

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.017

梨杷止咳合剂质量标准研究*

符冰¹, 刘锐锋^{1△}, 赵伟国¹, 王术玲², 巫柳岑²

(1. 广东省中山市人民医院, 广东 中山 528403; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立梨杷止咳合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中桑白皮、苦杏仁、枇杷叶进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸的含量,色谱柱为 Phenomenex R Luna C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.5%冰醋酸溶液(15:85, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 350 nm,柱温为 30℃,进样量为 10 μL。结果 桑白皮、苦杏仁、枇杷叶的 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸进样量分别在 0.080 1~1.601 4 μg 和 0.037 1~0.741 8 μg 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3.5%;平均加样回收率分别为 100.80% 和 97.73%, RSD 分别为 3.12% 和 3.83% (n=6)。结论 该方法操作简便,结果准确,可用于梨杷止咳合剂的质量控制。

关键词:梨杷止咳合剂;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

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0061-05

Quality Standard of Lipa Zhike Mixture

FU Bing¹, LIU Ruifeng¹, ZHAO Weiguo¹, WANG Shuling², WU Liucen²

(1. People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong, China 528403; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Lipa Zhike Mixture. **Methods** Thin-layer chromatography(TLC) was adopted

*基金项目:广东省中医药局面上科研项目[20191362]。

第一作者:符冰,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为中药质量标准及院内制剂开发,(电子信箱)591240536@qq.com。

△通信作者:刘锐锋,男,大学本科,主任药师,研究方向为医院药学及药事管理,(电子信箱)rf2005@126.com。

鉴别。结果色谱斑点清晰、分离度好,可为含有黄芪、三七的复方制剂的理化鉴别提供参考。

3.2 含量测定

前期基础研究发现,黄芪三七合剂可延缓模型大鼠肾纤维化进程,抑制肾小管上皮细胞转分化,并有一定抗氧化应激作用;同时研究证实,三七总皂苷中人参皂苷 Rg₁ 对糖尿病肾病模型大鼠肾功能指标具有一定改善作用^[4]。其机制是通过减少细胞自噬和活性氧的产生,抑制氧化应激途径,从而对醛固酮诱导致损的肾小管上皮细胞产生良好的保护作用^[5]。因此,人参皂苷 Rg₁ 是本方的主要有效成分之一,故选择人参皂苷 Rg₁ 作为本制剂质量控制的指标成分。试验过程中考察了处理样品的不同溶剂(甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇)对人参皂苷 Rg₁ 含量测定的影响。结果经 75% 甲醇处理后含量相对较高,同时易于滤过,故选用 75% 甲醇处理样品。此外,还考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水系统,结果以乙腈-水为流动相时,供试品溶液色谱峰峰形较好,分离度大于 1.5,理论板数大于 6000,拖尾因子在 0.95~1.10 之间。

3.3 方法评价

黄芪三七合剂临床主要用于治疗 3~4 期慢性肾脏病,具有益气养血、活血利水、健脾助运的功效,能使气

血健旺、瘀血消散,从而恢复部分肾脏功能。本试验中建立了黄芪三七合剂中君药黄芪,臣药三七、当归的定性鉴别及主要有效成分人参皂苷 Rg₁ 的含量测定方法,经方法学验证,所建立的方法精密度高,重复性好,稳定可靠,可用于黄芪三七合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 艾娜,谢席胜,王宝福,等. 黄芪三七复方对 CKD3 期患者肾功能及其生活质量的影响[J]. 西部医学,2014,26(11): 1445-1447.
- [2] 谢席胜,王宝福,王彦江,等. 黄芪三七合剂对原发性肾病综合征临床疗效观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2012, 13(5):417-419.
- [3] 张丽增,毕全喜,代云桃,等. 二次展开薄层层析法鉴别黄芪与三七的指标成分[J]. 山西大学学报(自然科学版),2007, 30(1):71-73.
- [4] 张丽娜,谢席胜,左川,等. 人参皂苷 Rg₁ 对糖尿病肾病大鼠 TNF-α、MCP-1 表达的影响[J]. 四川大学学报(医学版),2009,40(3):466-471.
- [5] WANG L, MAO N, TAN RZ, et al. Ginsenoside Rg₁ reduces aldosterone-induced autophagy via the AMPK/mTOR pathway in NRK-52E cells[J]. Int J Mol Med,2015,36(2):518-526.

