

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.03.017

银黄口服液制备过程中绿原酸含量稳定性考察*

冯倩^{1,2}, 张洪亮^{1,2}, 庄华青^{1,2}, 沈庆国^{1,2}, 孙艳^{1,2}, 关永霞^{1,2Δ}, 张贵民²

(1. 鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006; 2. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006)
摘要:目的 考察银黄口服液制备过程中绿原酸含量的稳定性。方法 在2015年版《中国药典(一部)》制剂制备工艺基础上,以药液pH、煎煮时间、灭菌方式为自变量,考察绿原酸的含量变化,并比较法定工艺与优选工艺制备的样品中绿原酸的含量;于温度(40±2)℃、相对湿度为(75±5)%环境下进行6个月加速试验,考察不同灭菌条件下制剂中绿原酸的含量变化及微生物限度。结果 煎煮前调节药液pH至6.0,煎煮30 min,80℃水浴60 min灭菌后,制剂中绿原酸的含量最高;与法定工艺相比,此工艺下制备的制剂中绿原酸转移率提高了24.95%;80℃水浴60 min灭菌后制剂中微生物限度检验均合格。结论 该工艺合理、可行,能有效提高银黄口服液中绿原酸的含量。

关键词:银黄口服液;绿原酸;转移率;含量;稳定性

中图分类号:R932;R284.1;R286.0 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2022)03-0071-05

Stability of Chlorogenic Acid Content in the Preparation Process of Yinhuang Oral Liquid

FENG Qian^{1,2}, ZHANG Hongliang^{1,2}, ZHUANG Huaqing^{1,2}, SHEN Qingguo^{1,2}, SUN Yan^{1,2}, GUAN Yongxia^{1,2Δ}, ZHANG Guimin²

(1. Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi, Shandong, China 276006; 2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi, Shandong, China 276006)

Abstract: **Objective** To investigate the stability of chlorogenic acid content in the preparation process of Yinhuang Oral Liquid. **Methods** Based on the preparation process of Yinhuang Oral Liquid in the *Chinese Pharmacopoeia* (2015 Edition, Volume I), the content changes of chlorogenic acid were investigated with the pH of drug liquid, decocting time and sterilization method as the independent variables, and the content of chlorogenic acid in the samples prepared by the statutory process and optimal process was compared. The accelerated test was carried out for six months with temperature of (40 ± 2) °C and relative humidity of (75 ± 5)% to investigate the content change and microbial limit of chlorogenic acid in the preparation under different sterilization conditions. **Results** The pH of the drug liquid was adjusted to 6.0 before decocting. The content of chlorogenic acid in the preparation was the highest after decocting for 30 min and sterilizing in 80 °C water bath for 60 min. Compared with that in the preparation prepared by the statutory process, the transfer rate of chlorogenic acid in the preparation prepared by the optimal process was increased by 24.95%. After sterilization in 80 °C water bath for 60 min, the microbial limit test of the preparation was qualified. **Conclusion** The process is reasonable and feasible, which can effectively improve the content of chlorogenic acid in Yinhuang Oral Liquid.

Key words: Yinhuang Oral liquid; chlorogenic acid; transfer rate; content; stability

银黄口服液是以金银花和黄芩提取物为原料制成 的中药口服制剂,可用于治疗风热感冒所致咽干、咽

* 基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目[2020CXGC010505];山东省临沂市科技创新发展专项项目[2019ZDZX001];山东省临沂市兰山区科技发展计划项目[1942]。

第一作者:冯倩,女,硕士,高级工程师,研究方向为中药研发,(电子信箱)fengqian1981p@126.com。

Δ通信作者:关永霞,女,硕士,高级工程师,研究方向为中药制剂及质量控制,(电子信箱)jmsgyx@163.com。

[14] LU ZN, SHI ZY, DANG YF, et al. Pantoprazole pretreatment elevates sensitivity to vincristine in drug-resistant oral epidermoid carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109478.

[15] ZENG MC, SANG WH, CHEN S, et al. 4-PBA inhibits LPS-induced inflammation through regulating ER stress and autophagy in acute lung injury models [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 271: 26-37.

[16] 胡越. mTOR 和细胞自噬在 LPS 诱导的急性肺损伤中分子调控机制的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

[17] ZHENG Q, WANG YC, LIU QX, et al. FK866 attenuates sepsis-induced acute lung injury through c-jun-N-terminal kinase (JNK)-dependent autophagy [J]. *Life Sci*, 2020, 250: 117551.

