

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.03.014

热毒宁口服液质量标准研究*

任莹¹, 李大刚¹, 王虎¹, 刘静², 张宗鹏^{2△}

(1. 安徽省太和县中医院, 安徽 阜阳 236600; 2. 天津药物研究院有限公司, 天津 300193)

摘要:目的 建立热毒宁口服液的薄层鉴别方法及含量测定的高效液相色谱法。方法 采用薄层鉴别法对金银花、大青叶、柴胡和甘草进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定连翘苷含量, 色谱柱为岛津 Wonda Cract ODS-2 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(30:70, V/V), 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 277 nm。结果 金银花、大青叶、柴胡和甘草的薄层色谱斑点清晰, 阴性对照无干扰; 连翘苷质量浓度在 0.006 63~0.221 00 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 99$), 平均加样回收率为 104.45%, RSD 为 0.79% ($n=9$)。结论 该方法专属性、准确性、耐用性、重复性均符合方法学要求, 可用于热毒宁口服液的质量控制。

关键词:热毒宁口服液; 薄层鉴别; 高效液相色谱法; 金银花; 大青叶; 柴胡; 甘草; 连翘苷

中图分类号: R932; R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)03-0049-04

Quality Standard of Reduning Oral Liquid

REN Ying¹, LI Dagang¹, WANG Hu¹, LIU Jing², ZHANG Zongpeng²

(1. Taihe County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fuyang, Anhui, China 236600; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin, China 300193)

Abstract: **Objective** To establish a thin layer chromatography(TLC) method and the content determination of phillyrin in Reduning Oral Liquid. **Methods** TLC method was used for qualitative identification of *Flos Lonicerae*, *Folium Isatidis*, *Radix Bupleuri*, *Radix Glycyrrhizae*. HPLC method was used for content determination of phillyrin in the preparation, the chromatographic column was Wonda Cract ODS-2 column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(30:70, V/V), the flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 277 nm. **Results** The TLC spots of *Flos Lonicerae*, *Folium Isatidis*, *Radix Bupleuri*, *Radix Glycyrrhizae* were clear and the negative control showed no interference. Phillyrin showed a good linear relationship with the peak area in the range of 0.006 63-0.221 00 mg/mL($r=0.999\ 99$). The average recovery of phillyrin was 104.45%, and the RSD was 0.79% ($n=9$). **Conclusion** The specificity, precision, stability and reproducibility of the method comply with the requirements of methodology, which can be used for quality control of Reduning Oral Liquid.

Key words: Reduning Oral Liquid; TLC; HPLC; *Flos Lonicerae*; *Folium Isatidis*; *Radix Bupleuri*; *Radix Glycyrrhizae*; phillyrin

热毒宁口服液是省级名中医丁超主任医师根据中医理论制订的临床经验方, 用于治疗风温肺热病风邪犯

*基金项目: 国家科技重大专项[2015ZX09501004-002-003]。

第一作者: 任莹, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为制剂分析及质量控制, (电子信箱)jyyuniteforever@126.com。

