

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.021

镇咳宁口服液质量标准提高研究*

许丁香¹, 谭智艳^{2△}, 李仁玮², 齐皓²

(1. 湘南学院附属医院药剂科, 湖南 郴州 423000; 2. 湖南省郴州市食品药品检验检测中心生化药理室, 湖南 郴州 423600)

摘要:目的 提高镇咳宁口服液的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别制剂中枳实、百部药材;采用高效液相色谱法测定制剂中橙皮苷的含量,色谱柱为 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水-冰醋酸(35:61:4, V/V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 283 nm,柱温为 35℃,进样量为 10 μL。结果 枳实、百部 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。橙皮苷进样量在 0.04~1.28 μg 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=1.000, n=6$);精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 1.50%($n=6$);平均加样回收率为 98.77%,RSD 为 0.64%($n=6$)。结论 所建立的方法可用于提高镇咳宁口服液的质量标准。

关键词:镇咳宁口服液;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

中图分类号:R917;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)08-0086-03

Study on Improvement of Quality Standard of Zhenkening Oral Liquid

XU Dingxiang¹, TAN Zhiyan², LI Renwei², QI Hao²

(1 Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou, Hunan, China 423000; 2. Department of Biochemistry and pharmacology, Chenzhou Food and Drug Testing Center, Chenzhou, Hunan, China 423600)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Zhenkening Oral Liquid. **Methods** The qualitative of Aurantii Fructus Immaturus and Stemonae Radix were identified by thin-layer chromatography (TLC) method. The content of hesperidin in the preparation was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the chromatographic column was Phenomenex Gemini-NX C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water-glacial acetic acid (35:61:4, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 283 nm, the column temperature was 35℃ and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of Aurantii Fructus Immaturus and Stemonae Radix were clear and well separated, and the negative samples had no interference. The injection volume of hesperidin showed a good relationship with peak area in the range of 0.04-1.28 μg ($R^2=1.000, n=6$). The RSDs of precision, repeatability and stability were less than 1.50% ($n=6$). The average recovery was 98.77% with RSD of 0.64% ($n=6$). **Conclusion** The established method can be used for the improvement of the quality standard of Zhenkening Oral Liquid.

Key words: Zhenkening Oral Liquid; TLC; HPLC; quality standard

镇咳宁口服液由桔梗、枳实、陈皮、远志、白前、法半夏、紫菀、甘草、百部等14味中药材组方,为湖南省郴州市安仁县人民医院院内制剂,临床应用10余年,主要用于治疗感冒引起的咳嗽。其现行质量标准主要是对桔梗、甘草、远志3种药材及其中主要化学成分橙皮苷进行定性鉴别。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中枳实、百部2种药材进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定橙皮苷的含量,以期镇咳宁口服液质量标准的提高提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪,包括紫外检测器、

Chemstation 工作站(美国 Agilent 公司);XSE250DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);JA5003 型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);KQ3200DB 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

镇咳宁口服液(湖南省郴州市安仁县人民医院,批号分别为 20180907, 20181109, 20181212, 规格为每支 10 mL);枳实对照药材(批号 120936-201606)、百部对照药材(批号 121221-201604)、橙皮苷对照品(批号 110721-201818, 含量 96.2%),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司);甲醇、冰醋酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,

*基金项目:湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目[湘食药科 R201811]。

第一作者:许丁香,女,大学本科,主管药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)195579462@qq.com。

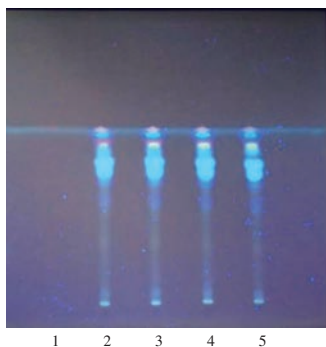
△通信作者:谭智艳,女,大学本科,主管药师,研究方向为药学检验,(电子信箱)28977580@qq.com。

