

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.21.015

清肺排毒合剂(新冠1号)质量标准研究*

罗群, 杨思进, 蒲清荣, 黄锐[△], 赵剑, 赵福兰, 王诗杨, 王饶琼, 任维, 刘佳利

(西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 建立清肺排毒合剂的质量标准。方法 采用显色反应鉴别清肺排毒合剂中的挥发性成分;采用薄层色谱法鉴别方中桂枝、麻黄、黄芩;采用高效液相色谱法测定黄芩苷含量。结果 薄层色谱斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰;黄芩苷进样质量浓度在6.85~855.93 μg/mL($r^2=0.9994$)范围内与峰面积线性关系良好;平均回收率为101.49%,RSD为1.06%($n=9$)。结论 该方法快速、简单,专属性强,可用于清肺排毒合剂的质量控制。

关键词:清肺排毒合剂(新冠1号);高效液相色谱法;薄层色谱法;黄芩苷;桂枝;麻黄;黄芩

中图分类号:R932;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)21-0052-04

Quality Standard of Qingfei Paidu Mixture(Xin Guan No. 1)

LUO Qun, YANG Sijin, PU Qingrong, HUANG Rui, ZHAO Jian, ZHAO Fulan, WANG Shiyang, WANG Raoqiong, REN Wei, LIU Jiali

(Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Qingfei Paidu Mixture. **Methods** The volatile components in Qingfei Paidu Mixture were identified by the chromogenic reaction. The *Cinnamomi Ramulus*, *Ephedrae Herba* and *Scutellariae Radix* were identified by thin layer chromatography(TLC) method, and the content of baicalin was determined by the high performance liquid chromatography(HPLC) method. **Results** The TLC spots were clear and well-separated, and the negative control had no interference. Baicalin showed good linear relationship with peak area within the range of 6.85~855.93 μg/mL($r^2=0.9994$), the average recovery was 101.49%, and the RSD was 1.06% ($n=9$). **Conclusion** The method is rapid, simple and specific, which can be used for the quality control of Qingfei Paidu Mixture.

Key words: Qingfei Paidu Mixture(Xin Guan No. 1); HPLC; TLC; baicalin; *Cinnamomi Ramulus*; *Ephedrae Herba*; *Scutellariae Radix*

清肺排毒合剂处方源于国家中医药管理局和国家卫生健康委员会联合发文推荐全国各地治疗新冠肺炎的清肺排毒汤,由汉代张仲景《伤寒杂病论》中的多个治疗由寒邪引起外感热病的经典方剂化裁而来,包括小柴胡汤、麻杏石甘汤、射干麻黄汤、五苓散4个经典方^[1]。该制剂具有清肺排毒、宣降肺气功效,用于治疗邪热蕴

肺,症见发热、咳嗽、咯痰、气短、胸闷等,由麻黄、桂枝、黄芩、生石膏等21味中药组方,在治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)中显示了独特疗效^[2]。合剂能保存大量挥发性成分,工艺简单,生产周期短,见效快,吸收好。本研究中通过显色反应对该制剂中挥发性成分进行鉴别,通过薄层色谱(TLC)法对方中桂枝、麻黄、黄芩3味中

*基金项目:国家中医药管理局新型冠状病毒感染肺炎中医药应急专项课题[2020ZYLCYJ02-3];西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合项目[2020XYLH-003]。

第一作者:罗群,女,大学本科,中药师,研究方向为中药制剂,(电话)0830-3162253(电子信箱)1131687395@qq.com。

[△]通信作者:黄锐,男,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药制剂,(电话)0830-3162253(电子信箱)365369747@qq.com。