△通信作者: 张宗鹏, 男, 大学本科, 研究员, 研究方向为新药安全性评价, (电子信箱)zhangzp@tjipr.com。

参考文献

- [1] MA YX, JI JM, LI G, et al. Effects of donepezil on cognitive functions and the expression level of β -amyloid in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease[J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2018, 15(2): 1875-1878.
- [2] 姚伟梅, 王惠琴. 盐酸多奈哌齐片联合巴氯合剂治疗老年性痴呆的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(20): 1863-1865.
- [3] GHOSH S, JANA K, GANGULY B. Revealing the mechanistic pathway of cholinergic inhibition of Alzheimer's disease by donepezil: a metadynamics simulation study[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019, 21(25): 13578-13589.
- [4] 许炜, 陈茜, 顾虹. 一种多奈哌齐双羟茶酸盐新的制备方法: CN108976163A[P]. 2018-12-11.
- [5] ABDULRAHEEM A, MUSTAFA S, AL-SAFFAR N, et al. Detection of bacterial endotoxin in drinking tap and bottled water in Kuwait[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, 184(12): 7323-7328.
- [6] 刘琦, 陆益红. 氟维司群细菌内毒素检查方法学研究[J]. *药学研究*, 2014, 33(12): 696-698.
- [7] 杨赞昀, 胡宇驰, 周建平, 等. 胆酸细菌内毒素检查方法的建立[J]. *中国药业*, 2013, 22(23): 37-39.
- [8] 公伟, 王建东. 丁酸氯维地平原料药细菌内毒素检查方法的建立[J]. *海峡药学*, 2015, 27(10): 41-43.
- [9] 吴露露, 刘洋, 刘琦, 等. 硼替佐米细菌内毒素检查方法学研究[J]. *药学研究*, 2014, 33(4): 210-212.
- [10] 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: 154-157.
- [11] GREIG SL. Memantine ER/Donpezil: A Review in Alzheimer's Disease[J]. *CNS Drugs*, 2015, 29(11): 963-970.
- [12] 晏成倩, 黄梅梅, 王红平, 等. 一种难溶性原料药细菌内毒素检查方法的建立[J]. *中国药师*, 2018, 21(2): 365-368.

(收稿日期: 2020-03-13; 修回日期: 2020-07-28)

肺证,疗效显著^[1]。其由金银花、连翘、大青叶等6味药材组方,具有清热解毒、调和营卫、辛凉透表、益气 and 胃功效,主治高热烦躁、高热抽搐、头痛身痛、急性咽炎、扁桃体炎、流感肺炎等。方中连翘为君药,清热解毒,消肿散结,疏散风热。现代药理研究表明,连翘苷具有显著的抑菌和抗炎活性^[2-3],能抑制小胶质细胞活化产生的炎症反应^[4],通过抑制肝细胞的凋亡在酒精性肝损伤中发挥保护作用^[5],故优选连翘饮片的含量成分连翘苷作为质量控制指标。本研究中对处方各药味进行了定性鉴别,建立了热毒宁口服液中金银花、大青叶、柴胡、甘草的薄层鉴别方法及测定连翘苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-40D型高效液相色谱仪(PDA 极谱阵列检测器,株式会社岛津研究所);Ultimate3000型高效液相色谱仪(紫外检测器,赛默飞世尔科技有限公司);XSE105DU型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为十万分之一);KQ-300DE型超声清洗仪器(昆山市超声仪器有限公司,功率为300 W,频率为40 kHz);硅胶G板(青岛海洋化工厂分厂);聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);ZF-2型三用紫外分析仪(上海安亭电子仪器厂)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号为110753-201817,纯度为96.8%),靛玉红对照品(批号为110717-201805,纯度为99.6%),柴胡对照药材(批号为120992-201509),连翘苷对照品(批号为110821-201816,纯度为95.1%),甘草对照药材(批号为120904-201620),均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈、甲醇均为色谱纯(美国天地有限公司);水为超纯水,其余试剂为分析