水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

枳实^[1-2]:取样品 20 mL,加三氯甲烷 40 mL,超声(功率为 250 W,频率为 40 kHz,下同)处理 30 min,滤过,滤液蒸干后加无水乙醇 1 mL 使溶解,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取枳实对照药材 1 g,加三氯甲烷 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干后加无水乙醇 1 mL 使溶解,滤过,取续滤液,即得对照药材溶液。按镇咳宁口服液处方和工艺制备缺枳实的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》TLC 法,吸取上述溶液各 10 μ L^[3],分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丙酮-冰醋酸(15:1:0.5, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[4]。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。



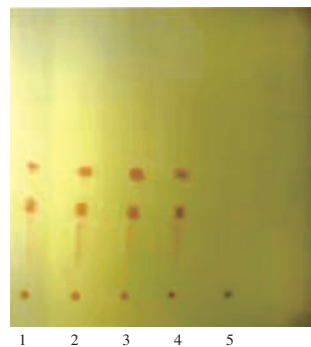
1. 阴性对照品溶液 2. 对照药材溶液 3-5. 供试品溶液

图1 枳实薄层色谱图

1. Negative reference solution 2. Reference medicinal material solution
3-5. Test solution

Fig.1 TLC chromatograms of Aurantii Fructus Immaturus

百部^[5]:取样品 30 mL,加氨水溶液调 pH 至 10,用三氯甲烷萃取 2 次(每次 25 mL),合并有机相,蒸干,加甲醇 1 mL 使溶解,即得供试品溶液。取百部对照药材 2 g,用氨水溶液充分润湿,室温下放置 10 min,加三氯甲烷 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干后加甲醇 1 mL 使溶解,即得对照药材溶液。按镇咳宁口服液工艺处方制备缺百部的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》TLC 法,吸取上述溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-丙酮-甲醇(8:5:0.5, V/V/V)为展开剂,用饱和氨蒸气预饱和 30 min,展开,取出,晾干,喷以碘化铋钾稀溶液。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 2。



1. 对照药材溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液

图2 百部薄层色谱图

1. Reference medicinal material solution 2-4. Test solution
5. Negative reference solution

Fig.2 TLC chromatograms of Stemona Radix

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水-冰醋酸(35:61:4, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:283 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L^[6-8]。

2.2.2 溶液制备

取橙皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成含 0.02 mg/mL 橙皮苷的对照品溶液。精密量取样品 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容,超声处理 30 min 后,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按镇咳宁口服液工艺和处方制备缺枳实、陈皮的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

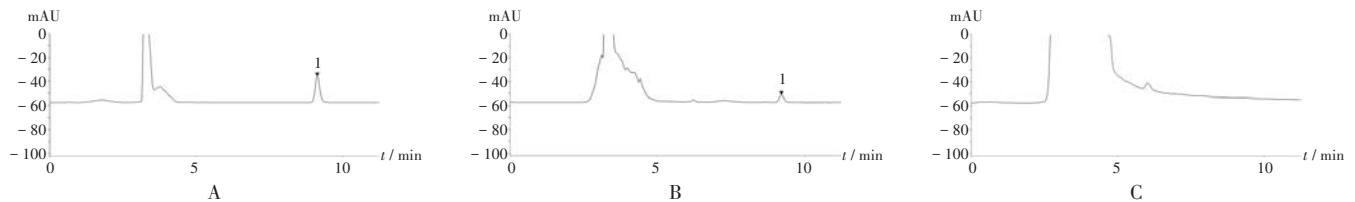
2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取 2.2.2 项下 3 种溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照品溶液与对照品溶液色谱峰相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。详见图 3。

线性关系考察:分别精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液 2, 4, 8, 16, 32, 64 μ L,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(X , μ g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.9973X + 1.0773$ ($R^2 = 1.000, n = 6$)。结果表明,橙皮苷进样量在 0.04 ~ 1.28 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2.2 项下对照品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果橙皮苷峰面积的 RSD 为 0.50% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液适量,分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 10, 22 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果橙皮苷峰面积的 RSD 为 1.10% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温放置 22 h 内基本稳定。



