

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.16.017

清热八味丸质量标准研究*

刘学良,韩达斌,陈 鹏,年永琪,汪永明,王永晶,刘海青

(青海省药品审评核查中心,青海 西宁 810007)

摘要:目的 提升清热八味丸的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对人工牛黄、红花进行定性鉴别;采用高效液相色谱法同时测定制剂中胡黄连苷 I、胡黄连苷 II 的含量,色谱柱为 Hypersil-ODS 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.15% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 266 nm,柱温为 30℃,进样量为 10 μL。结果 人工牛黄、红花的 TLC 图斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。胡黄连苷 I、胡黄连苷 II 进样量分别在 0.042 58~0.851 6 μg($r=0.999\ 8$)和 0.043 60~0.872 0 μg($r=0.999\ 7$)范围内与峰面积线性关系良好;精密度、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 1.30%,平均加样回收率分别为 106.93% 和 98.34%,RSD 分别为 1.35% 和 1.18%($n=6$)。结论 该方法操作简便,结果准确,重复性好,可用于清热八味丸的质量控制。

关键词:清热八味丸;人工牛黄;红花;薄层色谱法;胡黄连苷 I;胡黄连苷 II;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)16-0069-04

Quality Standard of Qingrebawei Pills

LIU Xueliang, HAN Dabin, CHEN Peng, NIAN Yongqi, WANG Yongming, WANG Yongjing, LIU Haiqing

(Qinghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Xining, Qinghai, China 810007)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Qingrebawei Pills. **Methods** Bovis Calculus Artificatus and Carthami Flos were qualitatively identified by the thin-layer chromatography (TLC) method. The contents of picroside I and picroside II in the preparation were determined simultaneously by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the chromatographic column was thermostatic Hypersil-ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.15% phosphoric acid with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 266 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots of Bovis Calculus Artificatus and Carthami Flos were clear with good separation, and the negative control had no interference. The linear ranges of picroside I and picroside II were 0.042 58-0.851 6 μg ($r=0.999\ 8$) and 0.043 60-0.872 0 μg ($r=0.999\ 7$), respectively. The RSDs of precision, repeatability and stability tests were lower than 1.30%, and the average recoveries of picroside I and picroside II were 106.93% and 98.34% with RSDs of 1.35% and 1.18% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Qingrebawei Pills.

Key words: Qingrebawei Pills; Bovis Calculus Artificatus; Carthami Flos; TLC; picroside I; picroside II; HPLC; content determination

蒙药清热八味丸由石膏、人工牛黄、胡黄连、红花等8味药材制成,有清热解毒功效,主要用于炽热、血热、脏腑之热、肺热咳嗽、痰中带血、肝火肋痛的治疗。始载于《卫生部药品标准·蒙药分册》^[1],现行标准《国家食品药品监督管理局标准》中,检验项目有显微鉴别、理化鉴别及胆酸的含量测定。为了更全面控制该制剂质量,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对方中人工牛黄、红花进行定性鉴别,同时采用高效液相色谱(HPLC)法对方中胡黄连的有效成分胡黄连苷 I、胡黄连苷 II 进行含量测定。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 1525型高效液相色谱仪,包含 Waters 2489型

紫外检测器、Empower 化学工作站(美国 Waters 公司); AB204-S 型、ME204E 型、XS105DU 型十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Lambda 35 型紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司); 硅胶 H、G 薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试药

清热八味丸(内蒙古蒙药股份有限公司,批号分别为 090424, 090614, 100217, 100526, 101022, 101212, 111214); 胡黄连苷 I 对照品(国家标准物质中心,批号为 MUST-11062102, 含量 98%); 胡黄连苷 II 对照品(批号为 111596-201805, 含量 93.2%), 胆酸对照品(批号为 110775-201105, 含量 98.9%), 猪去氧胆酸对照品(批号为 110749-201316, 含量 99.7%), 均购自中