- 研究[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(2):189-191.
- [12] 滕 葳,柳 琪,李 倩,等. 重金属污染对农产品的危害与风险评估[M]. 北京:化学工业出版社,1996:20-50.
- [13] HUGHES MF, BECK BD, CHEN Y, et al. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective[J]. Toxicological Sciences, 2011,123(2):305-332.
- [14] 李景岩,张爱君. 砷代谢与砷毒性作用机制的关系[J]. 中国地方病防治杂志,2011,26(5):345-347.
- [15] 方展强,杨丽华. 重金属在鲫鱼组织中的积累与分布[J]. 水利渔业,2004,24(6):23-26.
- [16] 曾泽雨. Pb、Cd胁迫对鱼腥草生理特性及其累积效应的研究[D]. 成都:四川农业大学,2010.
- [17] 励 炯,宋旭峰,朱 健,等. 破壁灵芝孢子粉重金属含量、破壁率及杂质掺混情况研究[J]. 中药材,2014,37(12):2171-2174.
- [18] 沈 梅,周枝凤,陈凌云. 电感耦合等离子体质谱法测定虎杖中铜砷镉汞铅[J]. 理化检验:化学分册,2010,46(7):787-788.
- [19] Rome: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary Report of the Seventy-Second Meeting of JECFA[EB/OL]. (2010-02-01) [2012-06-04]. <http://www.who.int/food-safety/publications/chem/summary72.pdf?ua=1>.
- [20] Geneva: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary Report of the Seventy-Third Meeting of JECFA[EB/OL]. (2010-06-24) [2012-06-09]. <http://www.who.int/food-safety/publications/jecfa-reports/en/>.
- (收稿日期:2020-03-01;修回日期:2020-06-10)

药进行定性鉴别,通过高效液相色谱(HPLC)法测定该制剂中黄芩苷的含量,为清肺排毒合剂的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪,包括SPD-20A型紫外可见检测器,LCsolution色谱工作站,AUW1200型电子天平(精度为十万分之一),购自日本岛津公司;JPCT0328型超声波提取器(武汉嘉鹏电子有限公司,功率为30~300 W,频率为28 kHz);JA203H型电子天平(常州市幸运电子设备有限公司,精度为千分之一);GOODLOOK-LOOK型薄层色谱成像系统(上海科哲生化科技有限公司);HH型数显电热恒温水浴箱(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)。

1.2 试药

黄芩苷对照品(批号为110715-201318,纯度为93.3%),桂枝对照药材(批号为121191-201304),盐酸麻黄碱对照品(批号为171241-201508,纯度为99.8%),黄芩对照药材(批号为120955-201309),均购自中国食品药品检定研究院;1%香草醛浓硫酸溶液(实验室自制);茛三酮试液(实验室自制,茛三酮购自成都市科龙化工试剂,批号为2013110901);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 理化鉴别

挥发性成分:取样品1瓶,置分液漏斗中,加乙醚25 mL,用少量乙醚洗涤瓶内壁2次,洗液并入分液漏斗中,振摇提取,加入25 mL乙醚,取乙醚层,挥去乙醚,加新配置的1%香草醛浓硫酸溶液1~2滴,显紫色。

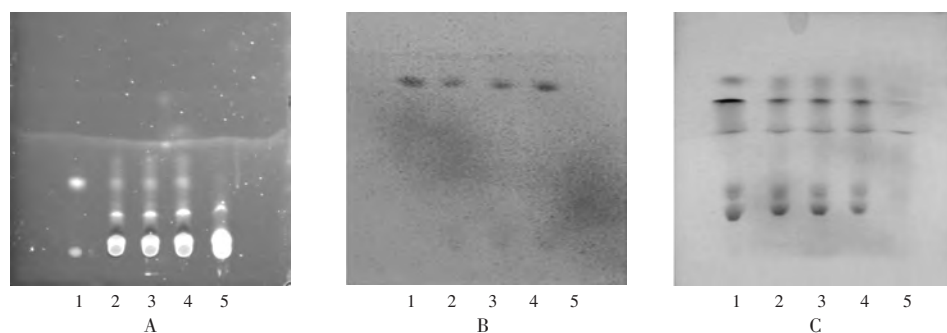
2.2 TLC鉴别

桂枝:取样品60 mL,用乙醚萃取2次,每次60 mL,合并乙醚萃取液,蒸干,加乙醇1 mL溶解,作为供试品溶液。取桂枝对照药材0.25 g,加乙醇10 mL,密塞,超声30 min,滤过,取续滤液作为对照药材溶液。按处方(除桂枝外)工艺与制法,制成阴性对照品,按供试品溶

液制备方法制备阴性样品溶液。照TLC法2015年版《中国药典(四部)》通则0502试验,吸取上述3种溶液各10~15 μ L,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(17:3, V/V)为展开剂,展距约10 cm,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1A。

