPLC)法对组方中陈皮、黄芩、连翘 3 味中药进行含量测定,为该制剂的质量控制提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

U3000 型高效液相色谱仪(戴安仪器公司); BT125D 型电子分析天平(赛多利斯公司); HHS-11-6 型恒温水浴锅(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);

Milli-Q 超纯水仪(Millipore 公司)。

1.2 试药

桔梗对照药材(批号为 121028-201411)、贝母素甲对照品(批号为 110750-201612)、贝母素乙对照品(批号为 110751-201712)、白花前胡甲素对照品(批号为 111711-201703)、紫菀酮对照品(批号为 111581-201806)、橙皮苷对照品(批号为 110721-201617)、黄芩苷对照品(批号为 110715-201720)、连翘苷对照品(批号为 110821-201615),均购自中国食品药品检定研究院;止咳化痰合剂由本地中医院提供;乙腈、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

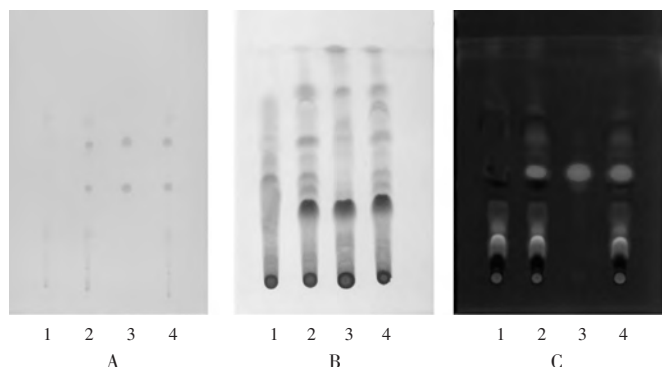
2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别^[1]

2.1.1 浙贝

取样品溶液 30 mL,置分液漏斗中,加浓氨试液 2 mL

与三氯甲烷 20 mL, 振摇提取, 取三氯甲烷层蒸干, 残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺浙贝的阴性样品溶液 30 mL, 同法制成阴性对照品溶液。取贝母素甲对照品、贝母素乙对照品各适量, 加三氯甲烷制成每 1 mL 分别含上述成分 2 mg 的混合对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》(通则 0502) TLC 法(以下简称 TLC 法)试验, 吸取阴性对照品溶液、对照品溶液各 10 μ L, 供试品溶液、供试品溶液 - 对照品溶液(1:1, V/V)各 20 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯 - 甲醇 - 浓氨试液(17:2:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以稀碘化铋钾试液。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性无干扰。详见图 1 A。



1. 阴性对照品溶液 2. 供试品溶液 3. 对照品(药材)溶液
4. 供试品溶液 - 对照品溶液

A. 浙贝 B. 桔梗 C. 前胡

图 1 浙贝、桔梗、前胡薄层色谱图

2.1.2 桔梗

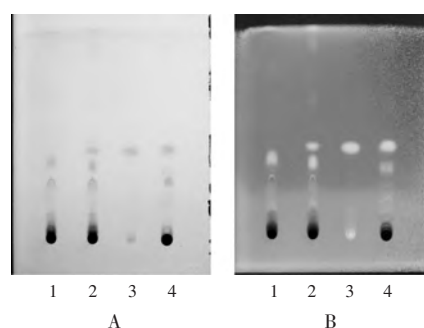
取样品 30 mL, 加 7% 硫酸乙醇 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 用三氯甲烷振摇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并三氯甲烷液, 加水洗涤 2 次, 每次 30 mL, 弃去洗液, 三氯甲烷液用无水硫酸钠脱水, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液。取缺桔梗的样品溶液 30 mL, 同法制成阴性对照品溶液。另取桔梗对照药材 1 g, 加水 50 mL, 煎煮 1 h, 浓缩至 30 mL, 滤过, 取滤液加 7% 硫酸乙醇 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 用三氯甲烷振摇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并三氯甲烷液, 加水洗涤 2 次, 每次 30 mL, 弃去洗液, 三氯甲烷液用无水硫酸钠脱水, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得对照药材溶液。按 TLC 法试验, 吸取阴性对照品溶液、供试品溶液、对照药材溶液各 10 μ L, 供试品溶液 - 对照品溶液(1:1, V/V)20 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷 - 乙醚(2:1, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性无干扰。详见图 1 B。

