

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.05.019

清热止痢合剂质量标准提升研究

董臣林¹, 姜迪¹, 李拓新¹, 肖薇^{2△}

(1. 北京市临床药学研究所, 北京 100035; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010)

摘要:目的 提升清热止痢合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对清热止痢合剂中的白头翁、儿茶、关黄柏、黄连、黄芩进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷的含量。结果 白头翁、儿茶、关黄柏、黄连、黄芩 TLC 特征斑点清晰,分离度好,专属性强;没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷的质量浓度分别在 4.557 1~41.014 3 μg/mL, 3.450 0~31.050 0 μg/mL, 10.907 1~98.164 3 μg/mL, 18.500 0~166.500 0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 4$),平均加样回收率分别为 100.43%, 100.71%, 98.28%, 100.65%, RSD 分别为 0.86%, 1.60%, 0.84%, 1.16% ($n=6$)。结论 该方法准确可靠,重复性好,可用于清热止痢合剂的质量控制。

关键词:清热止痢合剂;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准;含量

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)05-0072-04

Improvement of Quality Standard of Qingre Zhili Mixture

DONG Chenlin¹, JIANG Di¹, LI Tuoxin¹, XIAO Wei²

(1. Institute of Clinical Pharmacy of Beijing Municipal Health Bureau, Beijing, China 100035; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, China 100010)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Qingre Zhili Mixture. **Methods** Thin-layer chromatography(TLC) method was used for qualitative identification of Qingre Zhili Mixture. High-performance liquid chromatography(HPLC) method was used for the content determination of gallic acid, puerarin, paeoniflorin and baicalin in this preparation. **Results** The TLC spots of *Radix Pulsatillae*, *Acacia catechu*, *Cortex Phellodendri*, *Rhizoma Coptidis* and *Radix Scutellariae* were clear, the separation was good, and the specificity was strong. Gallic acid, puerarin, paeoniflorin and baicalin showed good linear relationships in the ranges of 4.557 1-41.014 3 μg/mL, 3.450 0-31.050 0 μg/mL, 10.907 1-98.164 3 μg/mL and 18.500 0-166.500 0 μg/mL ($r \geq 0.999 4$), respectively. The average recoveries were 100.43%, 100.71%, 98.28% and 100.65% with RSDs of 0.86%, 1.60%, 0.84% and 1.16% ($n=6$).

Conclusion This method is accurate, reliable and reproducible, which can be used for the quality control of Qingre Zhili Mixture.

Key words: Qingre Zhili Mixture; TLC; HPLC; quality standard; content

清热止痢合剂为首都医科大学附属北京中医医院的院内制剂,由白头翁、地榆、儿茶、关黄柏、黄连、黄芩、葛根、白芍等多味中药组方,具有清热解毒、凉血止痢功效,临床用于湿热毒邪积滞肠腑证,症见腹痛、腹泻、肛门灼热、身热、口苦口黏。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的白头翁、儿茶、关黄柏、黄连、黄芩进行定性鉴别^[1-3],采用高效液相色谱(HPLC)法测定没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷的含量,为其质量控制提供参考^[4-12]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

L-2000 型高效液相色谱仪,包括 L-2455 DAD 型检测器、L-2200 Cooling Unit 型自动进样器、L-2130 型四元泵(株式会社日立制作所);CPA225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司,精度十万分之一);SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);KQ2200DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 200 W,频率为 40 kHz);JY02S 型紫外

第一作者:董臣林,男,硕士研究生,研究实习员,研究方向为药物制剂,(电子信箱)1160463650@qq.com。

△通信作者:肖薇,女,大学本科,主任药师,研究方向为中药制剂制备与传承,(电子信箱)ycb_6652@163.com。

[7] 陈前锋,邓小艳,祝慧凤. HPLC 法测定不同产地党参中党参炔苷和丁香苷的含量[J]. 食品工业科技,2016,37(6):64-67.
[8] 宋丹,王峥涛,李隆云,等. 党参炔苷对胃溃疡模型大鼠胃黏膜损伤保护作用的研究[J]. 中国中医急症,2008,17(7):963-964.
[9] 杨静,苏强,刘恩荔,等. 不同产地党参苍术内酯Ⅲ和党参炔苷含量测定[J]. 山西医科大学学报,2010,41(8):698-702.
[10] 冯亚静,王晓霞,庄鹏宇,等. 党参的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(1):135-139.