(收稿日期:2020-04-23;修回日期:2020-09-25)

for the qualitative identification of *Cortex Mori*, *Semen Armeniacae Amarum* and *Folium Eriobotrya Japonica* in Lipa Zhike Mixture. High-performance liquid chromatography (HPLC) was adopted for the content determination of luteolin and 3,5-dicaffeoylquinic acid, the chromatographic column was Phenomenex R Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.5% glacial acetic acid solution (15 : 85, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 350 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of *Cortex Mori*, *Semen Armeniacae Amarum* and *Folium Eriobotrya Japonica* were clear and well separated without negative interference. The linear ranges of luteolin and 3,5-dicaffeoylquinic acid were 0.080 1 - 1.601 4 μg and 0.037 1 - 0.741 8 μg, respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3.5%. The average recoveries of luteolin and 3,5-dicaffeoylquinic acid were 100.80% and 97.73% with RSDs of 3.12% and 3.83% (n = 6), respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used for the quality control of Lipa Zhike Mixture.

Key words: Lipa Zhike Mixture; quality standard; TLC; HPLC

梨杷止咳合剂为中山市人民医院验方,由梨干、菊花、桑白皮、苦杏仁等8味中药制成,有清热去燥、润肺生津等功效,临床用于治疗肺燥咳嗽、喉痒干咳、久咳不止等症。周俊等^[1]对合剂中微生物限度进行了检查,并对桔梗、甘草、菊花进行薄层色谱(TLC)鉴别,但缺少含量测定项。本研究中拟对合剂中的桑白皮、苦杏仁、枇杷叶进行定性鉴别,并对菊花中木犀草苷及3,5-双咖啡酰基奎宁酸进行含量测定,为该合剂质量标准的建立提供参考。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(日本Shimadzu公司);WFH-201BJ型紫外可见投射反射仪(上海精科实业有限公司);聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂);硅胶薄层板(青岛海洋化工厂分厂);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司);点样用毛细管(华西医科大学仪器厂);MODEL HN1006型超声清洗器(中国华南超声设备厂);双槽层析缸(上海信谊仪器厂)。

1.2 试药

梨杷止咳合剂(批号分别为20181216, 20190415, 20190521),缺桑白皮、苦杏仁、菊花药材的阴性样品,均为广东省中山市人民医院制剂室自制;木犀草苷对照品(麦克林公司,批号为c805135,含量≥98%);3,5-双咖啡酰基奎宁酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为B21539,含量≥98%);绿原酸对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号为17101904,含量≥98%);枇杷叶(批号为190203)、菊花(批号为180901)、桑白皮(批号为180901)、甘草(批号为20180830)、北沙参(批号为20180903)、苦杏仁(批号为190201)、桔梗(批号为20180819)、梨干(批号为20190401)药材饮片均购自广州康圣药业有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

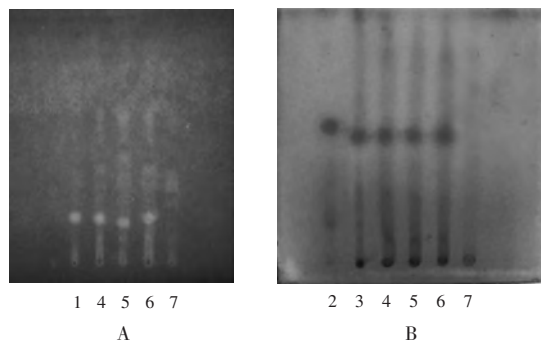
2 方法与结果

2.1 定性鉴别

桑白皮:取样品50 mL,加Na₂CO₃使之成为过饱和溶

液,超声(功率300 W,频率40 kHz,下同)处理20 min,离心,收集上清液,用稀盐酸调pH至1~2,静置30 min,滤过,滤液用50 mL乙酸乙酯萃取2次,合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,即得供试品溶液,平行制备3份。称取桑白皮对照药材2 g,同法制备对照药材溶液。取缺桑白皮药材的阴性样品50 mL,同法制备阴性对照品溶液。取十二烷基磺酸钠3 g、正丁醇6 mL、正庚烷2 mL,加水25 mL,搅拌溶解,放置24 h即得O/W微乳液^[2]。照2015年版《中国药典(四部)》通则0502“薄层色谱法”^[3]项下方法,分别吸取上述3种溶液各6 μL,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以上述微乳液为展开剂,展开,取出,自然晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。详见图1A。

