

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)17-0075-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.17.018



凉解感冒合剂质量标准研究*

陈芳¹, 樊宝娟^{1△}, 呼延婷婷^{1,2}, 黄艳¹, 王梦琪¹, 罗定强¹

(1. 陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065; 2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 提升凉解感冒合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中的桔梗、马勃进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中腺苷的含量,色谱柱为 Agilent-5TC-C₁₈(2)柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-水(5:4:91, V/V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 260 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 薄层色谱图中特征斑点清晰,分离良好,且阴性对照无干扰。腺苷进样量在 18.944 0~236.800 0 ng 范围内与峰面积线性关系良好($r=1.000 0, n=6$);精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均不大于 2.05%;平均加样回收率为 103.77%,RSD 为 0.49%($n=6$)。10 批样品中腺苷的平均含量为每支 0.56 mg。结论 该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于凉解感冒合剂的质量控制。

关键词:凉解感冒合剂;薄层色谱法;高效液相色谱法;腺苷;质量控制

Quality Standard of Liangjie Ganmao Mixture

CHEN Fang¹, FAN Baojuan¹, HUYAN Tingting^{1,2}, HUANG Yan¹, WANG Mengqi¹, LUO Dingqiang¹

(1. Shaanxi Provincial Institute of Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Key Laboratory of Drug Microbiological Detection Technology of State Drug Administration, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Liangjie Ganmao Mixture. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used for the qualitative identification of Platycodonis Radix and Lasiosphaera in the preparation. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of adenosine in the preparation. The chromatographic column was Agilent 5TC C₁₈(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-acetonitrile-water (5:4:91, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots were clear with good separation, and the negative control has no interference. The linear range of adenosine was 18.944 0-236.800 0 ng ($r=1.000 0, n=6$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were not higher than 2.05%. The average recovery of adenosine was 103.77% with an RSD of 0.49% ($n=6$). The average content of adenosine in 10 batches of samples was 0.56 mg per tube. **Conclusion** The method is simple, accurate, and reproducible, which can be used for the quality control of Liangjie Ganmao Mixture.

Key words: Liangjie Ganmao Mixture; TLC; HPLC; adenosine; quality control

凉解感冒合剂由大青叶、牛蒡子、紫荆皮、荆芥等 药材组方,用于治疗风热感冒引起的发热、恶风、头痛、

*基金项目:国家药典委员会2015年《中国药典》药品标准提高项目[2015-380];陕西省重点研发计划项目[2022SF-572]。

第一作者:陈芳,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药学与中药药理学,(电话)029-62288444(电子信箱)18629351130@163.com。

△通信作者:樊宝娟,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药材及中成药质量标准,(电子信箱)5516281@qq.com。

- [8] 关欣,王鹤辰,包永睿,等. 灰色关联分析中药蒲公英不同部位对RAW264.7细胞的抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2021,38(11):1354-1357.
- [9] 张睿. 灰色关联分析与主成分分析综合评价不同产地柴胡质量[J]. 中国药师,2017,20(8):1356-1359.
- [10] 许晓莉,李彩霞,吴瑞枫. 多指标综合评分结合响应面法优选脂康颗粒提取工艺[J]. 中国药业,2021,30(19):43-47.
- [11] 赵建芬,刘钊,张颖. RP-HPLC法测定香茅油的主要成分[J]. 中国食品添加剂,2014,32(7):179-183.
- [12] 何凤,严建良,吴孔松,等. HPLC法测定肠炎宁颗粒中芦丁、迷迭香酸的含量[J]. 海峡药学,2022,34(3):86-89.
- [13] 林方芬,黄曦,黄笑夏. 灰色关联分析评价不同产地金果榄质量[J]. 中国药师,2021,24(10):1942-1945.
- [14] 冯治国,赵祺,朱强,等. 基于熵权法和灰色关联分析法评价安徽省不同产地黄精药材质量[J]. 中草药,2021,52(12):3689-3695.
- [15] 孙全,徐冲,刘霞,等. 基于指纹图谱及化学识别模式的乌梅炮制品质量评价[J]. 中国药业,2019,28(9):18-20.
- [16] MEHAT NM, KAMARUDDIN S, OTHMAN AR. Hybrid Integration of Taguchi Parametric Design, Grey Relational Analysis, and Principal Component Analysis Optimization for Plastic Gear Production[J]. Chinese Journal of Engineering, 2014(3): 1-11.