麻黄:取样品30 mL,用浓氨试液调节pH值至8.0~9.0,用三氯甲烷振摇提取2次,每次40 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇1 mL溶解,作为供试品溶液。另取盐酸麻黄碱对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按处方(除麻黄外)工艺与制法,制成阴性对照品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照TLC法2015年版《中国药典(四部)》通则0502试验,吸取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20:5:0.5, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茛三酮试液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液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1B。

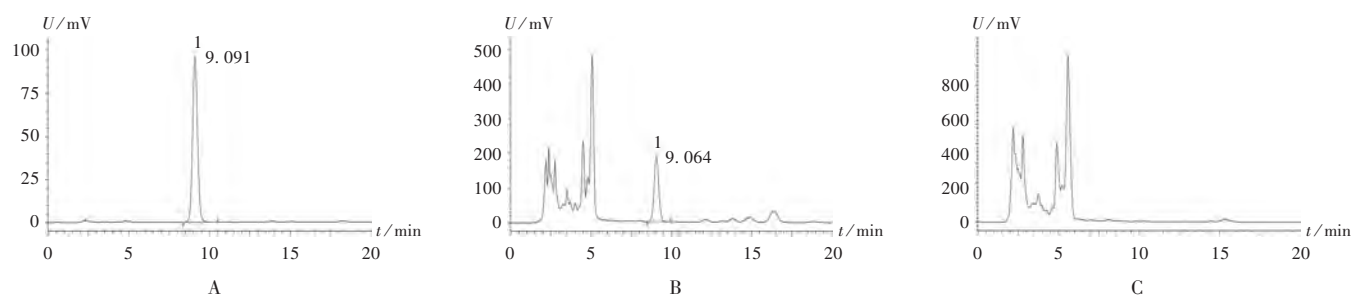
黄芩:取样品30 mL,用稀盐酸调节pH值至3.0~3.5,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次50 mL,合并提取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取黄芩对照药材1 g,加水50 mL,煎煮30 min(适时补充水),滤过,滤液自“用稀盐酸调节pH值至3.0~3.5”起,同法制成对照药材溶液。按处方(除黄芩外)工艺与制法,制成阴性对照品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照TLC法2015年版《中国药典(四部)》通则0502试验,吸取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一以4%醋酸钠的羧甲基纤维素钠溶液为黏合剂的硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以1%三氯化铁乙醇溶液,在日光下检视。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,且阴性对照无干扰。详见图1C。



1. 对照药材溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 桂枝 B. 麻黄 C. 黄芩

图1 薄层色谱图



1. 黄芩苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Kromasil Eternity XT-C₁₈ 键合硅胶柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2, V/V/V); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。理论板数按黄芩苷峰计应不低于 2 500。

2.3.2 溶液制备

取黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 60 μg 的溶液,即得对照品溶液。精密量取本品 2.5 mL,置 25 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。精密量取缺黄芩的阴性样品溶液 2.5 mL,依法制备阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性考察:分别精密吸取 2.3.2 项下 3 种溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定。结果样品中黄芩苷色谱峰峰形良好,且阴性对照无明显干扰。色谱图见图 2。

线性关系考察:分别精密吸取质量浓度为 855.93 μg/mL 的对照品贮备液适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为 6.85, 171.19, 342.37, 513.56, 684.75, 855.93 μg/mL 的溶液,按拟订色谱条件进样测定。以对照品峰面积 (Y) 为纵坐标、质量浓度 (X, μg/mL) 为横坐标绘制标准曲线,得黄芩苷回归方程 $Y = 32\,245X - 288\,027$, $r^2 = 0.999\,4$ ($n = 6$)。结果表明,黄芩苷质量浓度在 6.85 ~ 855.9 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取质量浓度为 0.171 2 mg/mL 的黄芩苷对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定峰面积。结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 1.60% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 20200209)样品 6 份,依法平行制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果的 RSD 为 0.13% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于配制后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时进样,测定其峰面积。结果黄芩苷峰面积的 RSD 为 1.98% ($n = 7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品 1.25 mL,分别精密加入黄芩苷对照品适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,并计算回收率。结果见表 1。

