

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)06-0071-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.017



射干抗病毒口服液薄层色谱鉴别优化研究*

白玲玲, 李泽平, 彭晨, 苏华, 贾佳[△]

(中国人民解放军东部战区总医院, 江苏 南京 210002)

摘要:目的 优化射干抗病毒口服液中7种药材的薄层色谱(TLC)鉴别法。方法 参照2020年版《中国药典》及相关文献,改进制剂中射干、茵陈的TLC鉴别法,增加柴胡、金银花、蒲公英、大青叶、板蓝根的TLC鉴别法。结果 TLC图主斑点清晰,分离度好,且阴性对照无干扰。结论 所建立的TLC法具有点样量少、重复性好、检测效率高等优点,可用于射干抗病毒口服液的质量控制。

关键词:射干抗病毒口服液;薄层色谱法;质量控制

Optimization of TLC Identification Method for Shegan Antivirus Oral Liquid

BAI Lingling, LI Zeping, PENG Chen, SU Hua, JIA Jia

(General Hospital of Eastern War Zone, Nanjing, Jiangsu, China 210002)

Abstract: Objective To optimize the thin-layer chromatography (TLC) method for the identification of seven medicinal materials in Shegan Antivirus Oral Liquid. **Methods** With reference to the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition) and relevant literature, the TLC identification methods of *Belamcandae Rhizoma* and *Artemisiae Scopariae Herba* in the preparation were improved, and the TLC identification methods of *Bupleuri Radix*, *Lonicerae Japonicae Flos*, *Taraxaci Herba*, *Isatidis Folium* and *Isatidis Radix* were established. **Results** The main TLC spots were clear with good separation, and the negative control had no interference. **Conclusion** The established TLC methods have the advantages of small sample injection volume, good repeatability and high detection efficiency, which can be used for the quality control of Shegan Antivirus Oral Liquid.

Key words: Shegan Antivirus Oral Liquid; TLC; quality control

射干抗病毒注射液由射干、柴胡、大青叶、板蓝根、蒲公英、金银花、茵陈、佩兰等8味中药制成,具有抗病毒、抗菌作用^[1]。目前该处方的市售剂型仅有注射剂,常引起过敏反应^[2],临床应用受限。我院拟将其研发为口服液制剂,该剂型能在保证疗效的同时减少中药注射液的不良反应^[3],从而提高患者的顺应性。本研究中分析了射干抗病毒口服液中各药味的理化性质,参考2020年版《中国药典》及有关文献报道,对制剂中射干^[4]、柴胡、大青叶、板蓝根、金银花、蒲公英、茵陈药材的薄层色谱(TLC)鉴别法进行优化,便于控制制剂的质量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

HH-6型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Mettler AE240型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司); ZF-7N型智能暗箱式三用紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.2 试药

射干抗病毒口服液(我院自制,批号分别为20210616, 20210617, 20210618); 射干、柴胡、板蓝根、大青叶、茵陈、金银花及蒲公英的对照药材(批号分别为120994-201206, 120992-201509, 121177-201608, 121367-201403, 121555-201602, 121060-201608, 121195-202004), 靛玉红对照品(含量为99.1%, 批号为110717-202106), 均购自中国食品药品检定研究院; 试验所用试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 TLC鉴别条件优化

2.1 药材TLC鉴别

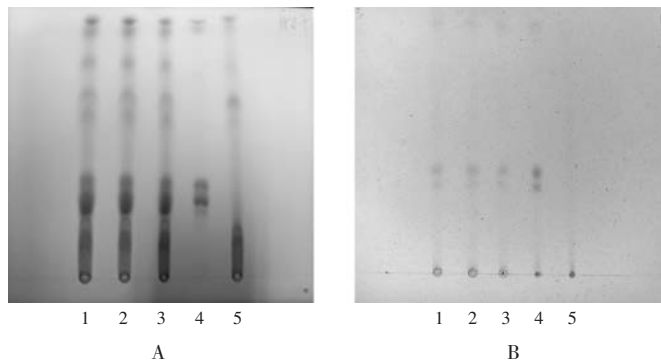
射干^[4]: 取3批样品各20 mL, 用乙酸乙酯萃取2次, 每次20 mL, 合并乙酸乙酯提取液, 蒸干, 加1 mL甲醇溶解, 作为供试品溶液。取射干对照药材粉末1 g, 加水30 mL, 超声(功率250 W, 频率40 kHz, 下同)处理30 min, 滤过, 同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按射干抗病毒口服液处方和工艺制备缺射干的阴性样品, 然后按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法, 吸