2.1.3 前胡

取样品 30 mL, 加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)振摇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并三氯甲烷液, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 即得供试品溶液。取缺前胡的阴性样品溶液 30 mL, 同法制成阴性对照品溶液。另取白花前胡甲素对照品, 加甲醇制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液。按 TLC 法试验, 吸取阴性对照品溶液 10 μ L, 供试品溶液、供试品溶液 - 对照品溶液(1:1, V/V)各 20 μ L, 对照品溶液 5 mL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) - 二氯甲烷 - 乙酸乙酯(4:2:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外灯(254 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点, 阴性无干扰。详见图 1 C。

2.1.4 紫菀

取样品溶液 30 mL, 加乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 30 mL, 合并滤液, 蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺紫菀的阴性样品溶液 30 mL, 同法制成阴性对照品溶液。另取紫菀酮对照品, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按 TLC 法试验, 吸取上述阴性对照品溶液 10 μ L, 供试品溶液、供试品溶液 - 对照品溶液(1:1, V/V)各 20 μ L, 对照品溶液 5 mL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) - 乙酸乙酯(9:1, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 分别置日光和紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点或荧光斑点, 阴性无干扰。详见图 2。



A. 日光 B. 紫外光(365 nm)

1. 阴性对照品溶液 2. 供试品溶液 3. 对照品溶液
4. 供试品溶液 - 对照品溶液

图 2 紫菀薄层色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[2]

色谱柱: Agilent - C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min 时 20% A, 10~15 min 时 20% A $\rightarrow$ 25% A, 15~20 min 时 25% A, 20~25 min 时 25% A $\rightarrow$ 32% A, 25~35 min 时

32% A→37% A, 35~40 min 时 37% A→42% A, 40~45 min 时 42% A→50% A, 45~50 min 时 50% A→90% A, 50~55 min 时 90% A, 55~57 min 时 90% A→20% A, 57~65 min 时 20% A; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 210 nm; 进样量: 10 μL。

2.2.2 溶液制备

取橙皮苷、黄芩苷、连翘苷对照品 30.17, 30.23, 10.04 mg, 精密称定, 置同一 100 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并定容, 摇匀, 制成各成分质量浓度分别为 0.290 0, 0.283 0, 0.095 3 mg/mL 的混合对照品贮备液; 精密量取 5 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得混合对照品溶液。精密量取样品 15 mL, 置分液漏斗中, 用水饱和正丁醇萃取 3 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 用正丁醇饱和的水洗涤 3 次, 每次 30 mL, 取正丁醇层蒸干, 用 70% 甲醇溶解转移至 50 mL 容量瓶中, 并定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。同法制备阴性对照品溶液^[3-5]。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取 2.2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 3。理论板数按各待测成分峰计均大于 3 000, 分离度均大于 1.5, 基线分离良好。

专属性试验: 取 2.2.2 项下混合对照品溶液及阴性对照品溶液, 按拟订色谱条件进样测定。结果在各待测成分峰处阴性对照无干扰, 详见图 3。

线性关系考察: 取上述混合对照品贮备液 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 50.0 mL, 分别置 50 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得系列混合对照品溶液, 分别依次注入高效液

相色谱仪, 进样量为 10 μL, 记录峰面积。以待测成分对照品质量浓度 (X , μg/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

表 1 回归方程及线性范围 ($n=5$)

待测成分	回归方程	r	线性范围 (μg/mL)
橙皮苷	$Y = 32.826X - 11.157$	0.999 8	5.80 ~ 290.00
黄芩苷	$Y = 66.004X - 19.157$	0.999 6	5.66 ~ 283.00
连翘苷	$Y = 60.907X + 7.923$	0.999 2	1.90 ~ 95.30

精密密度试验: 取混合对照品溶液, 按拟订色谱条件连续测定 6 次。结果橙皮苷、黄芩苷、连翘苷峰面积的 RSD 分别为 0.60%, 1.02%, 0.89% ($n=6$), 表明仪器精密密度良好。