1. 橙皮苷
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Hesperidin

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

Fig. 3 HPLC chromatograms

重复性试验:取样品(批号为20181212)适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,共6份,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果橙皮苷峰面积的RSD为0.70%,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为20181212)5 mL,精密称定,共6份,分别精密加入橙皮苷对照品溶液适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果(n=6)

Tab.1 Results of the recovery test(n=6)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.528 4	1.222 7	2.721 9	97.61	98.77	0.64
1.528 4	1.222 7	2.743 8	99.40		
1.528 4	1.222 7	2.734 3	98.63		
1.528 4	1.222 7	2.741 1	99.18		
1.528 4	1.222 7	2.735 8	98.75		
1.528 4	1.222 7	2.739 5	99.06		

2.2.4 样品含量测定

取3批样品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,平行3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果批号为20180907,20181109,20181212的样品中橙皮苷含量分别为0.274 1,0.274 9,0.273 5 mg/mL,RSD分别为0.4%,0.8%,0.4%。

3 讨论

本制剂现行质量标准主要为定性鉴别,未涉及定量内容。镇咳宁口服液由14味中药组方,现行标准可鉴别药材数量过少,且缺少阴性对照试验验证。

TLC法在单味中药、中成药及中药相关制剂的鉴定中应用广泛,且操作简单、准确度高。HPLC法因其高压、高效、高灵敏度等特点,成为中药关键物质定量测定首选方法。因此,本研究中结合TLC法及HPLC法对镇咳宁口服液进行质量标准研究。橙皮苷为二氢黄酮苷化合物,易溶于吡啶及氢氧化钠溶液,微溶于甲醇,且吡啶属2B类致癌物,氢氧化钠不能应用于色谱,故选

用甲醇。本研究中参考相关文献和大量试验研究对原TLC法进行了验证和修订,解决了阴性干扰问题,并保证了试验的可重复性^[9-12]。此外,本研究中还建立了枳实和百部的TLC鉴别方法,该方法具有良好的重复性和特异性。橙皮苷存在于陈皮和枳实中,故以该成分作为含量指标。在预试验中考察了不同的流动相,结果以甲醇-水-冰醋酸(35:61:4,V/V/V)为流动相,分辨率最佳,无干扰,适用于橙皮苷的含量测定。

综上所述,本研究中建立的方法操作简单,精密度、稳定性、重复性均较好,可用于提高镇咳宁口服液的质量标准。

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,2020:258.
- [2] 刘振华,何丽果,徐艳霞. 枳实消痞丸的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业,2010,19(10):48.
- [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,2020:59-60.
- [4] 蒲志强,陈 华,金伟华,等. 骨质增生丸质量标准提升研究[J]. 中国药业,2019,28(10):35-37.
- [5] 肖 暇,何丽华. 四季感冒胶囊质量标准的研究[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2011,8(3):93-94.
- [6] 陈 慧. HPLC测定小儿百部止咳糖浆中橙皮苷含量[J]. 广东微量元素科学杂志,2016,23(2):30-33.
- [7] 田 涛,余敏灵. 以橙皮苷为对照品的内加法测定甘草中甘草苷和甘草酸含量[J]. 中国药业,2021,30(13):67-71.
- [8] 陆 丹,赵懿清,高秋芳,等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定黄氏响声片中贝母素甲和贝母素乙含量[J]. 中国药业,2019,28(8):24-26.
- [9] 钟文雨,于士龙,汪 宇. 芪桑口服液质量标准提高研究[J]. 中国药业,2019,28(4):22-24.
- [10] 王明华. 肠可宁微丸质量标准研究[J]. 中国药业,2019,28(4):28-30.
- [11] 水彩红,陈玉敏,姜春来,等. 小儿止泻安颗粒质量标准的研究[J]. 解放军药科学学报,2011,27(5):435-437.
- [12] 张 淹,李士栋,王春艳,等. 黄连阿胶胶囊质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理,2015,26(6):828-832.

(收稿日期:2021-07-21;修回日期:2021-09-10)