纯;热毒宁口服液(太和县中医院医院制剂,批号分别为20042001,20042201,20042401);缺味阴性样品由实验室自制。

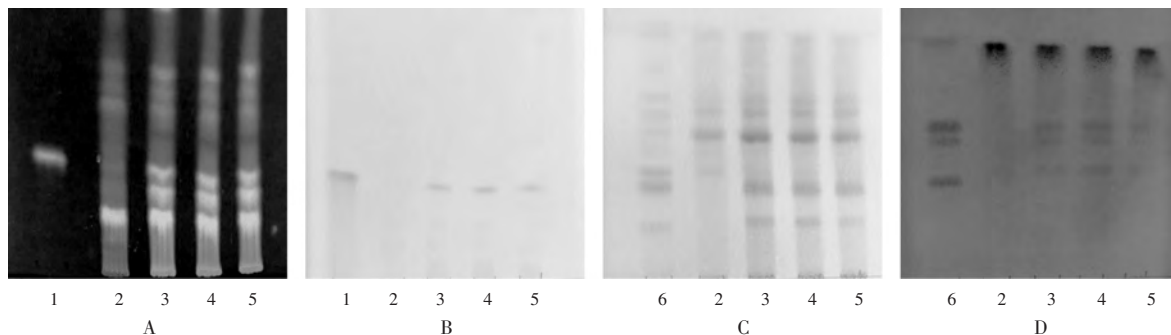
2 方法与结果

2.1 薄层色谱定性鉴别

金银花^[6-9]:取样品溶液1 mL,加乙醇2 mL^[7]⁵⁴⁴,摇匀,作为供试品溶液。按样品制备工艺制备缺金银花的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备缺金银花的阴性对照品溶液。另取绿原酸对照品,加乙醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,作为对照品溶液。分别吸取上述溶液各1~2 μ L,点于同一聚酰胺薄膜上,以乙酸乙酯-甲醇-甲酸(8:1:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与绿原酸对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。详见图1 A。

大青叶^[10-11]:取样品溶液20 mL,加乙醚提取2次,每次20 mL,保存水液,待用,合并乙醚液,蒸干,残渣加三氯甲烷1 mL使溶解,作为供试品溶液。再按样品制备工艺制备缺大青叶的阴性样品,按前述方法平行制备缺大青叶的阴性对照品溶液。取靛玉红对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。分别吸取上述溶液各10 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(3:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,日光下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图1 B。

柴胡^[12]:取上述大青叶鉴别项下的水液,用水饱和和正丁醇萃取2次,每次20 mL,合并正丁醇液,用氨试液40 mL清洗1次,弃去氨试液,再以正丁醇饱和水洗2次,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。再按样品制备工艺制备缺柴胡的阴性



1. 对照品溶液 2. 阴性对照品溶液 3-5. 供试品溶液 6. 对照药材溶液
A. 金银花 B. 大青叶 C. 柴胡 D. 甘草

图1 薄层色谱图

1. reference solution 2. negative reference solution 3-5. test solution 6. reference material solution
A. *Flos Lonicerae* B. *Folium Isatidis* C. *Radix Bupleuri* D. *Radix Glycyrrhizae*

Fig. 1 TLC chromatograms

样品,按供试品溶液制备方法制备缺柴胡的阴性对照品溶液。取柴胡对照药材 0.5 g,加甲醇 20 mL,超声处理(功率为 300 W,频率为 40 kHz) 10 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。分别吸取上述溶液各 10 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-乙醇-水(12:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液,60 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1 C。

甘草:取样品溶液 30 mL,加乙醚提取 2 次,每次 30 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。再按样品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备缺甘草的阴性对照品溶液。取甘草对照药材 1 g,加甲醇 80 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,加水 40 mL 使溶解,用乙酸乙酯提取 3 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为对照药材溶液。分别吸取上述对照药材溶液 5 μ L,供试品溶液、阴性对照品溶液各 10 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果供试品溶液色谱在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1 D。

2.2 高效液相色谱法测定连翘苷含量

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:岛津 WondaCract ODS-2 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(30:70, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:277 nm;进样量:10 μ L。理论板数按连翘苷峰计不低于 3 000。

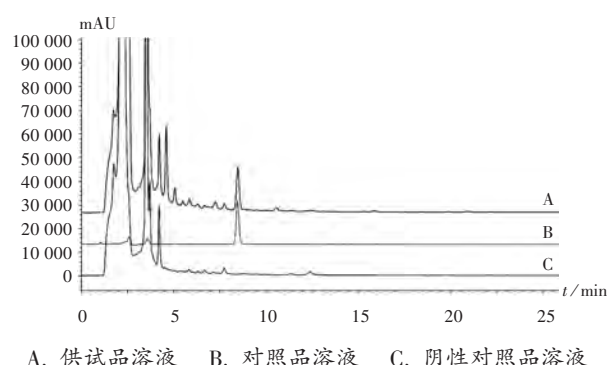
2.2.2 溶液制备

取连翘苷对照品适量,精密称定,置容量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为每 1 mL 含 26 μ g 的溶液,即得对照品溶液。精密量取样品溶液 2 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取滤液,即得供试品溶液。按热毒宁口服液的制备工艺制备缺连翘的阴性样品,照供试品溶液制备方法制备缺连翘的阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

