

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.03.016

苏苏小儿止咳颗粒提取工艺研究中鞘蕊苏的质量控制

张 慧¹,何建华²,顾成刚²,朱丽玲¹,吴 宁^{1△}

(1. 武汉军谷坊科技开发有限公司,湖北 武汉 430075; 2. 武汉药谷科技开发有限公司,湖北 武汉 430075)

摘要:目的 探讨苏苏小儿止咳颗粒提取工艺研究中鞘蕊苏的质量控制方法。方法 将样品用二氯甲烷萃取后通过硅胶柱分离纯化,采用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定鞘蕊苏中异佛司可林的含量。结果 阴性样品无干扰,异佛司可林进样量线性范围为0.093 7~1.874 0 μg($r=0.999 8$),平均回收率为97.08%,RSD为1.29%($n=6$)。结论 该方法灵敏、可靠,分离度符合要求,可作为苏苏小儿止咳颗粒提取工艺研究样品鞘蕊苏所含异佛司可林的质量控制方法。

关键词:鞘蕊苏;异佛司可林;提取工艺;质量控制;高效液相色谱-蒸发光散射法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0 文献标识码:A 文章编号:1006-4931(2020)03-0053-04

Quality Control of the Extraction Technology for *Coleus Forskohlii* in Susu Xiaozhike Granules

ZHANG Hui¹, HE Jianhua², GU Chenggang², ZHU Liling¹, WU Ning¹

(1. Wuhan Jungufang Science and Technology Development Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China 430075; 2. Wuhan Yaogu Science and Technology Development Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China 430075)

Abstract: Objective To investigate the quality control method of the extraction technology for *Coleus forskohlii* in Susu Xiaozhike Granules. **Methods** The sample was extracted by dichloromethane and purified by silica gel column. The HPLC-ELSD method was used to determine the content of isoforskolin in *Qiaoruisu*. **Results** The negative samples showed no interference; the linear range of isoforskolin was 0.093 7-1.874 0 μg ($r=0.999 8$); the average recovery was 97.08%, RSD=1.29% ($n=6$). **Conclusion** This method is sensitive, reliable, and meets the requirements of separation. It can be used as a quality control method for isoforskolin contained in *Coleus forskohlii* during the extraction technology of Susu Xiaozhike Granules.

Key words: *Coleus forskohlii*; isoforskolin; extraction technology; quality control; HPLC-ELSD

小儿咳嗽为儿科临床常见病,易反复发作,目前用于小儿咳嗽的中成药中,以治疗热咳的药物居多,专用于小儿寒咳的极少,且疗效较快的药物大多含有麻黄

碱、可待因等药物,不适于小儿服用。针对这一现状,本课题组研制了苏苏小儿止咳颗粒。其属中药新药注册6.1类,已获国家药物临床试验批件和发明专利证书,

第一作者:张慧,女,大学本科,工程师,研究方向为中药、天然药物新药开发,(电子信箱)89565417@qq.com。

△通信作者:吴宁,男,大学本科,研究方向为中药、天然药物新药开发,(电子信箱)wuning4321@163.com。

角质形成细胞凋亡的保护作用[J]. 中国工业医学杂志, 2007,20(2):76-78.

[3] 张延荣,赵青. 维生素E与糖皮质激素药膏交替外用治疗湿疹[J]. 现代中西医结合杂志,1999,8(9):1516.

[4] 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,2015:24.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1242-1243.

[6] 赵晓辉,宋春明. 维生素E和2,6-二叔丁基对甲酚在维生素AD滴剂中抗氧化效果对比[J]. 中国药业,2006,15(7):49-50.

[7] 赵雷,冯业童,董超,等. 骨髓间充质干细胞联合维生素E对急性肾损伤炎症反应的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014,30(10):1891-1901.

[8] 魏旭兰,王亦民,袁飞锋. 维生素E抗肿瘤作用机制研究[J]. 现代诊断与治疗,2010,21(3):189-191.