[11] 胡春阳,戴迪,穆希琼,等. 以党参炔苷和紫丁香苷为指标成分的纹党与白条党的鉴别[J]. 时珍国医国药,2018,29(8):1882-1885.
[12] 李雪莹,魏运姣,何小龙,等. HPLC 法同时测定健儿膏中 8 种成分[J]. 中成药,2020,42(3):579-583.
[13] 胡涛. 不同生长年限与采收期川党参中主要成分含量的比较研究[J]. 药学研究,2017,36(10):571-574.

(收稿日期:2020-06-07)

分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司);BGZ-140型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试药

白头翁对照药材(批号为121615-201603),儿茶对照药材(批号为121397-201502),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-201212,纯度为86.7%),黄芩素对照品(批号为11595-201607,纯度为98.5%),汉黄芩素对照品(批号为111514-201304,纯度为93.3%),没食子酸对照品(批号为110831-201605,纯度为90.8%),葛根素对照品(批号为110752-201313,纯度为98.5%),芍药苷对照品(批号为110736-201337,纯度为94.9%),黄芩苷对照品(批号为110715-201318,纯度为98.5%),均购自中国食品药品检定研究院;清热止痢合剂(北京市临床药理学研究所,批号分别为201912007,201912008,201912010);甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);乙酸、甲酸、硫酸、甲苯(分析纯,北京市通广精细化工公司);乙醇、乙酸乙酯、异丙醇、正丁醇、乙醚(分析纯,北京化工厂);纯化水自制。

2 方法与结果

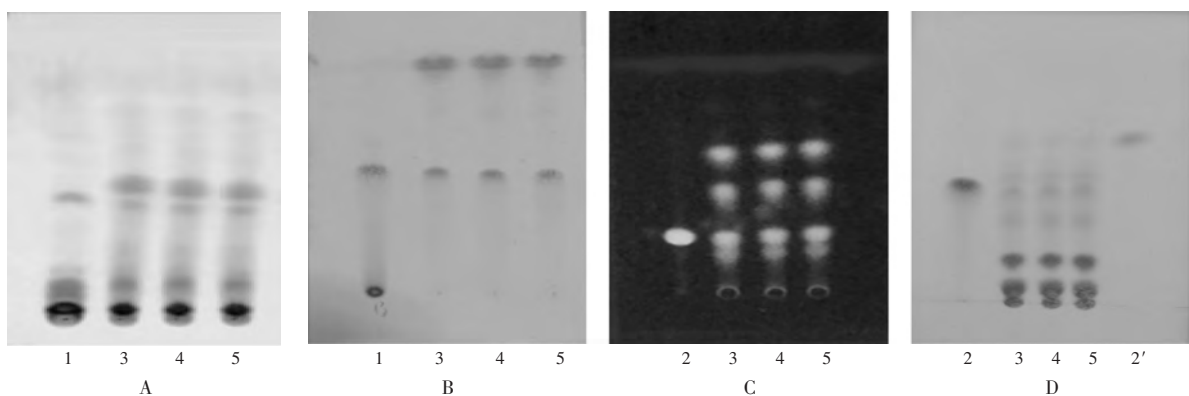
2.1 TLC鉴别

白头翁:取样品10 mL,加甲醇10 mL,超声处理(功率为200 W,频率为40 kHz)10 min,滤过,取续滤液作为供试品溶液。另取白头翁对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。照2015年版《中国药典(四部)》TLC法(附录VIB)试验,吸取上述2种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:2, V/V/V)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷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中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点。详见图1 A。