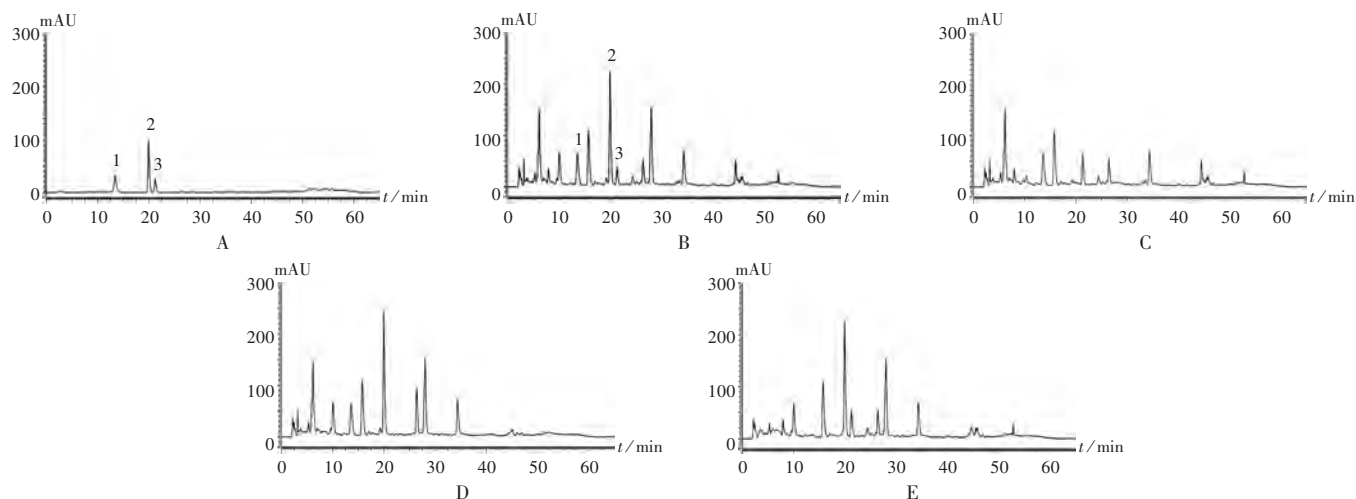
稳定性试验: 取样品适量, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件, 室温下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时进样测定。结果橙皮苷、黄芩苷、连翘苷峰面积的 RSD 分别为 1.08%, 1.12%, 0.97% ($n=7$), 表明供试品溶液室温下放置 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取同一批适量样品 5 份, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件测定。结果橙皮苷、黄芩苷、连翘苷峰面积的 RSD 分别为 1.17%, 1.29%, 1.32% ($n=5$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 精密量取已知含量的样品, 分别加入橙皮苷、黄芩苷、连翘苷质量浓度分别为 0.301, 0.325, 0.065 0 mg/mL 的混合对照品溶液 2.5, 3.0, 3.5 mL, 依法制备供试品溶液, 再按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算回收率。结果见表 2。

2.2.4 样品含量测定

取样品适量, 依法制备供试品溶液, 并按拟订色谱条件进行测定含量。结果见表 3。



1. 橙皮苷 2. 黄芩苷 3. 连翘苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C-E. 阴性对照品溶液(分别为缺黄芩、连翘、陈皮)

图 3 高效液相色谱图

表2 加样回收试验结果($n=9$)

取样量 (mL)	样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
5	0.890	1.074	0.209	0.752	0.812	0.162	1.597	1.809	0.361	94.02	90.52	93.83						
5	0.890	1.074	0.209	0.752	0.812	0.162	1.589	1.839	0.364	92.95	94.21	95.68						
5	0.890	1.074	0.209	0.752	0.812	0.162	1.581	1.812	0.359	91.89	90.89	92.59						
5	0.890	1.074	0.209	0.903	0.975	0.195	1.714	1.989	0.395	91.25	93.85	95.38						
5	0.890	1.074	0.209	0.903	0.975	0.195	1.725	1.991	0.397	92.47	94.05	96.41	93.28	93.77	94.68	1.45	2.03	1.67
5	0.890	1.074	0.209	0.903	0.975	0.195	1.731	1.987	0.389	93.13	93.64	92.31						
5	0.890	1.074	0.209	1.054	1.138	0.228	1.878	2.165	0.429	93.74	95.87	96.49						
5	0.890	1.074	0.209	1.054	1.138	0.228	1.884	2.161	0.427	94.31	95.52	95.61						
5	0.890	1.074	0.209	1.054	1.138	0.228	1.899	2.159	0.423	95.73	95.34	93.86						