[9] 石代秀,盖琼燕. 维生素E药用机制的研究进展[J]. 甘肃医药, 2016,35(1):27-29.

[10] 张旭晖,王恬. α-生育酚琥珀酸酯及其生物学功能研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(2):346-350.

[11] 李鹏,陈琴华,张卓,等. 气相-质谱联用法测定维生素E胶丸中维生素E的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007,27(7):899-901.

[12] 徐文峰,徐硕,何笑荣,等. 天然维生素E软胶囊中维生素E的含量测定[J]. 中国医药导报,2017,14(30):136-138.

[13] 陈亮,何凤慈,宁桂琴. 高效液相色谱法测定维生素E霜中维生素E的含量[J]. 中国药业,2001,10(9):42.

[14] 石晓,叶曼红. 气相色谱法测定益康胶囊中维生素E含量[J]. 中国药业,2006,15(8):14-15.

[15] 朱姜,张鹏,杨嘉,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中的维生素A、维生素D、维生素E[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(11):1733-1736.

[16] 何荣芬. 高效液相色谱法测定白芷维生素E乳膏中维生素E含量[J]. 中国药业,2014,23(4):40-42.

[17] 赵瑞亭,侯晓军. 防腐剂对维生素E乳含量测定的影响[J]. 中国药业,2008,17(17):31-32.

[18] 关晶,张建民,谭征. HPLC测定醋酸地塞米松乳膏中维生素E的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):102-104.

(收稿日期:2019-07-05)

处方来源于医院临床应用多年的经验方,对治疗外感风寒所致的小儿咳嗽临床疗效确切。处方由化橘红、鞘蕊苏、紫苏叶等5味中药组方,具有宣肺解表散寒、理气化痰止咳之功效,用于小儿风寒咳嗽症,症见咳嗽频作、咳痰稀白、鼻流清涕、恶寒无汗、头身疼痛、舌淡苔白、脉浮紧、指纹色淡。鞘蕊苏为方中为臣药,是唇形科植物毛喉鞘蕊花 *Coleus forskohlii* (Willd.) Briq. 的干燥全草,具有下气平喘、平肝之功,用于喘咳、眩晕、目胀昏花,如支气管哮喘、咳嗽、青光眼、高血压^[1]。滇产毛喉鞘蕊花中主要成分为异佛司可林(isoforskolin)^[2],是目前所知的腺苷酸环化酶激活剂,即不通过受体,亦不通过抑制磷酸-Ⅱ酶,可直接提高血浆中环磷酸腺苷(cAMP)水平,直接舒张支气管平滑肌,从而起到明显的止喘抗炎作用^[3-4]。异佛司可林在鞘蕊苏药材中含量较低,且无紫外吸收,在复方中鲜有将其作为检测指标的报道,但其作为处方中的药效成分,有必要对其含量测定方法进行考察,为提取工艺研究优选最佳工艺参数提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);2000-ES型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司);204AL型电子天平(德国梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 试剂

异佛司可林对照品(美国Sigma公司,批号为A04016-13072506,含量按97.8%计);水为娃哈哈纯净水;色谱甲醇、乙腈均由湖北昌泰兴业科技有限公司提供;柱层析用硅胶(100~200目,化学纯,青岛海浪硅胶干燥剂有限公司);甲醇,乙酸乙酯、二氯甲烷均为分析纯,由国药集团化学试剂有限公司提供;苏苏小儿止咳颗粒70%醇提液、鞘蕊苏阴性样品均为武汉药谷科技开发有限公司自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:40℃;流动相:乙腈-2.5%冰醋酸溶液(40:60,

V/V);流速:1.0 mL/min;进样量:5 μL,10 μL(外标两点法);2000-ES型蒸发光散射检测器,汽化温度:103℃,氮气流速:2.8 L/min。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取异佛司可林对照品11.98 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,制得0.4686 mg/mL的对照品贮备液;精密吸取5 mL贮备液置25 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度线,摇匀,得0.0937 mg/mL的对照品溶液。