表1 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 (%)
1.25	0.712 5	0.354 5	1.064 4	99.27		
1.25	0.712 5	0.354 5	1.071 2	101.18		
1.25	0.712 5	0.354 5	1.071 3	101.21		
1.25	0.712 5	0.709 1	1.427 8	100.87		
1.25	0.712 5	0.709 1	1.433 5	101.68	101.49	1.06
1.25	0.712 5	0.709 1	1.436 0	102.03		
1.25	0.712 5	1.063 6	1.793 0	101.59		
1.25	0.712 5	1.063 6	1.803 7	102.59		
1.25	0.712 5	1.063 6	1.807 7	102.97		

耐用性试验:取样品(批号为 20200209),依法制备供试品溶液,改变拟订色谱条件中的测定波长为 (280 ± 2) nm,柱温为 (40 ± 5) °C,测定含量。结果见表 2。可见, HPLC 法测定黄芩苷时,波长、柱温小的变动时耐用性合适,满足系统适应性要求,方法可靠。

表2 耐用性试验结果

项目	色谱条件	黄芩苷含量(mg/mL)			RSD (%)
		1	2	$\bar{X}$	
波长	280 nm	0.572 9	0.574 4	0.573 7	
	282 nm	0.574 5	0.561 9	0.568 2	0.88
	278 nm	0.573 0	0.575 1	0.574 0	
柱温	40 °C	0.572 9	0.574 4	0.573 7	
	45 °C	0.574 0	0.574 1	0.574 1	1.04
	35 °C	0.559 5	0.574 6	0.567 1	

2.3.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 20200224, 20200225, 20200226)样品,依法制备供试品溶液,测得样品中黄芩苷含量分别为 1.10, 1.14, 1.18 mg/mL, 平均 1.14 mg/mL。

3 讨论

3.1 定性鉴别药材选择

采用 TLC 法对清肺排毒合剂中的桂枝、麻黄、黄芩进行定性鉴别,斑点分离清晰,阴性对照无干扰,专属性强,重复性好,可作为清肺排毒合剂有效的定性鉴别方法。本研究中,对桂枝、麻黄、黄芩均建立了3种不同展开系统^[3-5],如桂枝薄层展开系统石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(17:3, V/V)、石油醚(30~60℃)-乙酸乙酯(17:3, V/V)、正己烷-乙醚-冰乙酸(5:5:0.1, V/V/V);麻黄薄层展开系统三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20:5:0.5, V/V/V)、乙醇-浓氨试液(10:0.5, V/V)、三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20:3.5:0.5, V/V/V);黄芩薄层展开系统乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1, V/V/V/V)、乙酸乙酯-甲醇-甲酸-水(8:1:1:1, V/V/V/V)、乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1, V/V/V),斑点均较清晰,易于区分,验证了 TLC 鉴别的可靠性,故纳入质量标准。

曾考察白术、甘草、陈皮、泽泻、款冬、紫菀的 TLC,其中白术、甘草、陈皮阴性有干扰,故未列入质量标准;泽泻、款冬、紫菀未检出相应斑点,未纳入质量标准。考虑泽泻主要药用成分23-乙酰泽泻醇B(脂溶性成分)水溶性较差,而该合剂制备工艺中提取溶剂为水,会导致其提取率较低;另外,23-乙酰泽泻醇B稳定性差,遇热易转化成泽泻醇B和24-乙酰泽泻醇A,最终转化成泽泻醇A^[6]。款冬的主要成分款冬酮、紫菀的主要成分紫菀酮均为脂溶性成分,用水煎煮提取率较低,紫菀酮水溶性较差,在水中易析出,离心除杂或醇沉除杂可将大部分紫菀酮除去(损失80%以上)^[7]。