*基金项目: 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题重点项目[14ZJZ08]。

第一作者: 白玲玲, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为院内中药制剂薄层鉴别, (电子信箱) 544405467@qq.com。

[△]通信作者: 贾佳, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药制剂研发及管理, (电子信箱) jiajia_nz@126.com。

取上述溶液各6 μL ,分别点样于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-冰醋酸(20:3:0.2, $V/V/V$)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2%三氯化铁乙醇,置日光灯下检视。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斑点,分离度较好,且阴性对照无干扰,与原鉴别图谱比较优势明显。详见图1。

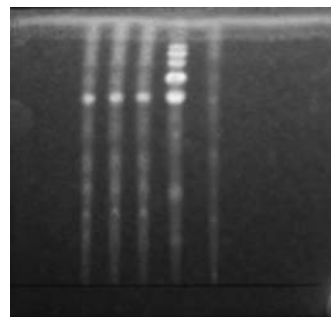


A. 优化前 B. 优化后
1-3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5. 阴性对照品溶液
图1 射干薄层色谱图谱
A. Before the optimization B. After the optimization
1-3. Test solution 4. Reference medicinal material solution
5. Negative reference solution

Fig.1 TLC chromatograms of Belamcandae Rhizoma

柴胡^[5-7]:取样品20 mL,用乙醚萃取2次,每次20 mL,弃去乙醚液,用水饱和正丁醇萃取2次,每次20 mL,合并正丁醇提取液,用25 mL氨试液洗涤后回收正丁醇液,蒸干,用1 mL甲醇溶解,作为供试品溶液。取柴胡对照药材0.5 g,加水50 mL煎煮1 h,放冷,滤过,滤液自“用水饱和正丁醇萃取2次”起,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按射干抗病毒口服液处方和工艺制备缺柴胡的阴性样品,再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)》通则0502薄层色谱法,吸取供试品溶液和阴性对照品溶液各4 μL ,对照药材溶液5 μL ,分别点样于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, $V/V/V$)的下层溶液为展开剂,于10 $^{\circ}\text{C}$ 以下放置30 min,展开,取出,晾干,喷以2%二甲氨基苯甲醛的40%硫酸试液,60 $^{\circ}\text{C}$ 下加热至斑点显色清晰,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斑点,分离度较好,且阴性对照无干扰。详见图2。

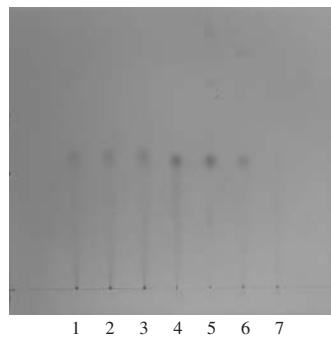
大青叶和板蓝根^[8-9]:取样品20 mL,加乙醚提取2次,每次15 mL,弃去水液,合并乙醚液,滤过,滤液蒸干,加1 mL三氯甲烷溶解,作为供试品溶液。取靛玉红对照品适量,加三氯甲烷制成每1 mL含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。取大青叶和板蓝根对照药材各1 g,分别采用乙醚30 mL超声提取30 min,滤过后,滤液蒸干,加三



1 2 3 4 5
1-3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5. 阴性对照品溶液
图2 柴胡薄层色谱图
1-3. Test solution 4. Reference medicinal material solution
5. Negative reference solution

Fig.2 TLC chromatograms of Bupleuri Radix

氯甲烷2 mL溶解,作为对照药材溶液。按射干抗病毒口服液处方和工艺制备同时缺大青叶和板蓝根的阴性样品,再按供试品溶液制备同时同时方法制成阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法,吸取供试品溶液、阴性对照品溶液、大青叶对照药材溶液各4 μL ,靛玉红对照品溶液2 μL ,板蓝根对照药材溶液6 μL ,分别点样于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-三氯甲烷-丙酮(5:4:2, $V/V/V$)为展开剂,展开,取出,晾干,于日光灯下检视。结果供试品溶液色谱中,在与大青叶、板蓝根对照药材溶液和靛玉红对照品溶液色谱相应位置分别显相同颜色斑点,且阴性对照无干扰。详见图3。



1 2 3 4 5 6 7
1-3. 供试品溶液 4. 靛玉红对照品溶液 5. 大青叶对照药材溶液 6. 板蓝根对照药材溶液 7. 阴性对照品溶液
图3 大青叶和板蓝根薄层色谱图
1-3. Test solution 4. Indirubin reference solution 5. Reference medicinal material solution of Isatidis Folium 6. Reference medicinal material solution of Isatidis Radix 7. Negative reference solution