[18] KUANG P, DENG HD, LIU H, et al. Sodium fluoride induces splenocyte autophagy via the mammalian targets of rapamycin (mTOR) signaling pathway in growing mice [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(7): 1649-1665.

[19] 王振兴. 黄芪甲苷经 AMPK/mTOR 信号通路调控细胞自噬与凋亡保护 PM2.5 诱导急性肺损伤的机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.

(收稿日期: 2021-03-04; 修回日期: 2021-07-15)

痛、上呼吸道感染等证^[1-3],主要成分为黄酮类、挥发油、三萜皂苷类、无机元素、有机元素^[4-5]。绿原酸为金银花提取物中最重要的有效成分,具有抗菌消炎作用,是银黄口服液质量控制的指标性成分^[6]。绿原酸是由咖啡酸和奎尼酸组成的酯类化合物,其分子结构中含有酯键、不饱和双键、多元酚羟基等不稳定化学键^[7],具有清热解毒作用,能有效抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的生长增殖^[8-9]。在银黄口服液的制备过程中,绿原酸往往会发生水解和异构化,导致含量显著下降。本研究中以2015年版《中国药典(一部)》中银黄口服液制备工艺为基础,优选了银黄口服液的制备工艺,并考察了制备过程中绿原酸含量的稳定性,以提高其绿原酸的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);SENCOR501 型旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司);Himac CR-G Ⅲ型系列高速离心机(天美科学仪器有限公司);ME1002 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司,精度为十万分之一);DRHH-S6 型数显恒温水浴锅(上海双捷实验设备有限公司)。

1.2 试药

金银花(鲁南厚普制药有限公司,批号为20180602),经山东中医药大学李宝国副教授鉴定为忍冬科植物杀青干燥的花蕾;绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111720-201708,纯度为98.7%);新绿原酸对照品(批号为MUST-17100201,纯度为98.4%),隐绿原酸对照品(批号为MUST-18110603,纯度为98.6%),均购于成都曼思特生物科技有限公司;甲醇为色谱纯,水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90, V/V);流速:1 mL/min;柱温:30℃;检测波长:327 nm;进样量:5 μL。

2.1.2 溶液制备^[10]

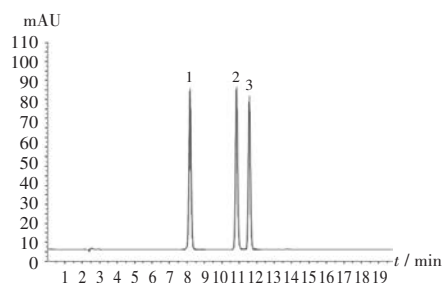
取绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸对照品各1.50 mg,精密称定,置50 mL棕色容量瓶中,加50%甲醇适量,超声溶解并定容,得质量浓度为0.03 mg/mL的混合对照品溶液。

取黄芩提取物[按2015年版《中国药典(一部)》工艺制备],加水适量使溶解,用8% NaOH溶液调pH至8.0,滤过,滤液与金银花提取物[按2015年版《中国药

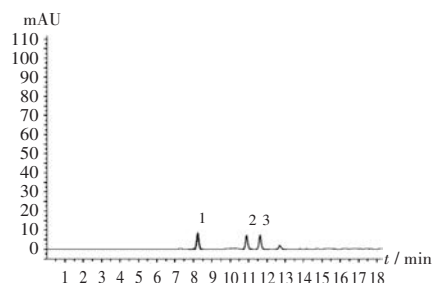
典(一部)》工艺制备]合并,用8% NaOH溶液调pH至7.2,煮沸60 min,滤过,加单糖浆适量,加入适量饮用水,混匀,用8% NaOH溶液调pH至7.2,加水至1 000 mL,滤过,灌封得100支。经100℃蒸汽灭菌30 min,即得样品(自拟批号为190725-2)。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:分别精密移取2.1.2项下混合对照品溶液1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mL,置10 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,混匀;吸取2.1.2项下样品溶液5 mL,加水定容至100 mL容量瓶中,经0.45 μm微孔滤膜滤过。精密吸取上述溶液各5 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,样品溶液色谱图中,有与混合对照品溶液对应的色谱峰出现。色谱图见图1。