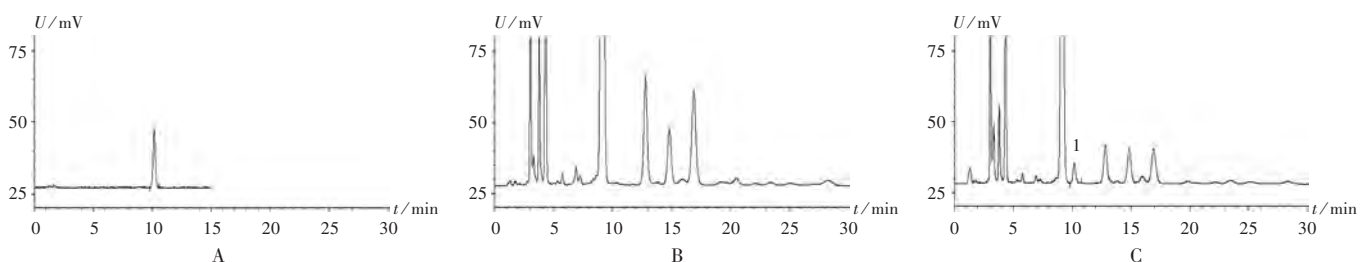
供试品溶液:取苏苏小儿止咳颗粒70%醇提液(按处方比例分别称取化橘红、鞘蕊苏、紫苏叶、桔梗各50 g,甘草25 g,加10倍量70%乙醇,提取2次,每次1 h,滤过,合并滤液,即得)150 mL,精密称定,置水浴上蒸干,残渣加水30 mL加热使溶解,用二氯甲烷振摇提取4次,第1次30 mL,其余3次每次20 mL,合并二氯甲烷液,加水50 mL洗涤,弃去水液,回收溶剂至约5 mL,加入硅胶(100~200目)1.0 g,拌匀,挥干,移至硅胶柱(内径1.5 cm,硅胶8 g,湿法装柱)上,先用二氯甲烷-乙酸乙酯(9:1, V/V)80 mL洗脱,弃去洗脱液,再用二氯甲烷-乙酸乙酯(75:25, V/V)100 mL洗脱,收集洗脱液,回收溶剂至干,用甲醇溶解并转移至5 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

阴性对照品溶液:按处方比例称取除鞘蕊苏外的其他药材,按苏苏小儿止咳颗粒70%醇提液的制备工艺制成阴性样品,再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:精密量取对照品溶液、阴性供试品溶液、供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果见图1。可见,阴性对照品溶液色谱在与异佛司可林相应位置上无吸收峰出现,异佛司可林与其他成分色谱峰达到基线分离。

线性关系考察:取对照品溶液,分别进样1,3,5,7,10,15,20 μL,按拟订色谱条件测定,以进样量的常用对数值为横坐标(X)、峰面积的常用对数值为纵坐标(Y)



1. 异佛司可林

A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱-蒸发光散射色谱图

绘制标准曲线,线性回归方程为 $Y = 1.715X + 5.5046$, $r = 0.9998$ ($n = 7$)。结果表明,异佛司可林进样量在 $0.0937 \sim 1.8740 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一对照品溶液,按拟订色谱条件进样 $5 \mu\text{L}$,连续进样 6 次,记录色谱图,计算色谱峰峰面积对数。结果 RSD 为 0.14% ($n = 6$),表明仪器精密度较好。

稳定性试验:取同一份供试品溶液,分别在制备后 $0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 \text{ h}$ 时按拟订色谱条件进样测定。结果异佛司可林色谱峰峰面积对数的 RSD 为 0.28% ($n = 13$),表明供试品溶液在常温下放置 24 h 稳定性良好。