Fig.3 TLC chromatograms of Isatidis Folium and Isatidis Radix

茵陈、金银花和蒲公英^[4,10]:取样品20 mL,用乙酸乙酯萃取2次,每次15 mL,弃去水液,合并乙酸乙酯液,蒸干,加1 mL甲醇溶解,作为供试品溶液。取茵陈对照药材1.5 g、金银花对照药材1.0 g和蒲公英对照药材0.5 g,分别以30 mL水为提取溶剂,80 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取1 h,

滤过后用乙酸乙酯萃取2次,每次15 mL,合并乙酸乙酯液并蒸干,用1 mL甲醇溶解,制成单一对照药材溶液。按射干抗病毒口服液处方和工艺制备缺茵陈的阴性样品,以及同时缺金银花、蒲公英和茵陈3味药材的阴性样品,再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)》通则0502薄层色谱法,吸取供试品溶液和阴性对照品溶液各3 μ L、茵陈对照药材溶液5 μ L,分别点样于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(6:4:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,于紫外光灯(365 nm)下检视。结果,以缺茵陈的阴性对照品溶液进行鉴别时,有明显的阴性干扰(图4 A)。分析可能是制剂处方中含相似有效成分,与茵陈结构相似的成分也被提取出来所致。供试品溶液色谱与茵陈对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色荧光斑点,缺茵陈的阴性样品有此斑点,而缺金银花、蒲公英和茵陈的阴性样品无此斑点(图4 B)。结果表明,如需鉴别金银花、蒲公英和茵陈,制备阴性样品时应同时去除金银花、蒲公英和茵陈,以保证阴性对照无干扰。

2.2 展开系统优化

贾佳等^[4]的研究中以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(6:4:1, V/V/V)为展开剂进行茵陈TLC鉴别,但甲苯毒性大,故本研究中基于金银花、蒲公英和茵陈的化学成分,寻找极性合适、毒性较小的溶剂作为展开剂。先后考察了乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5, V/V/V;展开剂1),环己烷-甲酸乙酯-甲酸(6:5:1, V/V/V;展开剂2)和环己烷-甲酸乙酯-甲酸(6:7:1, V/V/V;展开剂3)。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法,吸取“茵陈、金银花和蒲公英”项下供试品溶液和同时

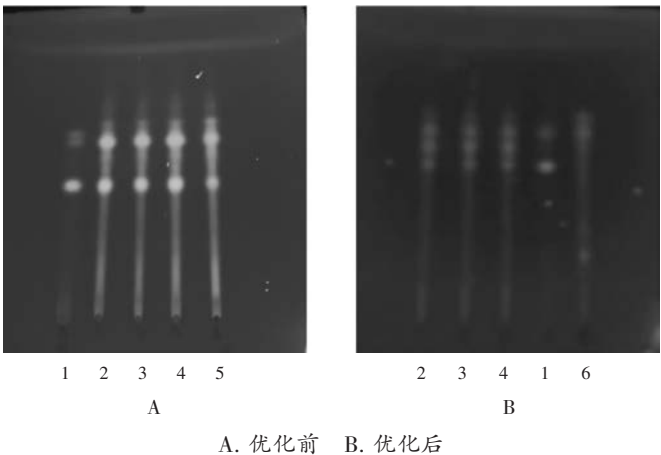


图4 金银花、蒲公英和茵陈薄层色谱图

A. Before the optimization B. After the optimization

1. Reference medicinal material solution of Artemisiae Scopariae Herba
2-4. Test solution 5. Negative reference solution lacking of Artemisiae Scopariae Herba 6. Negative reference solution lacking of Lonicerae Japonicae Flos, Taraxaci Herba and Artemisiae Scopariae Herba

Fig. 4 TLC chromatograms of Lonicerae Japonicae Flos, Taraxaci Herba and Artemisiae Scopariae Herba

缺金银花、蒲公英和茵陈阴性对照品溶液各3 μ L、茵陈、蒲公英和茵陈对照药材溶液各4 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板,依次以上述展开系统为展开剂,展开,取出,晾干,于紫外光灯(365 nm)下检视。当采用药典收录的展开剂1时,大部分成分未能很好地展开,且阴性对照有干扰,展开时间较长(图5 A);当采用展开剂2时,展开过程出现分层现象,部分成分未能很好地分离(图5 B);当采用展开剂3时,斑点清晰,分离度较好,阴