A



B

1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸

A. 混合对照品溶液 B. 样品溶液

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. Neochlorogenic acid 2. Chlorogenic acid 3. Cryptochlorogenic acid

A. Mixed reference solution B. Sample solution

Fig.1 HPLC chromatograms of the specificity test

精密度试验:取同一批(批号为190725-2)样品,按2.1.1项下色谱条件于第1,2,3天分别测定6次,绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸日内精密度保留时间的RSD分别为1.78%,1.92%,1.59%(n=6),峰面积的RSD分别为2.21%,1.82%,2.09%(n=6);日间精密度保留时间的RSD分别为1.43%,1.84%,2.34%(n=6),峰面积的RSD分别为1.98%,2.56%,2.13%(n=6)。结果表明,仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为190725-2)样品,分别于4,8,12,16,20 h时进样测定。结果绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸保留时间的RSD分别为1.39%,2.43%,

2.89% ($n = 5$), 峰面积的 RSD 分别为 1.90%, 2.18%, 2.71% ($n = 5$), 表明样品溶液在 20 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取同一批 (批号为 190725-2) 样品, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸保留时间的 RSD 分别为 2.89%, 2.56%, 2.19% ($n = 6$), 峰面积的 RSD 分别为 2.32%, 2.43%, 2.71% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

2.2 银黄口服液制备过程中绿原酸稳定性研究

2.2.1 金银花提取物制备中绿原酸含量变化

取金银花药材 40.0 kg, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定其绿原酸含量为 3.0%, 均分为 4 批 (分别编号为 01, 02, 03, 04), 每批药材分别用 10 倍量和 8 倍量 15% 乙醇回流提取 2 次, 合并提取液; 减压浓缩至相对密度为 1.16 的浓缩液; 用 95% 乙醇调节醇度至 65%, 静置 24 h 后用滤纸滤过, 得醇沉液; 加水至 7.5 kg, 得供配液。分别吸取上述提取液、浓缩液、醇沉液和供配液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定绿原酸的含量。详见图 2。

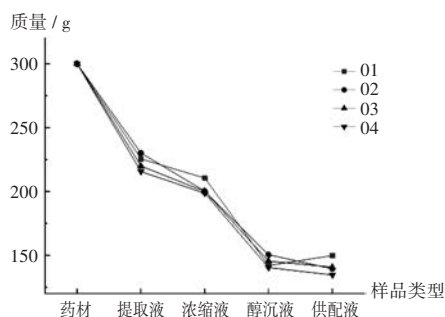


图2 不同溶液绿原酸质量

Fig. 2 Quality of chlorogenic acid in different solutions

在金银花提取物制备过程中, 绿原酸平均提取率为 73.91%, 浓缩液平均转移率为 67.83%, 绿原酸在提取和浓缩过程中较稳定。醇沉液中绿原酸的总量为药材的 48.03%, 与浓缩液相比, 绿原酸损失率为 29.20%, 主要原因为沉淀中吸附大量绿原酸。供配液 (编号为 01) 的绿原酸总含量高于醇沉液, 可能原因为绿原酸向异构体的转化具有可逆性。

2.2.2 不同 pH 条件下煮药对绿原酸含量的影响

取黄芩提取物 1.2 kg, 按 2015 年版《中国药典 (一部)》工艺, 加水溶解, 用 8% NaOH 溶液调 pH 至 8.0, 滤过, 滤液备用; 取样品 (编号为 01) 适量, 依法制备金银花提取物供配液 5 kg, 与上述滤液混合, 均分为 5 份, 分别用 8% NaOH 溶液调 pH 至 5.6, 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 煮沸 1 h, 分别测定其在调节 pH 前和煮药后的绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸含量变化。详见图 3。可见, 绿原酸和总绿原酸的含量随 pH 升高而降低, 新绿原酸和隐绿原酸的含量随 pH 升高而升高, 表明 pH 升高, 有利于绿原酸转化为新绿原酸和隐绿原酸, 且绿原酸的水解程度加

大。调节 pH 至 5.6 时, 黄芩提取物部分析出, 黄芩苷稳定性好, pH 对黄芩苷的含量影响较小, 故煮药前调节药液 pH 至 6.0。

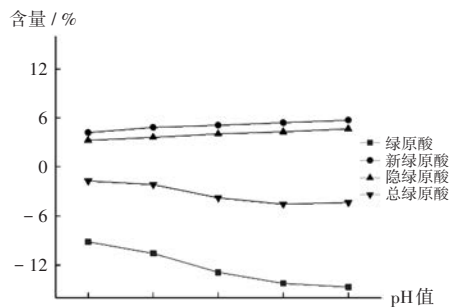


图3 不同 pH 条件下煮药对绿原酸含量的影响

Fig. 3 Effect of decocting medicinal herbs at different pH on the chlorogenic acid content

