

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.14.020

止咳片质量标准提升研究*

刘超,喻贵英,罗伟,昌秦芬[△],汪杨,蒋静,谢元碧

(太极集团重庆桐君阁药厂有限公司,重庆 401336)

摘要:目的 提升止咳片的质量标准。方法 筛选适于对叶百部含量测定的高效液相色谱(HPLC)法;采用HPLC法测定对叶百部中苦杏仁苷的含量,色谱柱为Shiseido CAPCELL PAK C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(15:85,V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL。结果 蔓生百部、直立百部的HPLC图基本一致,对叶百部色谱图与前两者差异较大。苦杏仁苷进样量在0.395 84~1.979 20 μg范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 98$, $n=7$);精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%;平均加样回收率为103.29%,RSD为1.08%($n=6$)。10批样品的苦杏仁苷含量为每片0.34~1.66 mg(平均0.95 mg)。结论 制剂每片含苦杏仁(以苦杏仁苷计),不得少于0.40 mg。所建立的苦杏仁苷含量测定方法操作简单、准确、重复性好,可用于止咳片的质量控制。

关键词:止咳片;质量标准;高效液相色谱法;对叶百部;苦杏仁苷

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)14-0088-04

Improvement of Quality Standard of Zhike Tablets

LIU Chao,YU Guiying,LUO Wei,CHANG Qinfen,WANG Yang,JIANG Jing,XIE Yuanbi

(Taiji Group Chongqing Tongjunge Medicinal Materials Co.,Ltd.,Chongqing,China 401336)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Zhike Tablets. **Methods** The methods for content determination of *Stemona tuberosa* were screened by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The content of amygdalin in *Stemona tuberosa* was determined, the chromatographic column was Shiseido CAPCELL PAK C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water (15:85, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The HPLC chromatograms of *Stemona japonica* and *Stemona sessilifolia* were basically the same, but that of *Stemona tuberosa* were significantly different. The linear range of amygdalin was 0.395 84-1.979 20 μg ($r=0.999\ 98$, $n=7$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recovery of amygdalin was 103.29% with an RSD of 1.08% ($n=6$). The content of amygdalin in 10 batches of samples was in the range of 0.34-1.66 mg (0.95 mg on average). **Conclusion** The content of Armeniaceae Semen Amarum (calculated by amygdalin) in each tablet of the preparation should not be less than 0.40 mg. The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Zhike Tablets.

Key words: Zhike Tablets; quality standard; HPLC; *Stemona tuberosa*; amygdalin

止咳片为润肺定喘、祛痰止咳的良药,由百部、前胡、苦杏仁组方,临床主要用于治疗咳嗽、痰多、气喘,以及小儿百日咳、急慢性气管炎,疗效确切。其药品质量标准收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第四册)》(标准编号WS₃-B-0700-91),但仅含性状鉴

别、理化鉴别、前胡薄层鉴别和检查项,质量控制指标少。百部作为止咳片组方中的君药,其味苦、微甘,性微温,归肺经,具有润肺止咳、杀虫灭虱的功效。百部药材为百部科植物直立百部 *Stemona sessilifolia* (Miq.) Miq.、蔓生百部 *Stemona japonica* (BL.) Miq. 或对叶百部

*基金项目:国家中医药管理局全国中药特色技术传承人才培训项目[T20184828005]。

第一作者:刘超,男,硕士,高级工程师,研究方向为中药制剂与标准,(电子信箱)349506638@163.com。

[△]通信作者:昌秦芬,女,大学本科,研究方向为中药制剂与标准,(电子信箱)1126494128@qq.com。

[14] 胡昌勤,冯艳春. 近红外光谱法快速分析药品[M]. 北京:化学工业出版社,2010:67-70.

[15] WANG XL, FU Q, SHENG JF, et al. Construction of a universal quantitative model for ibuprofen sustained-release capsules from different manufactures using near-infrared diffuse reflection[J]. Vib Spec, 2010, 53: 214-217.

[16] SILVA VHD, GONCALVES JL, VASCONCELOS FVC, et al.

Quantitative analysis of mebendazole polymorphs in pharmaceutical raw materials using near-infrared spectroscopy[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 115: 587-593.

[17] 詹雪艳,赵娜,林兆洲,等. 校正集选择方法对于积雪草总苷中积雪草苷 NIR 定量模型的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(12): 3267-3272.