儿茶:取样品10 mL,加乙醚30 mL,超声处理(功率为200 W,频率为40 kHz)10 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,作为供试品溶液。另取儿茶对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。照2015年版《中国药典(四部)》TLC法(附录VIB)试验,吸取上述2种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(3:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷10%硫酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰。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。详见图1 B。

关黄柏、黄连:取样品10 mL,蒸干,加甲醇25 mL,超声处理(功率为200 W,频率为40 kHz)30 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取盐酸小檗碱对照品,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》TLC法(附录VIB)试验,吸取上述2种溶液各2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:0.5:1, V/V/V/V/V/V)为展开剂,置浓氨试液预饱和15 min的展开缸内,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,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点。详见图1 C。

黄芩:取样品10 mL,加乙酸乙酯-甲醇(3:1, V/V)的混合溶液30 mL,加热回流30 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,取上清液作为供试品溶液。取黄芩素对照品、汉黄芩素对照品,分别加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。照2015年版《中国药典(四部)》TLC法(附录VIB)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,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:3:1:2, V/V/V/V)为展开剂,预饱和30 min,展开,取出,晾干,喷5%三氯化铁乙



1. 对照药材溶液 2,2'. 对照品溶液 3-5. 供试品溶液
A. 白头翁 B. 儿茶 C. 关黄柏、黄连 D. 黄芩

图1 薄层色谱图

1. reference material solution 2,2'. reference solution 3-5. test solution

A. *Radix Pulsatillae* B. *Acacia catechu* C. *Cortex Phellodendri* and *Rhizoma Coptidis* D. *Radix Scutellariae*

Fig. 1 TLC chromatograms

醇溶液,置日光下检视。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。详见图1D。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%乙酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min时10%A→25%A,15~45 min时25%A→40%A,45~75 min时40%A→55%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:265 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷对照品适量,精密称定,分别置5 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至质量浓度为319,483,509,259 μg/mL的对照品贮备液,精密量取上述对照品贮备液适量,加甲醇定容,摇匀,制成质量浓度分别为45.57,34.50,109.07,185.00 μg/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液:精密量取样品1 mL,置具塞锥形瓶中,加甲醇稀释100倍,密塞,称定质量,超声提取(功率为220 W,频率为40 kHz)30 min,放冷,甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.2.2项下各溶液适量,按2.2.1项下色谱条件测定,色谱图见图2。结果各成分色

谱峰分离度均大于1.5,理论板数大于5 000,供试品溶液色谱峰与对照品溶液色谱峰保留时间基本一致。

线性关系考察:精密吸取混合对照品溶液0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,4.5 mL,分别置5 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录各成分峰面积。以质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,绘制各组分标准曲线,并计算回归方程和相关系数。结果见表1。

表1 各成分线性关系考察结果($n=6$)

Tab. 1 Linear relationship of each components($n=6$)

成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)
没食子酸	$Y=14\,071.9X-1\,083.5$	0.999 9	4.557 1~41.014 3
葛根素	$Y=16\,090.2X-4\,708.3$	0.999 9	3.450 0~31.050 0
芍药苷	$Y=501.4X-1\,633.9$	0.999 4	10.907 1~98.164 3
黄芩苷	$Y=7\,124.7X-14\,891.0$	0.999 8	18.500 0~166.500 0

检测限与定量限确定:取混合对照品溶液适量,倍比稀释,按2.2.1项下色谱条件连续进样,记录峰面积,当信噪比为3:1时为检测限,当信噪比为10:1时为定量限。结果没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷的检测限分别为0.060 8,0.046 0,0.727 1,1.233 3 μg/mL,定量限分别为0.182 3,0.138 0,2.181 4,3.700 0 μg/mL。