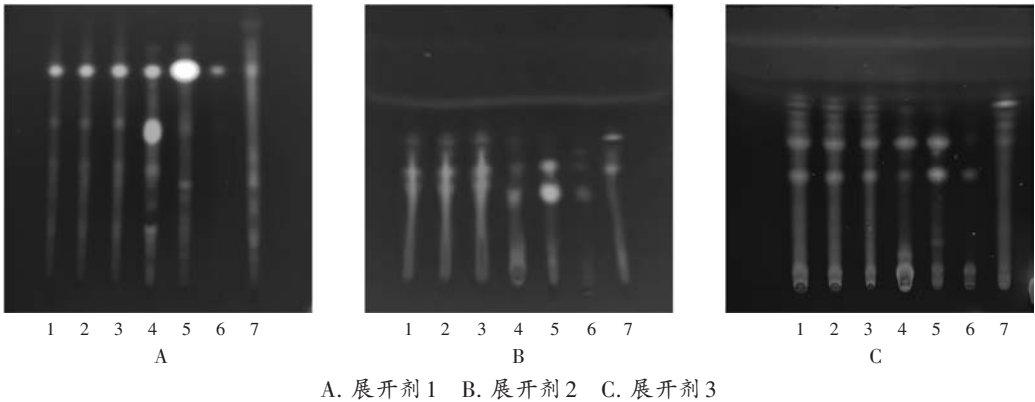


图5 展开系统优化薄层色谱图

A. Developing solvent 1 B. Developing solvent 2 C. Developing solvent 3

1-3. Test solution 4. Reference medicinal material solution of Lonicerae Japonicae Flos 5. Reference medicinal material solution of Taraxaci Herba
6. Reference medicinal material solution of Artemisiae Scopariae Herba 7. Negative reference solution lacking of Artemisiae Scopariae Herba, Lonicerae Japonicae Flos and Taraxaci Herba

Fig. 5 TLC chromatograms of the optimized developing system

性对照无干扰(图5C),比移值适中,且环己烷毒性比甲苯小,故选用展开剂3。

3 讨论

射干抗病毒口服液处方中,射干为君药,其性寒,味苦,具有清热解毒、消痰、利咽及消瘀散结功效,主要用于治疗热毒痰火郁结、痰咳气喘、痰涎壅盛及咽喉肿痛^[11],在许多咽喉疾病的传统方剂中亦为君药。射干主要的化学成分为黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗病毒、抗真菌、抗炎等药理活性^[12];加之金银花以增强清热解毒,兼具疏散风热之功^[13];辅之板蓝根和大青叶以清解风热疫毒^[9,14];同时方中配以蒲公英既有清热解毒、消肿散结,又能利尿通淋^[15];再以苦泄下降的茵陈增强清解脾胃肝胆湿热^[16];此外,处方中还加入了疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的柴胡^[17];醒脾开胃、发表解暑、气味芳香的佩兰^[18]。因此,该处方有明确的抗病毒和抑菌抗炎功效,但目前关于其质量控制的研究较少。相关标准中仅有紫外双波长分光光度法测定该注射剂的绿原酸含量^[19]。为进一步完善该药品质量标准,确保药品质量稳定可控,本研究中在贾佳等^[4]的研究基础上,对射干和茵陈的TLC鉴别进行优化,并增加柴胡、大青叶、板蓝根、金银花和蒲公英TLC的鉴别方法。

与我院前期的射干TLC鉴别方法比较^[4],本研究中简化了射干TLC鉴别方法,即减少点样量和喷完显色剂后直接检视。结果表明,供试品溶液色谱在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色斑点,所得斑点更清晰,分离度更好,重复性好,且阴性对照无干扰。本研究中参考2020年版《中国药典(一部)》及朱田密等^[6]的研究改进柴胡TLC鉴别方法,最终确定以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)为展开剂;同时对柴胡加热温度做了优化试验,通过喷以2%二甲氨基苯甲醛的40%硫酸试液后,考察了105, 80, 60℃加热条件,结果加热温度过高时斑点会糊化,故选择60℃加热。而在对大青叶进行TLC鉴别时发现阴性对照有明显干扰。且在实际操作过程中,以靛玉红和靛蓝为对照品进行TLC鉴别时,靛玉红斑点颜色清晰,而靛蓝易氧化褪色,不易观察,故本研究中选择靛玉红为对照品。板蓝根和大青叶主要来源于十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根和叶,均含有共同成分靛玉红和靛蓝^[9,20-21]。故在制备阴性样品时同时除去板蓝根和大青叶,结果TLC中各有效成分斑点清晰,阴性对照无干扰,方法专属性较强。茵陈鉴别,本研究中验证贾佳等^[4]对茵陈的TLC鉴别时,发现阴性对照有明显干扰,可能因为以乙酸乙酯萃取时萃取出与绿原酸结构相似的成分^[22]。对此,本研究中采用“三阴性”法同时去除茵陈、金银花和蒲公英药材,以保证试验有效。因为展开体系中甲苯的毒性大,故选择低毒的环己烷代替甲苯。通过调节展开体系的比例,最终确定展开体系为环己烷-甲酸乙酯-甲酸(6:7:1, V/V/V),结果显示色谱斑点