(收稿日期:2021-10-29;修回日期:2022-01-18)

Stemona tuberosa Lour. 的干燥块根^[1]。系统对比发现,我国百部属植物块根中的总生物碱含量、百部生物碱含量因其品种、产地的不同而有所差异^[2];直立百部与蔓生百部较相似,两者均与对叶百部差异较大^[3-5]。为更有效控制止咳片质量,本研究中基于文献^[1,6],进一步对百部进行高效液相色谱(HPLC)图谱研究。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ML-304T型精密电子天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司);KQ-600DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HWS-24型电热恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司);ZF-90型多功能暗箱式紫外投射仪(上海宝山顾村电光仪器厂);QYSW-10A型超纯水机(重庆前沿水处理设备有限公司);HP-1260型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)。

1.2 试药

止咳片(桐君阁药厂,编号为1~10);对叶百部对照药材(批号121221-201604),直立百部对照药材(批号121588-201502),苦杏仁苷对照品(批号110820-201808,含量88.2%),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂,规格为100 mm×200 mm、厚0.20~0.25 mm);氢氧化钠硅胶G薄层板(自制);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为一级纯化水。蔓生百部药材、对叶百部药材均购自西藏本草真源中药资源有限公司,由重庆太极实业(集团)股份有限公司杨修齐副主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 HPLC 图谱研究

2.1.1 蔓生百部、直立百部

蔓生百部、直立百部对照药材溶液制备:取蔓生百部药材、直立百部对照药材粉末各1 g,精密称定,置锥

形瓶中,加氨试液4 mL,放置30 min,加甲醇50 mL,加热回流1 h,滤过,滤液回收溶剂至干,残渣用甲醇溶解,置25 mL容量瓶中,加甲醇定容,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

对叶百部对照药材溶液制备:取对叶百部对照药材粉末1 g,精密称定,置50 mL锥形瓶中,加氨试液4 mL,放置30 min,再加入异丙醇-甲醇(1:1, V/V)溶液25 mL,超声(功率300 W,频率50 kHz,下同)处理30 min,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取滤液,滤渣重复提取1次,合并滤液,蒸干,残渣用甲醇溶解,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

色谱条件:色谱柱为Agilent ShimNex WR Phenyl-Hexyl柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.1%三乙胺溶液-乙腈(68:32, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为306 nm,柱温为35℃,进样量为10 μL。

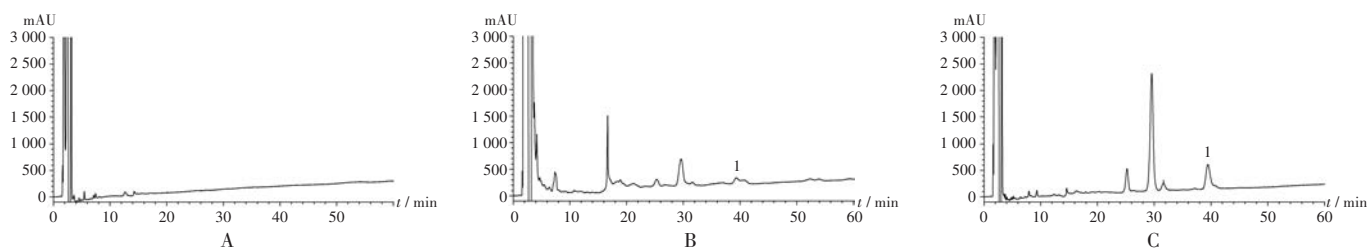
特征峰获取:取上述3种对照药材溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱(见图1)。结果蔓生百部药材和直立百部对照药材溶液的HPLC图谱特征峰清晰,分离良好,而对叶百部对照药材溶液的HPLC图谱特征峰不明显。结果表明,该色谱条件仅适用于蔓生百部及直立百部图谱的特征峰获取。

2.1.2 对叶百部及样品

1)对叶百部

色谱条件:色谱柱同2.1.1项,流动相为0.1%三乙胺溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min时90%A→60%A,10~20 min时60%A→50%A,20~40 min时50%A→25%A),蒸发光检测器(漂移管温度105℃,气流量3.0 mL/min),流速为1.0 mL/min,柱温为30℃,进样量为5 μL。

特征峰获取:取对叶百部对照药材溶液适量,按2.1.2项下色谱条件进样测定,记录色谱。对叶百部对照药材溶液HPLC图谱中3个特征峰的相对保留时间



1. 原百部碱

A. 对叶百部对照药材溶液 B. 蔓生百部对照药材溶液 C. 直立百部对照药材溶液

图1 3种对照药材高效液相色谱图

1. Protostemona

A. Reference medicinal materials of *Stemona japonica* B. Reference medicinal materials of *Stemona sessilifolia* C. Reference medicinal materials of *Stemona tuberosa*