*基金项目:青海省科技计划项目[2020-ZJ747]。

第一作者:刘学良,男,大学本科,副主任药师,研究方向为药品审评,(电子信箱)93684218@qq.com。

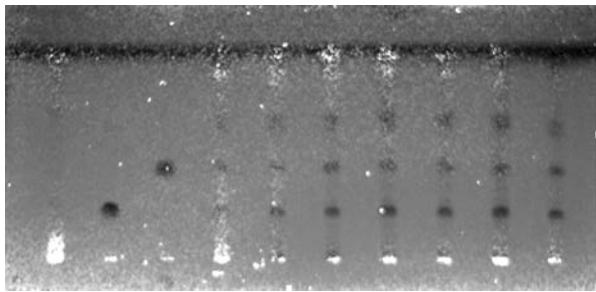
国食品药品检定研究院。乙腈、磷酸、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 人工牛黄^[2-5]

取样品适量,研细,称取粉末0.5 g,精密称定,加乙醇10 mL,振摇15 min,离心,取上清液,作为供试品溶液。取猪去氧胆酸对照品、胆酸对照品各适量,分别加乙醇制成每1 mL含2种成分1 mg的单一对照品溶液。按清热八味丸处方和工艺制备缺人工牛黄的阴性样品,并按供试品溶液方法制成阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,精密吸取上述溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-正己烷-甲醇-冰醋酸(8:1.5:0.25:0.25, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%磷钼酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。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斑点,且阴性对照无干扰。详见图1。



1. 阴性对照品溶液 2. 胆酸对照品溶液 3. 猪去氧胆酸对照品溶液
4-10. 供试品溶液

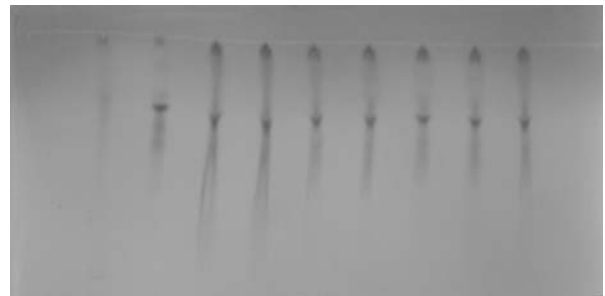
图1 人工牛黄薄层色谱图

1. Negative reference solution 2. Reference solution of cholic acid
3. Reference solution of hydoxycholic acid 4-10. Test solution

Fig.1 TLC chromatogram of Bovis Calculus Artifatus

2.1.2 红花^[6-10]

取样品适量,研细,称取粉末4 g,精密称定,加80%丙酮溶液20 mL,振摇15 min,静置10 min后,取上清液,作为供试品溶液。另取红花对照药材0.5 g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按清热八味丸处方和工艺制备缺红花的阴性样品,并按供试品溶液方法制成阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,精密吸取上述溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶H薄层板上,以乙酸乙酯-水-甲酸-甲醇(7:3:2:0.4, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置日光下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上,显相同颜色主斑点,且阴性对照无干扰。详见图2。



1. 阴性对照品溶液 2. 对照药材溶液 3-9. 供试品溶液

图2 红花薄层色谱图

1. Negative reference solution 2. Reference medicinal material solution
3-9. Test solution

Fig.2 TLC chromatogram of Carthami Flos

2.2 胡黄连苷含量测定^[11-17]