苦杏仁、枇杷叶:取样品10 mL,采用大孔树脂分离纯化,用3倍柱体积的水及10%乙醇依次冲洗,弃去洗液;用80%乙醇清洗大孔树脂柱,洗脱液水浴蒸干,用1 mL甲醇溶解残渣,即得供试品溶液^[4],平行制备3份。



1. 桑白皮对照药材溶液 2. 苦杏仁对照药材溶液 3. 枇杷叶对照药材溶液 4-6. 供试品溶液 7. 阴性对照品溶液

A. 桑白皮 B. 苦杏仁、枇杷叶

图1 薄层色谱图

1. *Cortex Mori* reference material solution 2. *Semen Armeniacae Amarum* reference material solution 3. *Folium Eriobotrya Japonica* reference material solution 4-6. test solution 7. negative reference solution

A. *Cortex Mori* B. *Semen Armeniacae Amarum* and *Folium Eriobotrya Japonica*

Fig. 1 TLC chromatograms

称取苦杏仁对照药材 2 g, 置索氏提取器中, 加二氯甲烷 50 mL, 加热回流 2 h, 弃去二氯甲烷液, 药渣挥干, 加甲醇 30 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣加入 1 mL 甲醇溶解, 即得苦杏仁对照药材溶液; 取枇杷叶 10 g, 按苦杏仁对照药材溶液制备方法制得枇杷叶对照药材溶液。取缺苦杏仁、枇杷叶药材的阴性样品 2 mL, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502“薄层色谱法”^[3]项下方法, 分别吸取上述 4 种溶液各 4 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10, V/V/V/V)的下层溶液为展开剂, 展距约为 10 cm, 取出, 立刻用 0.8% 磷钼酸的 15% 硫酸乙醇溶液浸板, 加热到 105 $^{\circ}$ C 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处显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰。详见图 1 B。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex R Luna C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.5% 冰醋酸溶液(15:85, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 350 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2.2 溶液制备

称取木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸、绿原酸对照品适量, 精密称定, 置同一 50 mL 容量瓶中, 以 70% 甲醇定容, 摇匀, 配成木犀草苷质量浓度为 80.07 μ g/mL、3,5-双咖啡酰基奎宁酸质量浓度为 37.09 μ g/mL、绿原酸质量浓度为 64.56 μ g/mL 的混合对照品溶液。精密量取 4 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇 5 mL, 超声处理 5 min, 加甲醇定容, 摇匀, 取上清液 1 mL, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。按处方工艺去除菊花外的其他药材, 依法制备阴性样品, 并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性考察: 精密吸取 2.2.2 项下 3 种溶液各 10 μ L, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果木犀草苷峰保留时间为 25.7 min, 3,5-双咖啡酰基奎宁酸峰保留时间为 39.5 min; 木犀草苷分离度为 1.7, 理论板数为 21 000; 3,5-双咖啡酰基奎宁酸分离度为 5.4, 理论板数为 16 710; 基线分离良好, 均能与杂质分开, 阴性对照无干扰(绿原酸受阴性对照干扰较大, 不作为检测指标)。色谱图见图 2。

线性关系考察: 精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 1 mL, 分别进样 1, 2, 5, 10, 15, 20 μ L。以待测成分峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μ g)为横坐标进行线性回归, 得回归方程, 木犀草苷为 $Y_1 = 2\,568\,242.785 X_1 - 19\,971.392\,79$ ($R^2 = 0.999\,8$, $n = 6$), 3,5-双咖啡酰基奎宁酸为 $Y_2 = 1\,716\,451.385 X_2 - 25\,808.439\,86$ ($R^2 = 0.999\,8$, $n = 6$)。结果, 木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸进样量分别在 0.080 1~1.601 4 μ g 和 0.037 1~0.741 8 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果木犀草苷及 3,5-双咖啡酰基奎宁酸峰面积的 RSD 分别为 1.12% 和 1.01% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取样品(批号为 20190415), 依法制备供试品溶液, 室温下分别于 0, 2, 5, 8, 12, 24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸峰面积的 RSD 分别为 1.87% 和 1.88% ($n = 6$), 表明供试品溶液室温下放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 精密量取样品(批号为 20190415) 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 计算样品含量。结果木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸平均含量分别为 0.134 9, 0.827 8 mg/mL, RSD 分别为 3.40%, 3.00% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