阴性干扰试验:精密吸取 2.2.2 项下溶液各 10 μ L,注入高效液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定。结果供试品溶液中的连翘苷峰分离度良好,阴性对照品溶液色谱中未见连翘苷干扰峰。详见图 2。

线性关系考察:精密量取质量浓度为 0.442 mg/mL 的对照品溶液,用甲醇逐级稀释成 0.221 0, 0.044 2,



A. 供试品溶液 B. 对照品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

A. Test solution B. Reference solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

0.026 52, 0.013 26, 0.006 63 mg/mL 系列质量浓度的连翘苷对照品溶液,精密吸取上述对照品溶液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以连翘苷的峰面积(X)为横坐标、质量浓度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.350 4 \times 10^{-7} X - 0.000 929 25$, $r = 0.999 99$ ($n = 5$)。结果表明,连翘苷质量浓度在 0.006 63 ~ 0.221 00 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取质量浓度为 26.52 μ g/mL 的同一对照品溶液适量,连续进样 5 次。结果连翘苷峰面积的 RSD 为 0.96% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 20042401)6 份,依法制备供试品溶液,分别进样测定。结果连翘苷峰面积的 RSD 为 1.80% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 20042401),依法制备供试品溶液,于配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时分别精密进样 10 μ L,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果连翘苷峰面积的 RSD 为 1.90% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量为 0.663 6 mg/mL 的样品 9 份,各 1 mL,平行 3 份,3 个水平,按 75%, 100%, 125% 浓度分别加入连翘苷对照品,依法制备供试品溶液,分别进样 10 μ L,按 2.2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,每批次平行制备 2 份,按 2.2.1 项下色谱条件测定。结果批号为 20042001, 20042201, 20042401 的样品中连翘苷含量分别为 0.579 3, 0.554 6, 0.651 1 mg/mL ($n = 2$)。

3 讨论

3.1 薄层鉴别

金银花素有中药中的抗生素之美誉^[13],具有清热解毒、疏散风热之功效,用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒

表1 连翘苷加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery tests of phillyrin($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.663 6	0.331 5	1.005 4	103.11		
0.663 6	0.331 5	1.006 8	103.53		
0.663 6	0.331 5	1.011 2	104.86		
0.663 6	0.663 0	1.352 9	103.97		
0.663 6	0.663 0	1.365 2	105.82	104.45	0.79
0.663 6	0.663 0	1.355 7	104.39		
0.663 6	0.994 5	1.709 4	105.16		
0.663 6	0.994 5	1.704 2	104.64		
0.663 6	0.994 5	1.703 3	104.54		

血痢、风热感冒、温病发热。现代药理学研究表明,金银花提取物及其所含的化学成分具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化、保肝、抗肿瘤等多种药理活性^[14]。常规治疗基础上加用金银花口服液,可显著改善新型冠状病毒肺炎患者发热、乏力、咳嗽的症状,减轻肺部病变,改善呼吸功能,对病毒核酸转阴也显示出良好的改善趋势^[15]。方中大青叶有良好的抗病毒活性,对甲型流感病毒、乙型脑炎病毒、腮腺炎病毒等均有很好的抑制作用^[16];柴胡性凉,味苦,入肝胆经,用于治疗寒热往来、胸满肋痛、口苦耳聋等证,具有镇静、镇痛、降温、镇咳、抗炎、保肝、抗肿瘤、降血压、抑制由组胺和5-羟色胺引起的血管通透性增加等作用^[17];甘草性平,味甘,补脾益气,清热解毒,祛痰止咳,具有增强免疫及抗炎作用^[18-19]。

3.2 色谱条件优化

热毒宁口服液中连翘苷的含量测定依据2015年版《中国药典(一部)》^[7]和文献[20-22]中连翘的含量测定方法,适当调整,最终确定了测定连翘苷含量的色谱条件。首先,进行全波长扫描,取连翘苷对照品溶液注入高效液相色谱仪(PDA检测器)检测,记录连翘苷的色谱图,结合参考文献,将检测波长定为277 nm。并在此基础上对柱温(25, 30, 35℃)、流速(0.9, 1.0, 1.1 mL/min)、色谱柱(大连依利特、赛默飞、岛津)、不同比例流动相进行了考察,结果显示该方法用于测定热毒宁口服液中连翘苷的含量耐用性好。