2.2.1 色谱条件

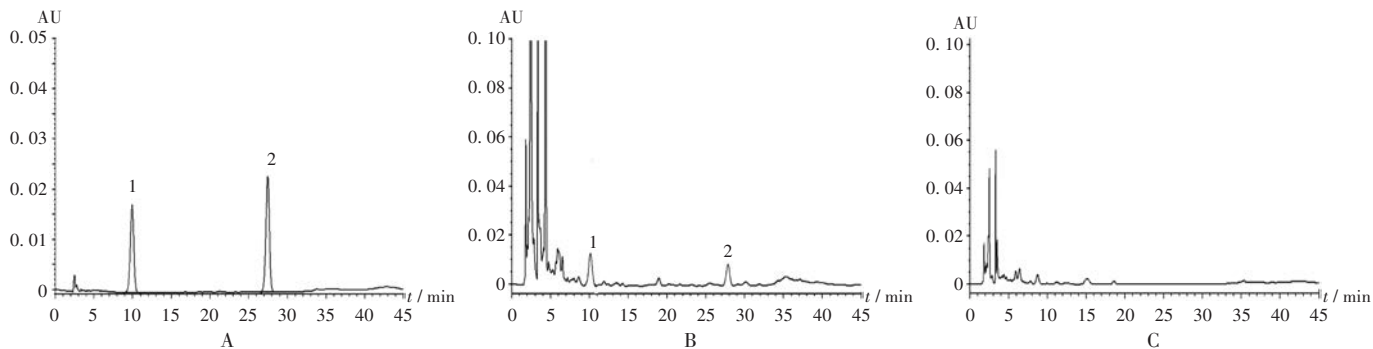
色谱柱:Hypersil-ODS柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.15%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~7 min时22%A $\rightarrow$ 17%A,7~14 min时17%A,14~15 min时17%A $\rightarrow$ 19%A,15~30 min时19%A $\rightarrow$ 20%A,30~45 min时20%A $\rightarrow$ 22%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:266 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液制备

取胡黄连苷I对照品10.86 mg、胡黄连苷II对照品11.70 mg,精密称定,分别置50 mL容量瓶中,加甲醇溶解、定容,摇匀,即得胡黄连苷I,II质量浓度分别为0.212 9,0.218 0 mg/mL的单一对照品溶液。各取4 mL,置20 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得胡黄连苷I,II质量浓度分别为0.0425 8,0.0436 0 mg/mL的混合对照品溶液。取样品(批号100217)适量,研细,取1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率50 kHz)处理30 min,放冷,再称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按清热八味丸处方工艺制备缺胡黄连的阴性样品,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:精密吸取2.2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μ L,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果待测成分与样品中其他成分分离良好,理论板数按胡黄连苷II峰计应不低于3 000,阴性对照品溶液在与对照品溶液相同保留时间



1. 胡黄连苷Ⅱ 2. 胡黄连苷Ⅰ
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Picroside I 2. Picroside II
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 3 HPLC chromatograms

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项下混合对照品溶液1,2,4,8,12,20 μL ,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($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,胡黄连苷Ⅰ为 $Y_1 = 1\,738\,693 X_1 + 9\,175 (r = 0.999\,8)$,胡黄连苷Ⅱ为 $Y_2 = 1\,286\,879 X_2 + 1\,344 (r = 0.999\,7)$ 。结果表明,胡黄连苷Ⅰ和Ⅱ进样量分别在0.042 58~0.851 6 μg 和0.043 60~0.872 0 μg 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10 μL ,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果胡黄连苷Ⅰ和Ⅱ峰面积的RSD分别为0.65%和0.52% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2.2项下供试品溶液10 μL ,室温下按2.2.1项下色谱条件分别于第0,3,6,12,18,24 h进样测定,记录峰面积。结果胡黄连苷Ⅰ和Ⅱ峰面积的RSD分别为1.22%和1.06% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品(批号100217)适量,精密称定,共5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,记录峰面积并计算含量。结果胡黄连苷Ⅰ和Ⅱ的平均含量分别为1.049 0 mg/g和1.722 4 mg/g, RSD分别为1.12%和0.86% ($n = 5$),表明该方法重复性良好。