(收稿日期:2022-10-14;修回日期:2023-03-30)

鼻塞流涕、咳嗽、咽喉肿痛等症,具有解表、清热、宣肺、利咽等功效。方中,马勃善清肺热,与桔梗合用有开宣肺气、清利咽喉、止咳祛痰之效;薄荷疏散风热,解毒透疹,清利头目;牛蒡子宣肺发疹,清咽利喉;大青叶清热解表,凉血解毒;紫荆皮清热解毒,利湿;荆芥辛温,开泄腠理,疏散邪气。全方药味组成较复杂,涉及辛凉解表、清热解毒、清利咽喉、宣畅肺气等,质量标准很难用单一指标体现^[1]。为了全面、有效地控制制剂质量,本研究中对方中的桔梗、马勃药材进行了薄层色谱(TLC)鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法测定君药大青叶中腺苷的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Alliance HT型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);UV-2550型双光束紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Sartorius BS224S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,精度为万分之一);AE-240型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为十万分之一);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz);F2型恒温水浴箱(北京化玻联医疗器械有限公司)。

1.2 试药

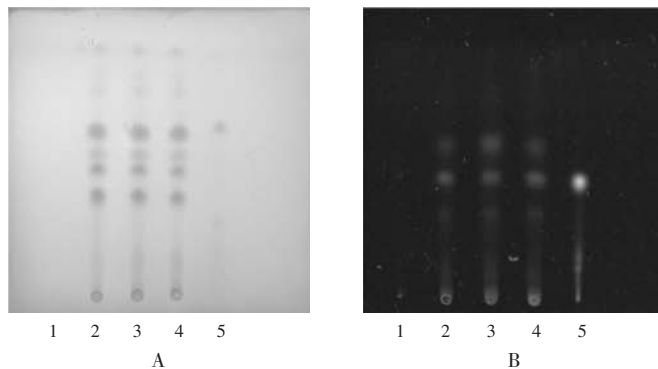
桔梗对照药材(批号为121028-201411),马勃对照药材(批号为121417-201302),腺苷对照品(批号为110879-200202,纯度为99.7%),均购自中国食品药品检定研究院;凉解感冒合剂(陕西白鹿制药股份有限公司,规格为每支10 mL,批号分别为150504,150505,150507,150508,150903,150905,150906,151206,151207,151210);硅胶G(青岛海洋化工厂);乙腈、甲醇(色谱纯,美国天地公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯(西安化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

桔梗^[2-5]:取样品10 mL,加7%硫酸乙醇-水溶液(1:1, V/V)20 mL,加热回流3 h,放至室温,用三氯甲烷提取2次,每次20 mL,合并提取液,用水洗涤2次,每次30 mL,弃去洗液,提取液用无水硫酸钠脱水,滤过,滤液回收溶剂至干,残渣加1 mL甲醇使溶解,即得供试品溶液。对照药材按处方工艺进行前处理,加水30 mL,加热回流30 min,取滤液,同法制备桔梗对照药材溶液。按处方比例和工艺制备不含桔梗的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法^[6]试验,吸取对照药材溶液5 μ L、供试品溶液和阴性对照品溶液各10 μ L,点于同一硅胶G薄层板,以三氯甲烷-乙醚(2:1, V/V)为展开剂,展开,取

出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液显色,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。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色完全一致,特征斑点清晰,分离良好,无拖尾,且阴性对照无干扰。详见图1 A。



1. 阴性对照品溶液 2-4. 供试品溶液 5. 对照药材溶液
A. 桔梗 B. 马勃(365 nm)

图1 薄层色谱图

1. Negative reference solution 2-4. Test solution 5. Reference solution of medicinal materials
A. Platycodonis Radix B. Lasiosphaera (365 nm)

Fig. 1 TLC chromatograms

马勃^[7-10]:取样品10 mL,60 $^{\circ}$ C水浴蒸至近干,加二氯甲烷30 mL,加热回流60 min,滤过,滤液蒸干,加甲醇1 mL使溶解,即得供试品溶液。取马勃对照药材1 g,加水20 mL,加热回流30 min,滤过,滤液同法制备,即得对照药材溶液。取按处方比例和工艺制备不含马勃的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法^[6]试验,吸取供试品溶液和阴性对照品溶液各20 μ L、对照药材溶液5 μ L,点于同一硅胶G薄层板,以环己烷-丙酮-乙醚(10:1:2, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,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的斑点,特征斑点清晰,分离良好,无拖尾,且阴性对照无干扰。详见图1 B。