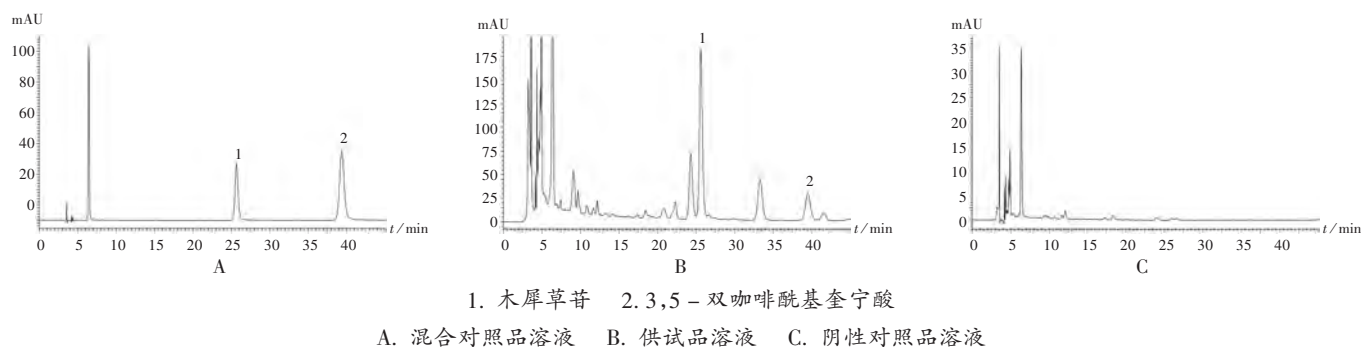


图 2 高效液相色谱图

1. luteolin 2. 3,5-dicaffeoylquinic acid

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

Fig. 2 HPLC chromatograms

加样回收试验:木犀草苷,精密量取样品 2 mL,共 6 份,加入混合对照品溶液 3.2 mL;3,5-双咖啡酰基奎宁酸,精密量取样品 2 mL,共 6 份,加入混合对照品溶液 4.5 mL。均按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样分析,计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 1 Results of recovery tests($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.269 8	0.165 6	0.256 2	0.166 9	0.518 6	0.326 9	97.11	96.64				
0.269 8	0.165 6	0.256 2	0.166 9	0.523 6	0.323 9	99.06	94.85				
0.269 8	0.165 6	0.256 2	0.166 9	0.522 6	0.340 8	98.67	104.97				
0.269 8	0.165 6	0.256 2	0.166 9	0.528 6	0.329 4	101.01	98.14	100.80	97.73	3.12	3.83
0.269 8	0.165 6	0.256 2	0.166 9	0.539 5	0.327 0	105.27	96.70				
0.269 8	0.165 6	0.256 2	0.166 9	0.535 4	0.324 3	103.67	95.09				

注:A 为木犀草苷,B 为 3,5-双咖啡酰基奎宁酸。

Note: A = luteolin, B = 3,5-dicaffeoylquinic acid.

2.2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 20181216,20190415,20190521)样品,按 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 2 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,计算样品含量和平均值。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(mg/mL, $n=2$)

Tab. 2 Results of content determination of samples(mg/mL, $n=2$)

批号	木犀草苷			3,5-双咖啡酰基奎宁酸		
	1	2	$\bar{X}$	1	2	$\bar{X}$
20181216	0.237 3	0.266 2	0.251 8	0.125 50	0.131 40	0.128 40
20190415	0.130 3	0.125 0	0.127 6	0.082 56	0.085 73	0.084 14
20190521	0.317 5	0.334 6	0.326 0	0.132 70	0.141 60	0.137 10