加样回收试验:称取样品(批号100217)适量,研细,精密称定,共6份,分别精密加入2.2.2项下胡黄连苷Ⅰ和Ⅱ单一对照品溶液,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 ($n = 6$)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
胡黄连	1.003 4	0.722 3	0.775 5	1.551 4	106.91	106.93	1.35
苷Ⅰ	0.996 9	0.717 7	0.775 5	1.540 1	106.05		
	1.002 7	0.721 8	0.775 5	1.566 1	108.87		
	1.010 2	0.727 2	0.775 5	1.545 4	105.51		
	0.997 5	0.718 1	0.775 5	1.538 3	105.76		
胡黄连	1.001 6	0.721 1	0.775 5	1.562 5	108.50	98.34	1.18
苷Ⅱ	1.003 4	1.529 3	1.526 0	2.999 4	96.34		
	0.996 9	1.519 4	1.526 0	3.042 1	99.78		
	1.002 7	1.528 2	1.526 0	3.032 7	98.59		
	1.010 2	1.539 6	1.526 0	3.033 8	97.92		
	0.997 5	1.520 3	1.526 0	3.031 5	99.03	98.40	
	1.001 6	1.526 5	1.526 0	3.028 1	98.40		

2.2.4 样品含量测定

取7批样品各适量,分别按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,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n = 3$)

Tab. 2 Results of content determination of picroside I and picroside II in samples ($n = 3$)

批号	胡黄连苷Ⅰ		胡黄连苷Ⅱ		总含量(mg/g)
	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)	
112214	0.984 5	1.12	1.733 0	0.98	2.717 5
101022	1.085 2	0.95	2.141 9	1.28	3.227 1
101212	1.094 7	0.67	2.136 9	0.79	3.231 6
100217	1.049 0	0.84	1.722 4	0.67	2.771 4
100526	1.365 6	1.21	1.587 0	1.32	2.952 6
090614	1.520 4	0.94	2.321 8	1.27	3.842 2
090424	1.452 1	1.14	2.275 9	1.59	3.728 0

3 讨论

清热八味丸方中,人工牛黄可清热解毒、化痰定惊^[18],红花可活血通经、散瘀止痛^[19],胡黄连可清热燥湿、泻火解毒、通经利尿,且胡黄连中胡黄连苷 I 和 II 是其主要活性成分,具有较好的清热、杀菌及利尿作用^[20],与清热八味丸清热解毒功效一致。本研究中基于预试验中对提取溶剂、提取方法、提取时间等因素进行的考察,建立了清热八味丸方中人工牛黄、红花的 TLC 鉴别方法,胡黄连中胡黄连苷 I 和 II 的 HPLC 定量检测方法,可为今后研究清热八味丸质量标准提供依据。

含量测定预试验中,参考相关文献,同时结合胡黄连苷 I 和 II 对照品溶液的紫外光谱扫描结果,选择紫外检测波长为 266 nm。同时分别对甲醇-0.10%冰醋酸溶液、甲醇-0.15%磷酸溶液、乙腈-0.15%磷酸溶液 3 种流动相进行考察,结果以乙腈-0.15%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时基线较平稳,对待测组分峰无干扰,故选择。

清热八味丸方中八味药材处方量相同,均为药材原粉入药制成水丸,胡黄连占处方总量的 12.5%,2020 年版《中国药典(一部)》中规定,胡黄连中胡黄连苷 I 与胡黄连苷 II 的总量不得少于 9.0%^[21],原粉入药转移率按 90% 计算,得样品中两者总量的理论值下限为 10.125 0 mg/g,而本研究中 7 批样品的含量为 2.718 2~3.842 2 mg/g,明显低于理论值下限。分析原因,清热八味丸现行质量标准中未对胡黄连进行控制,企业在生产过程中可能存在以次充好或投料不足的情况。