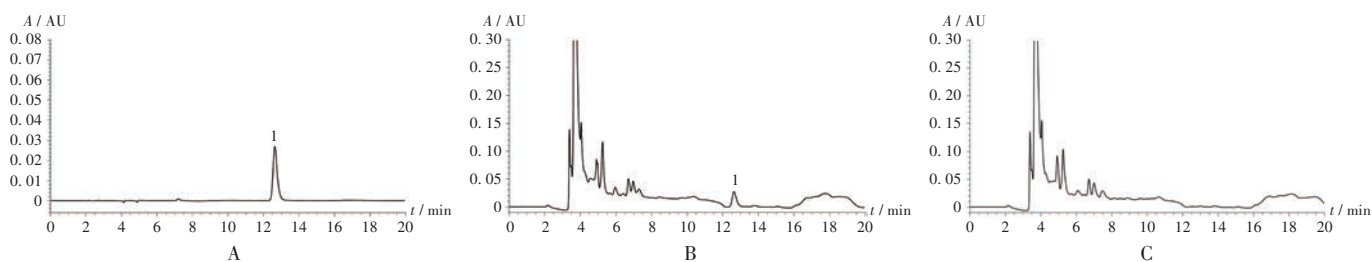
2.2 HPLC法测定腺苷含量^[11-12]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent-5TC-C₁₈(2)柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-乙腈-水(5:4:91, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:260 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液制备

取腺苷对照品适量,精密称定,加水制成质量浓度为9.4720 μ g/mL的对照品溶液。精密量取样品10 mL,置具塞锥形瓶中,水浴蒸干,冷却至室温,精密加入30%甲醇溶液50 mL,称定质量,密塞,超声处理(功率为500 W,频率为40 kHz)30 min,冷却至室温,再次称



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. Adenosine

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

Fig. 2 HPLC chromatograms

定质量,用30%甲醇溶液补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。根据处方工艺制备缺大青叶的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取2.2.2项下供试品溶液、对照品溶液和阴性对照品溶液各10 μL,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图2。

线性关系考察:精密量取2.2.2项下对照品溶液2, 5, 10, 15, 20, 25 μL,按2.2.1项下色谱方法进样测定,以对照品溶液进样量(X , ng)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 3\ 016.8 X - 11\ 350$, $r = 1.000\ 0$ ($n = 6$)。结果表明,腺苷进样量在18.944 0 ~ 236.800 0 ng范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密量取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果腺苷峰面积的RSD为0.39% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2.2项下供试品溶液适量,分别于0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果腺苷峰面积的RSD为1.26% ($n = 7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:精密量取同一批(批号为150505)样品6份,各10 mL,按2.2.2项下方法分别制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算腺苷含量。结果腺苷含量的RSD为2.05% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:分别取样品(每支含腺苷0.496 0 mg)6份,各5 mL,分别加入1 mL腺苷对照品溶液(质量浓

度为0.261 6 mg/mL),低温蒸干,冷却至室温,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,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(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
248.00	261.60	518.68	103.47		
248.00	261.60	520.65	104.22		
248.00	261.60	518.74	103.49	103.77	0.49
248.00	261.60	517.77	103.12		
248.00	261.60	519.59	103.82		
248.00	261.60	521.33	104.48		

2.2.4 样品含量测定

分别精密量取10批样品各10 mL,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,并计算腺苷含量。结果10批样品中每支分别含腺苷0.61, 0.58, 0.57, 0.58, 0.57, 0.54, 0.52, 0.50, 0.50, 0.58 mg,平均每支含腺苷0.56 mg。

3 讨论

3.1 TLC 鉴别药材选择

分别从提取溶剂、提取方法、吸附剂、显色方法等对大青叶、紫荆皮进行了考察^[13-17],结果大青叶供试品溶液色谱与对照品溶液及对照药材溶液色谱在相应位置均未显相同颜色的斑点,或显相同颜色的斑点、但斑点分离度不好;紫荆皮供试品溶液色谱与对照药材溶液色谱相应位置均未显相同颜色的斑点。故大青叶、紫荆皮TLC鉴别有待进一步研究,暂未被列入凉解感冒合剂的质量标准。最终仅对桔梗和马勃作TLC鉴别。

3.2 含量测定指标成分选择

现代药理学研究表明,大青叶具有抗病毒^[18]、抗内毒素^[19]、抑菌^[20]等作用,常用于上呼吸道感染、流行性乙型脑炎、麻疹肺炎、咽喉炎、扁桃体炎等的治疗^[21],主要成分有腺苷、靛玉红、靛蓝和氧化苦参碱^[20,22]。腺苷