2.2.3 不同煎煮时间对绿原酸含量的影响

取黄芩提取物 1.8 kg, 加水溶解, 用 8% NaOH 溶液调 pH 至 8.0, 滤过, 滤液备用; 取样品 (编号为 02), 依法制备金银花提取物供配液 7.5 kg, 与上述滤液混合, 用 8% NaOH 溶液调 pH 至 6.0, 均分为 5 批, 每批 3 份, 分别煎煮 30, 45, 60, 75, 90 min, 测定绿原酸含量, 并计算平均转移率。详见图 4。可见, 煮药时间为 30 min 和 60 min 时的绿原酸平均转移率相差 3.98%, 煮药时间为 60 min 和 90 min 时的绿原酸转移率相差 1.87%, 表明绿原酸转移率随着煎煮时间的延长而降低, 即水解和异构化的速率降低, 故煎煮时间确定为 30 min。

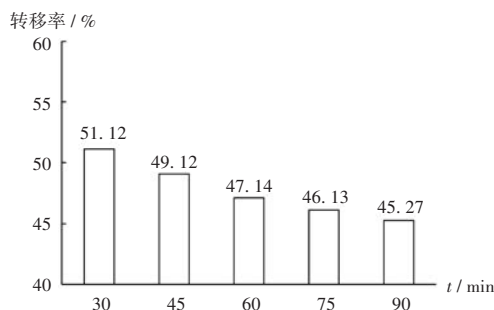


图4 不同煎煮时间的绿原酸转移率变化

Fig. 4 Changes of chlorogenic acid content at different decoction time

2.2.4 不同灭菌方式对绿原酸含量的影响

取黄芩提取物 1.8 kg, 加水溶解, 用 8% NaOH 溶液调 pH 至 8.0, 滤过, 滤液备用; 取样品 (编号为 03), 依法制备金银花提取物供配液, 与上述滤液混合, 用 8% NaOH 溶液调 pH 至 6.0, 煎煮 30 min, 滤过, 加单糖浆适量, 加饮用水适量, 搅匀, 用 8% NaOH 溶液调 pH 至 7.2, 补水至 6 000 mL, 滤过, 灌装得 600 支样品, 均分为 8 份, 采用 0.1% 苯甲酸钠 + 0.1% 苯甲酸、80 °C 水浴 60 min、100 °C 水浴 30 min、100 °C 蒸汽 30 min 进行灭菌。灭菌后自然冷却, 分别测定其绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸的

含量。详见图5。可见,0.1%苯甲酸钠+0.1%苯甲酸灭菌后,绿原酸和新绿原酸平均转移率分别为96.23%和102.12%;100℃蒸汽灭菌30 min,绿原酸和新绿原酸平均转移率分别为85.21%和112.01%。结果表明,灭菌条件越剧烈,绿原酸转移率越低,新绿原酸转移率越高;不同灭菌方式下,总绿原酸和隐绿原酸转移率变化均较小,提示灭菌过程中绿原酸水解程度较轻,灭菌过程中绿原酸损失的主要原因为其异构化为新绿原酸。

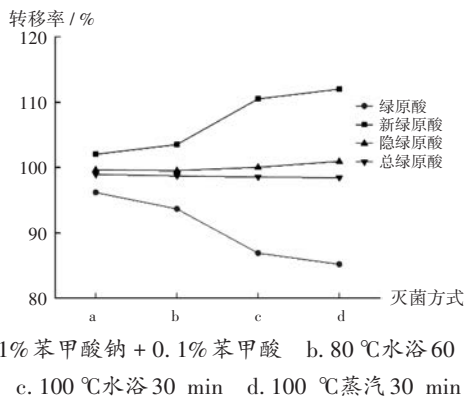


图5 不同灭菌方式对绿原酸转移率的影响
a. 0.1% Sodium benzoate + 0.1% Benzoic acid B. 80℃ Water bath for 60 min C. 100℃ Water bath for 30 min D. 100℃ Steam for 30 min
Fig. 5 Effect of different sterilization methods on the transfer rate of chlorogenic acid