3.2 含量测定成分选择

清肺排毒合剂中主要药味黄芩具有清热燥湿、泻火解毒等功效,含有黄酮类、萜类、酚酸类、苯乙醇、氨基酸、甾醇、挥发油、多糖、微量元素等多种化学成分^[8]。其中,含量较高的黄酮类成分黄芩苷是黄芩发挥功效的主要活性成分,具有抗菌、抗病毒、抗炎、解热、镇痛、清除氧自由基、抗氧化、抗肿瘤、保护心脑血管及神经元、保肝、降糖调脂、抗抑郁等药理作用^[9]。黄芩苷能抑制病毒复制、保护宿主,发挥抗病毒作用;可明显延长流感病毒感染小鼠的存活时间,对小鼠肺内的流感病毒有一定清除作用,能降低肺内流感病毒的血凝滴度和感染力,减轻小鼠肺内的炎性病变^[10-11]。试验证明,黄芩苷有抗肺炎衣原体和保护细胞作用^[12];同时,可抑制中枢发热介质前列腺素E₂(PGE₂)和cAMP的生成发挥解热作用,抑制白细胞内白三烯C₄、白三烯B₄的生物合成及fMLP激发的白细胞内Ca²⁺升高,发挥抗炎作用^[13-14]。综合考虑,选择黄芩苷作为清肺排毒合剂含量测定控制指标。

3.3 色谱条件选择

含量测定项下以黄芩苷为指标,直接量取清肺排毒合剂,用纯化水稀释制备供试品溶液,方法简单、快捷、环保、准确^[3,15];在选择流动相时,参考2015年版《中国药典(一部)》黄芩含量测定项下的色谱条件,采用甲醇-水-磷酸(47:53:0.2, V/V/V)作为流动相。结果,黄芩苷分离度好,杂质峰无干扰,峰形良好。

3.4 方法评价

根据3批清肺排毒合剂的指标含量测定结果,考虑饮片的差异性、生产过程中的波动因素及制剂的稳定性,将样品中指标含量的平均值下调20%,初步拟订清肺排毒合剂中黄芩苷的含量不低于0.9 mg/mL。

参考文献:

- [1] 国家卫生健康委员会办公厅,国家中医药管理局办公室. 关于推荐在中西医结合救治新型冠状病毒感染的肺炎中使用“清肺排毒汤”的通知[EB/OL]. (2020-02-07) [2020-02-20]. https://mp.weixin.qq.com/s/_PceHDFnRf8_T5g0JnPF6A.
- [2] 国家中医药管理局. 中医药有效方剂筛选研究取得阶段性进展[EB/OL]. (2020-02-06) [2020-02-20]. <https://mp.weixin.qq.com/s/GLStx8XiB78tKv0cLDeRuw>.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中医药科技出版社,2015:301.
- [4] 杨玉霞,刘竞研,于秀华,等. 活血壮筋胶囊质量标准研究[J]. 特产研究,2014,36(2):58-62.
- [5] 朱洁. 行气利水合剂的制备工艺和质量控制研究[D]. 苏州: 苏州大学,2017.
- [6] 刘德文,邓哲,陈莎,等. 泽泻饮片标准汤剂的制备及质量评价[J]. 中草药,2019,50(4):860-867.
- [7] 谈静,盛蓉,宋英,等. 咳喘口服液中紫菀的提取工艺研究[J]. 中成药,2008,30(11):1707-1708.
- [8] 张晓娟,吕勃川. 黄芩研究新进展[J]. 中医药学报,2017,45(1):96-99.
- [9] 张艳丽,王聪,朱雷蕾,等. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 河南中医,2019,39(9):1450-1454.
- [10] 辛文好,宋俊科,何国荣. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志,2013,22(6):647-659.
- [11] 初正云,初明,滕宇. 黄芩苷体内抗流感病毒作用[J]. 中国中药杂志,2007,32(22):2413-2415.
- [12] 邝枣园,吴伟,黄衍寿,等. 黄芩苷抗肺炎衣原体的研究[J]. 中国微生态学杂志,2005,17(2):87-88.
- [13] 赵红艳,张璠,范书铎,等. 黄芩苷对发热大鼠下丘脑PGE₂和cAMP含量的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2002,18(2):139-141.
- [14] 侯艳宁,朱秀媛,程桂芳. 黄芩苷的抗炎机理[J]. 药学报,2000,35(3):161-164.
- [15] 王庆芬,倪晓霞,李杰,等. 高效液相色谱法同时测定枇杷叶口服液中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量[J]. 中国药业,2015,24(16):93-95.

(收稿日期:2020-03-10;修回日期:2020-06-06)