注:A为橙皮苷,B为黄芩苷,C为连翘苷。

表3 样品含量测定结果(mg/mL, $n=5$)

序号	橙皮苷	黄芩苷	连翘苷
1	0.178	0.215	0.041 7
2	0.159	0.201	0.036 7
3	0.151	0.219	0.038 4
4	0.172	0.198	0.040 9
5	0.184	0.179	0.037 3

3 讨论

合剂作为一种口服液体制剂,质量可控性较片剂、颗粒剂、胶囊剂等固体制剂差,且在运输、储存过程中易发霉、酸败,但其具有见效快、吸收好的特点,故很多中医院仍保留较多合剂类医院制剂^[6]。止咳化痰合剂规定了性状、相对密度、pH、装量、微生物限度检查,但与大部分合剂标准一样只对外部特征进行控制,对能保证药品疗效的鉴别特征和指标性成分的控制较少。

本研究中通过TLC法确定了组方中4味中药的鉴别特征,斑点清晰、分离度好、专属性强。并建立了组方中3味中药的含量测定方法,结果3个待测成分分离度良好,阴性对照无干扰。本试验中对该方主要成分有了较严格的质量控制标准,保证了临床用药的安全性、有效性及合理性,对起到调和药性及处方中用量较少的其他4味中药未设立质控标准。

预试验中,TLC法条件参考2015年版《中国药典》一部及四部,对提取溶剂、提取方法、展开剂、温湿度、薄层板、显色剂等均做系统考察,采用适合的溶剂提取待测成分可排除其他成分的干扰,选取合适的流动相比可达到较好的分离效果,显色剂的选择可排除不同类型化学成分的干扰,最终优化出有显著鉴别特征的薄层色谱法,且比移(R_f)值在0.3~0.7之间。

HPLC法中,由于合剂中成分较复杂,故本试验中考察不同的提取方法:聚酰胺吸附柱色谱法(不同洗脱溶剂:乙醇、甲醇、70%乙醇、70%甲醇,不同洗脱体积:

100,120,150,200 mL),正丁醇有效部位萃取法(考察水饱和和正丁醇的萃取体积、萃取次数,正丁醇饱和水的洗涤体积、洗涤次数,正丁醇层蒸干后转移样品所用溶剂)等对待测成分的提取和纯化效果。由于聚酰胺洗脱慢,吸附较大(最高可达30%)^[7],以及不同品质的聚酰胺存在差异,导致试验结果重复性较差。同时文献表明,橙皮苷、黄芩苷、连翘苷在正丁醇中均有较好的溶解性^[8-10],故采用正丁醇萃取法来提取指标性成分。系统适用性试验中考察不同的流动相系统(0.1%磷酸溶液-乙腈,0.1%磷酸溶液-甲醇);考察不同品牌(Waters、Agilent、Shimadzu)的色谱柱,最终选定本研究中色谱条件,更好地保障了合剂的质量。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:57.
- [2] 朱日然. HPLC法同时测定柴银口服液液中5种成分的含量[J]. 药学研究,2019,34(9):509-511.
- [3] 施敏,管敏. 上感合剂质量标准研究[J]. 中国药业,2019,28(3):42-44.
- [4] 张玉叶,刘光斌,王艳. 荆防解感口服液的质量标准研究[J]. 甘肃中医药大学学报,2019,36(2):28-31.
- [5] 彭骞,蒋志平,罗丹. 一测多评法测定二母宁嗽丸中6种有效成分含量[J]. 中国药师,2019,22(4):788-791.
- [6] 穆文华. 浅谈中药炮制与临床疗效的关系[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(73):138-140.
- [7] 唐德智. 黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展[J]. 海峡药学,2009,21(12):101-104.
- [8] 张颖娟,韩燕霞,梁利鹏,等. 青翘正丁醇部位连翘苷、连翘酯苷A的制备及抑菌、抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):192-196.
- [9] 李淑敏. 黄芩苷和黄芩素提取分离工艺研究及抗氧化活性评价[D]. 郑州:郑州大学.
- [10] 刘均玉. 橘皮的化学成分与黄酮类化合物的提取纯化研究[D]. 福州:福建师范大学.

(收稿日期:2019-05-28;修回日期:2019-07-03)