精密度试验:精密吸取混合对照品溶液10 μL,按2.2.1项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为0.72%,1.63%,1.65%,1.62%($n=6$),表明仪器精密密度良好。

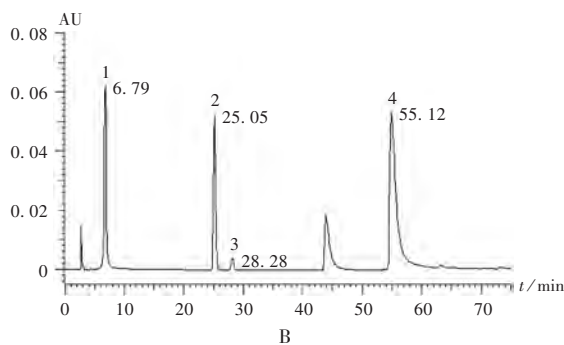
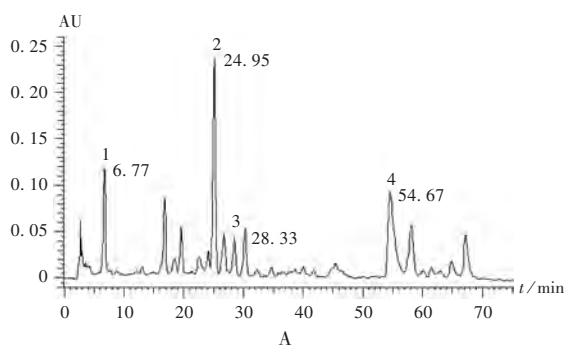
重复性试验:取同一批(批号为201912007)样品6份,依法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷含量的RSD分别为1.17%,2.43%,2.29%,1.68%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为201912007)样品6份,依法制备供试品溶液,分别于制备后0,3,6,12,24,48 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷峰面积的RSD分别为1.72%,2.29%,2.82%,1.88%($n=6$),表明供试品溶液在48 h内稳定。

加样回收试验:精密量取样品(批号为201912007)6份,各0.5 mL,分别加入样品中各成分含量为80%,100%,120%的混合对照品溶液适量,制备成低、中、高浓度的供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,计算各成分的回收率。结果见表2。

2.2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为201912007,201912008,201912010)样品,分别制备供试品溶液,各批次平行制



1. 没食子酸 2. 葛根素 3. 芍药苷 4. 黄芩苷

A. 供试品溶液 B. 混合对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. gallic acid 2. puerarin 3. paeoniflorin 4. baicalin

A. Test solution B. Mixed reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

表2 加样回收试验结果(n=6)
Tab. 2 Results of recovery tests(n=6)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
没食子酸	0.411 5	0.329 2	0.742 9	100.67	100.43	0.86
	0.411 5	0.329 2	0.746 6	100.79		
	0.411 5	0.411 5	0.820 5	99.39		
	0.411 5	0.411 5	0.821 4	99.61		
	0.411 5	0.493 8	0.907 1	100.36		
	0.411 5	0.493 8	0.908 9	100.73		
葛根素	0.974 9	0.779 9	1.782 9	103.60	100.71	1.60
	0.974 9	0.779 9	1.767 1	101.58		
	0.974 9	0.974 9	1.947 9	99.81		
	0.974 9	0.974 9	1.951 7	100.19		
	0.974 9	1.169 9	2.140 5	99.63		
	0.974 9	1.169 9	2.138 4	99.45		
芍药苷	6.186 8	4.949 4	11.002 6	97.30	98.28	0.84
	6.186 8	4.949 4	11.036 0	97.98		
	6.186 8	6.186 8	12.299 4	98.80		
	6.186 8	6.186 8	12.237 5	97.80		
	6.186 8	7.424 2	13.583 8	99.63		
	6.186 8	7.424 2	13.474 9	98.17		
黄芩苷	2.360 5	1.888 4	4.240 4	99.55	100.65	1.16
	2.360 5	1.888 4	4.231 9	99.10		
	2.360 5	2.360 5	4.763 5	102.00		
	2.360 5	2.360 5	4.768 2	101.10		
	2.360 5	2.832 6	5.219 1	100.92		
	2.360 5	2.832 6	5.208 7	100.55		