2.3 稳定性试验

取2.2.4项下灭菌后的样品,于温度(40±2)℃、相对湿度(75±5)%环境下进行6个月加速试验,验证灭菌后样品的稳定性。结果见表1。可见,经0.1%苯甲酸钠+0.1%苯甲酸灭菌的样品在6个月加速试验后,其需氧菌总数超标;其他3种灭菌方式的需氧菌总数,霉菌、酵母菌总数,大肠埃希菌含量均符合检验标准。由图5可知,与其他2种灭菌方式相比,采用80℃水浴60 min方案灭菌,绿原酸转移率较高,水解和异构化程度均较轻,且灭菌后微生物限度检验合格,可更好保证灭菌后的药效。

2.4 法定工艺与优化工艺绿原酸总转移率测定

取黄芩提取物1.8 kg,加水溶解,用8% NaOH溶液调pH至8.0,滤过,滤液备用;取样品(编号为04),依法制备金银花提取物供配液,与上述滤液混合,均分为法定工艺组和优化工艺组。优化工艺组采用优化工艺制

备,均分为3份,每份分别用8% NaOH溶液调pH至6.0,煮沸30 min,滤过,加单糖浆适量,加饮用水适量,搅匀,用8% NaOH溶液调pH至7.2,补水至1 000 mL,滤过,灌封得100支样品,80℃水浴60 min灭菌;法定工艺组采用2015年版《中国药典(一部)》工艺制备,均分为3份,每份分别用8% NaOH溶液调pH至7.2,煮沸60 min,滤过,加单糖浆适量,加饮用水适量,搅匀,用8% NaOH溶液调pH至7.2,补水至1 000 mL,滤过,灌封得100支样品,100℃蒸汽灭菌30 min。分别测定每份药液调pH前和灭菌后的绿原酸含量。采用SPSS 24.0统计学软件分析,计数资料以率(%)表示,组间比较行t检验,P<0.05为差异有统计学意义。详见图6。可见,与法定工艺组比较,优化工艺组总转移率提高了24.95%,差异显著(P<0.05),表明优化工艺能有效抑制绿原酸的水解和异构化,提高银黄口服液中绿原酸的含量。

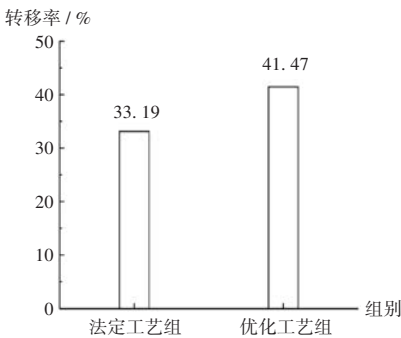


图6 法定工艺与优化工艺条件下的绿原酸转移率(n=3)
Fig. 6 The transfer rate of chlorogenic acid under the statutory process and optimal process conditions(n=3)

3 讨论

在3批金银花提取物制备过程中,供配液(样品编号为01)的绿原酸总含量略高于醇沉液,可能原因为部分新绿原酸和隐绿原酸逆转化为绿原酸。在煎煮和灭菌阶段,由于pH和温度升高,绿原酸除部分水解外,主要被氧化为还原性较弱的新绿原酸和隐绿原酸。与煎煮和灭菌前相比,绿原酸和总绿原酸转移率均减少,新绿原酸和隐绿原酸转移率均升高。故在银黄口服液制备过程中,适当调低药液pH,减少煎煮时间,可有效减少绿原酸的氧化;而适量加入抗坏血酸、酒石酸、L-半胱氨酸等还原性药品添加剂,以抑制绿原酸氧化和水解,提高绿原酸含量的可行性有待进一步研究。

表1 加速试验后不同灭菌方式微生物限度检查结果

Tab. 1 Microbial limit test results of different sterilization methods after the accelerated test

检验项目	检验标准	灭菌方式			
		0.1% 苯甲酸钠 + 0.1% 苯甲酸	80℃水浴 60 min	100℃水浴 30 min	100℃蒸汽 30 min
需氧菌总数(cfu / mL)	≤ 10	10 000	< 1	< 1	< 1
霉菌、酵母菌总数(cfu / mL)	≤ 10	< 1	< 1	< 1	< 1
大肠埃希菌含量	每1 mL不得检出	未检出	未检出	未检出	未检出