清热八味丸与清热八味散、清热八味胶囊均收载于《卫生部药品标准·蒙药分册》,药味相同,处方量略有差异,但清热八味系列 3 种制剂的质量标准控制项目差异较大,部分项目制定的控制指标不尽合理。2020 年版《中国药典》中对胡黄连苷 I 和 II 的含量进行控制,然而,清热八味胶囊现行标准中仅以肉桂酸的含量作为质量控制指标,不合理,也缺少代表性。后续制订的控制指标要考虑与其功能主治紧密结合,可考虑同时对 3 种剂型的清热八味制剂进行研究,尽量建立较统一、完善的质量标准。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准:蒙药分册[M]. 北京:中华人民共和国卫生部,1995:174.
- [2] 兰婉玲,张罗红,徐燕. 牛黄解毒片中人工牛黄的薄层鉴别[J]. 中药与临床,2010,1(3):26-27.
- [3] 叶蓓蓓,潘莉,王栋,等. 薄层扫描法同时测定人工牛黄中胆酸及猪去氧胆酸的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(4):

706-709.

- [4] 何建锋,刘红,余卫兵,等. 小儿至宝丸中陈皮、人工牛黄及广藿香的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业,2010,19(17):34-35.
- [5] 赵萨茹拉,包庆格乐吐,贺喜格达来,等. 蒙药方剂古日古木-13 中的西红花和人工牛黄的薄层色谱定性鉴别[J]. 北方药学,2016,13(10):11-12.
- [6] 姚东,包永睿,王帅,等. 芦黄参花胶囊质量标准研究[J]. 中国医药导报,2017,14(1):8-11.
- [7] 罗兰,李明丽,康家珍,等. 脑得生固体分散体胶囊的质量控制研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(7):1151-1154.
- [8] 色珍,边巴顿珠,扎西顿珠,等. 藏药股乃贡炯散剂的质量标准研究[J]. 中国民族医药杂志,2020,16(12):27-29.
- [9] 钱宇,巴俊杰,田静. 蒙药清热八味散的鉴别[J]. 中国民族医药杂志,2008,14(1):53-54.
- [10] 康松松,杨雪苗,冯智翔,等. 蒙药古日古木-13 丸质量标准研究[J]. 包头医学院学报,2021,37(5):113-116.
- [11] 石欣,鲍劲松,白雅静. RP-HPLC 法测定清热八味胶囊中胡黄连苷 I 的含量[J]. 中国民族医药杂志,2011,17(3):52-54.
- [12] 田香,丁瑞雪,巴根那,等. 蒙药地格达-4 味汤指纹图谱及多指标成分定量分析研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(19):3962-3968.
- [13] 鄂秀辉,张可佳,陈玉,等. 双波长-UPLC 法同时测定胡黄连中 4 个环烯醚萜类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2019,39(12):2254-2260.
- [14] 林林,刘广楨,于凤蕊,等. 高效液相色谱法同时测定乙肝解毒胶囊中 12 种成分的含量[J]. 中国药学杂志,2020,55(7):557-561.
- [15] 李依哲. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定清热八味胶囊中 8 个成分的含量及主成分分析[J]. 中国药师,2021,24(6):1161-1166.
- [16] 吴华燕,薛海兵,张刘强,等. 水蔓菁中 5 种主要化学成分的分离及含量测定[J]. 中国新药与临床药理,2021,32(7):1012-1018.
- [17] 赵丽娜,籍学伟,王玉华. 蒙成药小儿清肺八味丸的质量控制方法研究[J]. 中国民族民间医药,2020,29(3):27-32.
- [18] 易登峰,宋卫星,龙四清,等. HPLC 法测定人工牛黄中胆红素的含量[J]. 中医药导报,2018,24(13):60-61.
- [19] 范胜莲,刘光兴. 不同干燥方法对红花中羟基红花黄色素 A、山奈素及红花黄色素 A 含量的影响[J]. 中国药师,2020,23(6):1198-1200.
- [20] 黄林清,张恩娟,王军. 胡黄连的研究进展[J]. 中国药业,2007,16(7):1-2.
- [21] 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,2020:253.

(收稿日期:2021-10-18;修回日期:2022-02-27)