表3 样品含量测定结果(mg/mL, n=3)

Tab. 3 Results of content determination(mg/mL, n=3)

批号	没食子酸	葛根素	芍药苷	黄芩苷
201912007	0.822 9	1.949 7	12.373 6	4.721 0
201912008	0.830 1	1.977 8	12.485 9	4.382 9
201912010	0.827 8	2.010 0	12.445 6	5.055 9

备3份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,计算各成分含量。结果见表3。

3 讨论

本研究中通过筛选样品的提取方法、展开剂种类和溶剂比例等条件,最终确定了白头翁、儿茶、关黄柏、黄连、黄芩的TLC定性鉴别方法。样品的前处理分别考察不同溶剂比例、提取时间和稀释倍数对各指标成分检测结果的影响,发现100%甲醇提取30 min,稀释100倍

时,各指标成分分离度良好且有较好的响应值;考察了于235,250,265,275 nm波长处的吸收峰,当吸收波长为265 nm时,各指标成分均能出峰,且分离度较好;考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%乙酸水溶液、甲醇-0.05%乙酸水溶液等不同流动相系统和梯度洗脱条件,以各色谱峰峰形和分离度为指标进行比较,发现以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相时,各色谱峰分离度和峰形均良好,且基线平稳。最终确定了没食子酸、葛根素、芍药苷、黄芩苷的含量测定方法。

综上所述,通过对医院制剂清热止痢合剂的TLC鉴别方法和含量测定方法的建立,并进行方法学考察,完善并提升了清热止痢合剂的质量标准。

参考文献

- [1] 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,2015:57-59.
- [2] 吴艳蓉. 消炎止痒浸膏质量标准研究[J]. 中国药业,2020,29(5):127-129.
- [3] 徐媛,张瑞涛,刘梅,等. 复方肝康片质量标准研究[J]. 中国医药导报,2019,16(34):37-41.
- [4] 张元萍,唐娟. HPLC-QAMS法同时测定白芍配方颗粒中7种活性成分的含量[J]. 中国药师,2019,22(12):2317-2321.
- [5] 吕嘉苇,贺文达,王武静,等. HPLC法测定益气活血固肾颗粒中多指标成分的含量[J]. 中药材,2019,42(9):2096-2099.
- [6] 王子凌云,梁琨,李国文. HPLC法测定芩杏清热止咳颗粒中8种成分[J]. 中成药,2019,41(5):995-999.
- [7] 王玲娇,刘瑛,郑旭光,等. HPLC法同时测定柴胡安心胶囊中7种有效成分的含量[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(19):2399-2402.
- [8] 邱小玉,刘玉萍,刘焯,等. HPLC法同时测定茵栀黄口服液10种有效成分[J]. 中草药,2019,50(15):3648-3653.
- [9] 李佳慧,李清. UHPLC-DAD法同时测定清肺汤标准汤剂中7种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2020,37(2):152-156.
- [10] 刘文静,王子健,马杰,等. UPLC-MS/MS测定清热凉血方中5种成分的含量[J]. 中药材,2019,42(9):2108-2112.
- [11] 陈晓双,马静,费小凡,等. 金槐痔瘘合剂的质量标准提升及应用[J]. 中国药业,2020,29(3):44-46.
- [12] 谭霖,严华,张丽艳,等. 坤泰胶囊HPLC特征图谱及多成分含量测定方法的研究[J]. 药物分析杂志,2019,39(9):1673-1682.

(收稿日期:2020-05-06;修回日期:2020-08-16)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565
网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业官方网站在线投稿系统