3.3 方法评价

本研究中建立的热毒宁口服液中金银花、柴胡、大青叶、甘草的薄层鉴别方法和测定连翘苷含量的高效液相色谱法,专属性、耐用性、重复性、准确性均较好,可为热毒宁口服液的质量控制提供依据。

参考文献

[1] 丁超,李乔,卢家胜,等.热毒宁口服液治疗风温肺热病风热犯肺证30例[J].河南中医,2017,37(9):1613-1615.

- [2] 张俊顺,骆嘉原,姜喆卉,等.连翘苷的提取工艺优化及其抑菌活性[J].现代食品科技,2020,36(7):193-201.
- [3] 王婷婷,张燕,杨志敏,等.连翘及连翘叶抑菌抗炎活性及其主要化学成分研究[J].中国药物与临床,2019,19(14):2380-2381.
- [4] 王越,赵鸿飞,林创鑫,等.连翘苷对LPS刺激的BV2小胶质细胞炎性反应的抑制作用[J].中风与神经疾病杂志,2016,33(4):338-341.
- [5] 刘银华,戚之琳,徐国祥,等.连翘苷对酒精性肝损伤的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(1):6-9.
- [6] 许春燕,刘希望,杨亚军,等.银翘蓝芩口服液薄层色谱鉴别方法研究[J].动物医学进展,2015,36(11):40-43.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [8] 刘佳,韦巧玲.金葛感冒颗粒质量标准研究[J].中国民族民间医药,2018,27(9):14-16.
- [9] 许春燕.银翘蓝芩口服液的质量标准及靶动物安全性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2016.
- [10] 杨武宁,严明,孙舒放,等.兽用清热散中大青叶的薄层鉴别方法研究[J].畜牧业环境,2020,36(7):81-82.
- [11] 施敏,管敏.上感合剂质量标准研究[J].中国药业,2019,28(3):42-45.
- [12] 郝哲,张建帮,李晓明,等.自拟板柴口服液质量标准改善的研究[J].实用医药杂志,2018,35(11):1025-1028.
- [13] 邹晓华,戴安印,何伟康,等.感冒热毒清合剂质量标准研究[J].中国药业,2016,25(7):48-52.
- [14] 王亚丹,杨建波,戴忠,等.中药金银花的研究进展[J].药物分析杂志,2014,34(11):1928-1935.
- [15] 张又莉,雷亮,徐勇,等.金银花口服液治疗新型冠状病毒肺炎80例临床疗效分析[J].中国药业,2020,29(9):23-26.
- [16] 王腾宇,刘斯琪,丁鹏敏,等.金莲花汤抗流感病毒活性研究[J].中国现代中药,2020,22(2):202-206.
- [17] 史青,聂淑琴,黄璐琦.柴胡属植物化学成分及药理研究新进展[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(5):53-56.
- [18] 武晏屹,田硕,雷会霞,等.基于数据挖掘的中药增强机体免疫功能用药规律分析[J].中药药理与临床,2020,36(1):41-45.
- [19] 智信,陈晓,苏佳灿.甘草次酸药理作用研究进展[J].现代中西医结合杂志,2019,28(25):2847-2850.
- [20] 黄强燕.多波长HPLC法同时测定桑菊银翘散中6种成分的含量[J].海峡药学,2017,29(11):61-64.
- [21] 罗云,赵国巍,梁新丽,等.银翘散水煎液煎煮过程化学特征图谱及指标成分含量变化规律的研究[J].中国中药杂志,2016,41(1):60-64.
- [22] 王姝君,李石飞,张立伟.连翘含量测定方法优化及青(老)翘质量控制标准建立探讨[J].中国中药杂志,2018,43(15):3157-3162.

(收稿日期:2020-06-19;修回日期:2020-08-21)