3 讨论

3.1 检测条件选择

指标成分:梨耙止咳合剂组方中以梨干和菊花为君药,因梨干为药食同源药材,成分多以微量元素为主,因此选取菊花的有效成分作为本合剂的质量控制指标。2015 年版《中国药典(一部)》规定,菊花质量控制成分选用木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸和绿原酸,但合剂中桑白皮也含有绿原酸,考虑其受干扰较大,故选用木犀草苷和 3,5-双咖啡酰基奎宁酸为高效液相色谱法进行含量测定的指标成分。此外,批号 20190415 样品与批号 20181216,20190521 样品在制备工艺中所用菊花的产地不同,故木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸含量有差异。

薄层色谱(TLC)条件:桑白皮的 TLC 条件参照 2015 年版《中国药典(一部)》,采用碱溶酸提法提取,考察不同展开系统,最终选择 O/W 微乳液做展开剂,相比于传统 TLC 的展开剂,O/W 微乳液作展开剂的 TLC 图中斑点更清晰、数目更多,且低毒,还具有明显的荧光增强增

敏效应^[5]。梨耙止咳合剂中苦杏仁、枇杷叶均含有苦杏仁苷,本试验参照 2015 年版《中国药典(一部)》,前处理采用二氯甲烷提取,经多次试验发现产生乳化现象,不利于继续试验,改用乙醚萃取可避免乳化^[6],但斑点不清晰,改用大孔树脂洗脱,提取更完全,斑点清晰,分离更好。

流动相:预试验中考察了乙腈-0.05% 磷酸^[7],乙腈-0.1% 磷酸^[8],乙腈-0.5% 冰醋酸溶液^[9]等体系,结果显示,乙腈-0.5% 冰醋酸溶液等度洗脱对成分的灵敏度更高,木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸各个峰的分离度更好,峰形对称,重复性较好,拖尾因子较小。

检测波长:选择木犀草苷和 3,5-双咖啡酰基奎宁酸含量的测定波长时考察了 350 nm^[10]、327 nm^[11]、284 nm、254 nm 4 个检测波长,结果发现,木犀草苷、3,5-双咖啡酰基奎宁酸在 350 nm 波长处响应效果、分离度、重复性等均较好,因此确定 350 nm 作为检测波长。

3.2 方法评价

药理研究表明,桑白皮水煎液有止咳效果^[12];苦杏仁苷对呼吸中枢有一定抑制作用,可使呼吸运动趋于安静,最终达到镇咳、平喘的作用^[13-14],且苦杏仁苷的药理作用与枇杷叶止咳祛痰功效相对应^[15];木犀草苷具有止咳、祛痰、平喘等功效^[16];3,5-双咖啡酰基奎宁酸具有抗菌、消炎、止痛等功效^[17]。因此,采用 TLC 法对梨耙止咳合剂中桑白皮、苦杏仁、枇杷叶进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定菊花中木犀草苷和 3,5-双咖啡酰基奎宁酸的含量。该方法样品处理简单,易操作,重复使用率高,精确度高,为其质量控制提供了理论基础,同时也为梨耙止咳合剂的进一步开发提供参考。

参考文献

- [1] 周俊,唐蕾,黄峰,等.梨耙止咳合剂质量标准研究[J].海峡药学,2016,28(3):62-65.
- [2] 房德敏,高颖,严震,等.微乳薄层色谱在中药成分分析中的应用[J].中草药,2011,42(9):1852-1856.
- [3] 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,2015:57-58.
- [4] 丁锐,贺凯,张海旭,等.金莲清热胶囊质量标准研究[J].北京中医药大学学报,2016,39(5):390-394.
- [5] 孙莲,骈继鑫,李娟.微乳薄层色谱法对桑叶桑枝中活性成分的鉴别[J].新疆医科大学学报,2019,42(2):237-241.
- [6] 任荣,陈冠,李正翔.清热止咳口服液质量标准及药效学研究[J].天津中医药,2015,32(4):239-243.
- [7] 王和宇,李春娜,王旭,等.HPLC 法测定油橄榄叶中毛蕊花糖苷、木犀草苷和橄榄苦苷的含量[J].中医药导报,2016,22(7):68-70.
- [8] 叶方,梅琼,黄良永,等.HPLC 法同时测定毛连菜中咖啡酸和木犀草苷含量[J].中国药师,2019,22(3):558-560.
- [9] 范红梅,刘志海,任国文,等.HPLC 法测定黄褐毛忍冬中木犀草苷的含量[J].中国民族民间医药,2017,26(16):37-39.