清晰,分离度良好,且阴性对照无干扰。

综上所述,本研究中所建立的TLC法具有点样量少、重复性好、检测效率高等优点,可用于射干抗病毒口服液的质量控制。

参考文献

- [1] 石磊,姬志强,康文艺. 射干抗病毒注射液的临床应用[J]. 中国药房,2012,23(35):3359-3360.
- [2] 张瑞瑞,刘艳萍,聂西周,等. 射干抗病毒注射液致类过敏反应初步研究[J]. 世界中医药,2016,11(4):682-685.
- [3] 夏正学,夏恒夫,段大航,等. 口服射干抗病毒注射液治疗急性上呼吸道感染172例临床观察[J]. 中国民康医学,2005,17(7):367-368.
- [4] 贾佳,陈翠,苏华,等. 射干抗病毒口服液的质量控制研究[J]. 中国药业,2013,22(10):67-68.
- [5] 蔡远东. 妇科得生丸中木香及柴胡的薄层鉴别方法研究[J]. 现代养生,2016(24):258.
- [6] 朱田密,周从辉,陈树和,等. 柴胡薄层鉴别常用法在新制剂研发中的应用[J]. 海峡药学,2021,33(6):37-39.
- [7] 崔庆艳,杨怀雷,刘敏,等. 儿童抗病毒颗粒质量标准研究[J]. 特产研究,2018,40(2):47-51.
- [8] 任莹,李大刚,王虎,等. 热毒宁口服液质量标准研究[J]. 中国药业,2021,30(3):49-52.
- [9] 徐艳,刘辛. 板蓝根中靛玉红的含量测定及其影响因素分析[J]. 时珍国医国药,2008,19(5):1122-1123.
- [10] 张世晓,张星星,王香粉,等. 四味降酶片的质量标准研究[J]. 中国药房,2018,29(8):1040-1043.
- [11] 梁晓莲,桂雄斌,陈勇,等. 射干化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊,2022,40(5):158-167.
- [12] 廖晓光. 射干三味清颗粒的药学研究[D]. 南宁:广西大学,2019.
- [13] 白丽红,邹宇. 金银花的药理分析与应用[J]. 中国现代药物应用,2011,5(4):159-160.
- [14] 班燕桃,严明,严寒,等. 四味穿心莲散中大青叶的薄层色谱定性鉴别方法[J]. 中国兽药杂志,2020,54(5):25-29.
- [15] 陈瑞军,王秋元,喇孝瑾,等. 蒲公英药用研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2021,30(5):563-567.
- [16] 黄丽平,许远航,邓敏贞,等. 茵陈的化学成分、药理作用机制与临床应用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2021,33(4):676-690.
- [17] 贾佳,苏倩雯,徐云燕,等. 射干抗病毒口服液与注射液的镇痛作用比较[J]. 东南国防医药,2016,18(1):51-53.
- [18] 宋杨. 佩兰和射干抗病毒注射液HPLC研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009.
- [19] 索银科,罗兰. HPLC法测定射干抗病毒注射液中绿原酸和咖啡酸的含量[J]. 中国药事,2010,24(4):386-388.
- [20] 王林,陈献忠,马霞,等. 四味穿心莲超微粉的薄层鉴别研究[J]. 中国兽药杂志,2017,51(2):24-28.
- [21] 罗巍伟,贺英菊,王凌,等. HPLC测定板蓝根提取物中靛蓝和靛玉红的含量[J]. 华西药学杂志,2004,19(6):455-456.
- [22] 万月生. 射干和射干抗病毒注射液的质量控制研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2004.

(收稿日期:2022-06-02;修回日期:2022-09-26)