Fig. 1 HPLC chromatograms of three reference medicinal materials

表1 对叶百部3个特征峰的相对保留时间及可变范围
Tab.1 Relative retention time and variable range of the three characteristic peaks in *Stemona japonica*

指标	峰1	峰2	峰3
相对保留时间	0.42	0.55	1.00
可变范围	± 0.03	± 0.03	

及可变范围见表1;以峰3(对叶百部碱)为指标成分峰。

2)样品

溶液制备:取对叶百部药材样品适量,按2.1.1项下对叶百部对照药材溶液制备方法制得药材样品溶液。取样品粉末2.5 g,精密称定,置具塞瓶中,加入70%甲醇25 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,以70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液1。按止咳片工艺和处方制备缺百部的阴品样品,同供试品溶液1制备方法制得阴性对照品溶液。

特征峰获取:取上述3种溶液及2.1.1项下对叶百部对照药材溶液,按2.1.2项下色谱条件进样测定,结果表明对照药材溶液、药材样品溶液和样品溶液的HPLC图谱虽基本一致,但该色谱条件不适用于对叶百部药材及制剂的质量控制。详见图2。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Shiseido CAPCELL PAK C₁₈柱(250 mm ×

4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

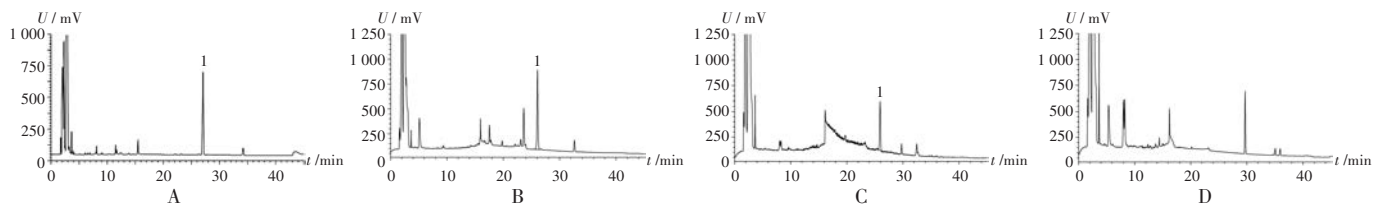
2.2.2 溶液制备

取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇,制成每1 mL含98.96 μ g苦杏仁苷对照品溶液。取样品20片,除去包衣,研细,取0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液2。

2.2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:取2.2.2项下2种溶液及2.1.2.2)项下阴性对照品溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数以苦杏仁苷峰计不低于5 000,供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应位置有吸收峰,阴性对照无干扰,专属性良好。详见图3。

线性关系考察:精密吸取2.2.2项下对照品溶液4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 μ L,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以对照品进样量(X , μ g)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得苦杏仁苷回归方程 $Y = 945.4884X - 6.9599$ ($r = 0.99998, n = 7$)。结果表



1. 对叶百部碱

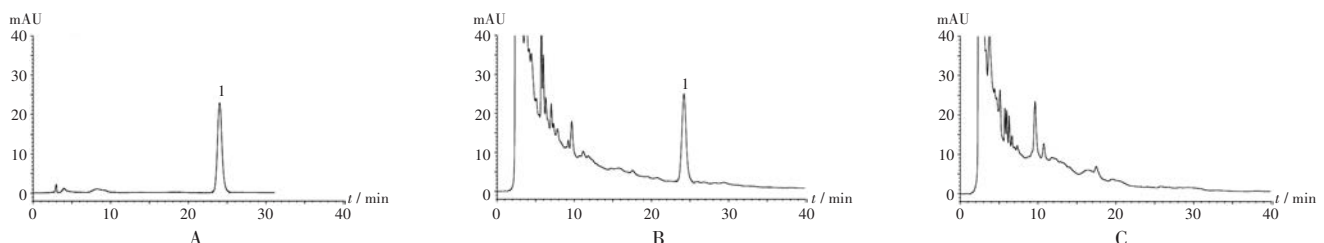
A. 对照药材溶液 B. 药材样品溶液 C. 供试品溶液1 D. 阴性对照品溶液

图2 对叶百部药材及制剂的高效液相色谱图

1. Tuberostemonine

A. Solution of reference medicinal materials B. Sample solution of medicinal materials C. Test solution 1 D. Negative reference substance

Fig. 2 HPLC chromatograms of medicinal materials and preparations of *Stemona tuberosa*