重复性试验:平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果异佛司可林的平均含量为 $2.0024 \mu\text{g/g}$, RSD 为 1.37% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品溶液(含量为 $2.0024 \mu\text{g/g}$)6 份,每份约 75 mL ,精密称定,置蒸发皿中,精密加入 $83.325 \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液 2 mL ,置水浴上蒸干,制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 异佛司可林加样回收试验结果 ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
67.1242	134.4095	166.65	296.1478	97.05	97.08	1.29
66.9547	134.0701	166.65	297.7416	98.21		
67.0236	134.2081	166.65	298.6394	98.67		
67.1244	134.4099	166.65	295.4593	96.64		
66.8528	133.8660	166.65	292.4187	95.14		
66.9857	134.1322	166.65	295.3561	96.74		

2.4 工艺研究样品测定

鞘蕊苏在本处方中为臣药,拟以其所含主要成分异佛司可林为指标成分,对不同浓度乙醇提取液进行检测,得出指标成分转移率高的较优乙醇浓度范围,再在此范围内进行正交试验,以提取次数(因素 A)、提取时间(因素 B)、加醇量(因素 C)、乙醇浓度(因素 D)确定优化后的提取条件,并进行正交验证试验,确定最优提取条件。异佛司可林提取转移率 = (各提取液中异佛司可林的含量 \times 对应提取液的质量) / (鞘蕊苏异佛司可林含量 \times 鞘蕊苏的投料量) $\times 100\%$ 。结果见表 2 至表 6。结合君药化橘红中柚皮苷的转移率,确定苏苏小儿止咳颗粒提取正交试验乙醇浓度为 $60\% \sim 80\%$ 。可见,提取次数和加醇量对异佛司可林转移率有显著影响,最优提取条件为 $A_3B_2C_3D_2$;提取 3 次与 2 次相比,加醇量 10 倍与 12 倍,异佛司可林的提取转移率相差均不大,从工业生产结合能源耗损来分析,臣药鞘蕊苏中异佛司可林最佳提取条件为 $A_2B_2C_2D_2$ 。各验证试验提取液的异佛司可林

提取转移率均大于 75% , RSD 小于 2.0% ,表明提取 2 次,加醇量为 10 倍能将有效成分提取完全。故确定最佳提取工艺条件为:加 10 倍量 70% 乙醇,回流提取 2 次,每次 1.5 h 。

表 2 工艺提取预试验异佛司可林的测定结果

提取溶剂	含量($\mu\text{g/g}$)	转移率(%)
水	0.5163	22.11
30% 乙醇	0.5721	24.40
50% 乙醇	1.2691	55.07
60% 乙醇	1.3178	65.71
70% 乙醇	2.0402	80.82
80% 乙醇	1.5166	71.03
95% 乙醇	1.0209	39.22

表 3 醇提因素水平表

水平	因素 A (次)	因素 B (h)	因素 C (倍)	因素 D (%)
1	1	1.0	8	60
2	2	1.5	10	70
3	3	2.0	12	80

表 4 醇提正交试验结果

序号	因素 A(次)	因素 B(h)	因素 C(倍)	因素 D(%)	异佛司可林转移率(%)
1	1	1	1	1	55.41
2	1	2	2	2	62.37
3	1	3	3	3	64.97
4	2	1	2	3	86.63
5	2	2	3	1	90.34
6	2	3	1	2	82.87
7	3	1	3	2	89.99
8	3	2	1	3	87.22
9	3	3	2	1	89.14
均值 1	60.92	77.34	75.17	78.30	
均值 2	86.61	79.98	79.38	78.41	
均值 3	88.78	78.99	81.77	79.61	
极差	27.87	2.63	6.60	1.31	

表 5 异佛司可林转移率方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A(次)	1441.58	2	456.05	19.00	*
B(h)	10.62	2	3.36	19.00	
C(倍)	67.01	2	21.20	19.00	*
D(%)	3.16	2	1.00	19.00	
D(误差)	3.16	2			

表 6 醇提正交验证工艺异佛司可林转移率试验结果

序号	提取条件	转移率(%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
验证 1	$A_3B_2C_3D_2$	78.11	78.77	1.28
验证 2	$A_3B_2C_3D_2$	79.50		
验证 3	$A_2B_2C_2D_2$	79.74		
验证 4	$A_2B_2C_2D_2$	77.41		