1. 苦杏仁苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液2 C. 阴性对照品溶液

图3 止咳片的高效液相色谱图

1. Amygdalin

A. Reference solution B. Test solution 2 C. Negative reference solution

Fig. 3 HPLC chromatograms of Zhike Tablets

明,苦杏仁苷进样量在0.395 84~1.979 20 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

仪器精密度及中间精密度试验:精密吸取苦杏仁苷对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积,结果的 RSD 为0.11%($n=6$),表明仪器精密度良好;3名试验人员分别按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,记录峰面积。结果的 RSD 为0.07%($n=3$),表明中间精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,室温下放置0,3.5,7.0,10.5,14.0,17.5,21.0,24.5 h时,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为1.73%($n=8$),表明室温下供试品溶液放置24.5 h内稳定。

重复性试验:取同一供试品溶液6份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算苦杏仁苷含量。结果苦杏仁苷含量的平均值为5.585 mg/g, RSD 为0.42%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批样品粉末约0.25 g,共6份,精密称定,精密加入150.0 μg /mL苦杏仁苷对照品溶液10 mL,混匀,按2.2.1项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.259 4	1.422	1.500	3.002	105.33	103.29	1.08
0.250 4	1.373	1.500	2.923	103.33		
0.250 1	1.371	1.500	2.905	102.27		
0.252 3	1.383	1.500	2.920	102.47		
0.250 5	1.373	1.500	2.926	103.53		
0.252 0	1.382	1.500	2.924	102.80		

2.2.4 样品含量测定

取10批样品各适量,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,记录峰面积,计算苦杏仁苷含量。结果苦杏仁苷含量为每片0.34~1.66 mg,平均0.95 mg。详见表3。随制剂贮藏时间延长,苦杏仁苷含量逐渐降低,故将制剂的含量限度制定为,每片含苦杏仁以苦杏仁苷计不得少于0.40 mg。

3 讨论

苦杏仁苷含量测定研究的预试验中,考察了207 nm和210 nm 2种检测波长,结果表明,检测波长为210 nm时峰形更好,苦杏仁苷峰理论板数更高。对乙腈-0.1%磷酸溶液(8:92, V/V ,梯度洗脱),甲醇-水(20:80, V/V),甲醇-水(18:82, V/V),甲醇-水(15:85, V/V)4种流

表3 样品含量测定结果(mg/片)

Tab. 3 Results of content determination of amygdalin in the samples (mg/tablet)

编号	含量	编号	含量
1	0.34	7	1.66
2	0.46	8	1.12
3	0.73	9	0.85
4	0.70	10	1.22
5	1.21	$\bar{X}$	0.95
6	1.19		

动相进行考察,结果表明,以甲醇-水(15:85, V/V)为流动相时分离效果较好,故选取检测波长210 nm,流动相为甲醇-水(15:85, V/V)。提取溶剂考察了甲醇和70%甲醇,结果表明70%甲醇提取样品效果更好,故选择;对提取溶剂量、超声提取功率和提取时间也进行了考察,结果表明,以25 mL 70%甲醇超声(功率250 W,频率40 kHz)提取30 min为宜。

预试验中对处方中百部药材进行TLC鉴别,发现同一鉴别方法不适用于3种百部药材,药典收载的3种来源的百部所含生物碱种类差异大,且产地多,同品种不同产地所含的生物碱也不同,很难以同一质量标准进行鉴别。建议对3种基源百部的主产区样品分别建立鉴别方法,以便更好地控制制剂质量。

综上所述,该含量检测分析方法准确可靠,操作简单,重复性好,耐用性高,可作为止咳片中苦杏仁苷的含量测定方法。与止咳片原标准相比,本研究中新增了苦杏仁苷含量测定项目,有助于进一步完善止咳片质量标准,从而为相关国家标准和行业标准的制订提供依据,以保证其临床的安全有效使用。

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,2020:138,290.
- [2] 徐国钧,许璐珊,王峰涛. 常用中药材品种整理和质量研究南方协作组:第二册[M]. 福州:福建科学技术出版社,1994:89.
- [3] 丛晓东,徐国钧,金蓉鸾,等. 百部生药学研究——IX. 中国百部属植物块根中总生物碱的测定与评估[J]. 药学学报,1992,27(7):556-560.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第十三卷第三分册[M]. 北京:科学出版社,2004:254.
- [5] 李俊松,张 彤,蒲益琼. 中国药典一部百部基源的研究[J]. 中药材,2011,34(11):1700-1703.
- [6] 中华人民共和国香港特别行政区卫生署. 香港中药材标准(第八期)[M]. 香港:中华人民共和国特别行政区卫生署,2005:489-511.

(收稿日期:2021-12-13;修回日期:2022-03-10)