是一种内源性核苷,遍布于人体的细胞中,是重要的核苷类抗病毒药物,具有多种生物学活性,可用于治疗多种病毒性疾病,主要破坏病毒转录过程,通过选择性抑制病毒的聚合酶而阻止病毒复制,进而发挥抗病毒作用^[23-24]。有研究报道,靛蓝、靛玉红不具备抗毒素活性^[25],且样品中大青叶经水提工艺提取,而靛玉红、靛蓝均为脂溶性成分,故选择腺苷作为含量测定的指标成分。

3.3 样品提取方法考察

预试验中,对加热回流提取法和超声提取法进行了比较,发现超声提取所得腺苷含量明显高于同条件下加热回流提取所得含量,故选择超声提取法。分别考察以水、甲醇和30%甲醇溶液为提取溶液进行超声提取的效果,发现30%甲醇溶液提取效率最高,故选择30%甲醇溶液作为提取溶剂;考察了超声处理20,30,40 min的提取效果,发现超声提取20 min时含量最低,30 min和40 min所得腺苷含量基本一致,考虑到时间成本,故选择超声提取30 min;考察了溶液量为25,50,100 mL 30%甲醇溶液的提取效果,发现50 mL和100 mL所得腺苷含量相当。故选择50 mL 30%甲醇溶液进行提取。

3.4 色谱条件考察

分别考察了Ultimate和Agilent 2个品牌的色谱柱,结果分离度均良好,不影响被测成分的含量,故选择Agilent-5TC-C₁₈(2)柱进行试验。分别考察了不同柱温(25,30,35℃)对被测成分含量的影响,发现柱温不影响其含量,故柱温选择30℃。取质量浓度为9.472 0 μg/mL的腺苷对照品溶液,于200~400 nm波长范围内进行扫描,结果于260 nm波长处有最大吸收;分别于255,260,265 nm波长处测定,结果分离度均良好,不影响被测成分的含量,故检测波长选择260 nm。考察了乙腈-水(6:94,V/V)作流动相对检测效果的影响,结果供试品溶液色谱图中的目标峰未达到基线。pH 6.5的磷酸盐缓冲液[取0.01 mol/L磷酸二氢钠68.5 mL与0.01 mol/L磷酸氢二钠31.5 mL,混合(pH 6.5)]-甲醇(85:15,V/V)所得色谱图分离度较好,但流动相配制复杂,且对色谱柱的损害较大。最终选择流动相为甲醇-乙腈-水(5:4:91,V/V/V)。

3.5 含量限度拟订

由含量测定可知,样品中腺苷含量为每支0.50~0.61 mg,平均每支0.56 mg。又对3批大青叶药材中腺苷转移率进行了考察,平均转移率为53.29%,鉴于该制剂中大青叶药材为水提工艺,转移率基本合理。建议采用腺苷含量平均值的70%作为限度。故拟订凉解感冒合剂中每支含腺苷不少于0.40 mg。

3.6 方法评价

所建立的方法简便易行、结果准确可靠,可用于凉解感冒合剂的质量控制。

参考文献

- [1] 张萍,杨燕,鄢丹,等.多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用[J].中华中医药杂志,2010,25(1):120-123.
- [2] 杨超,邓晓鸿,周娟.复方桔梗止咳片的质量标准研究[J].中国药房,2019,30(22):3074-3078.
- [3] 简淑娟,翁雪萍.复方桔梗止咳片的薄层色谱鉴别[J].广东药学,2001,11(6):29-30.
- [4] 洪挺,周志强,肖小武,等.桔贝合剂质量标准提升研究[J].中国药房,2022,33(21):2603-2608.
- [5] 谢周涛,胡进.复方枇杷桔梗膏质量标准研究[J].中国药业,2014,23(8):26-28.
- [6] 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,2020:1526-1527.
- [7] 丁晓桐,汤清涵,王喬惟,等.马勃的化学成分研究进展及其在创面修复中的应用[J].南京中医药大学学报,2021,37(4):609-618.
- [8] 吴兴亮,卯晓岚,图力古尔,等.中国药用真菌[M].北京:科学出版社,2013:493.
- [9] 郭晶,江蔚新,范明松.马勃化学成分及药理作用研究进展[J].现代医药卫生,2013,29(3):386-389.
- [10] 徐维茵,李昂,胡德,等.药用真菌白刺马勃的生药学研究[J].中国食用菌,2018,37(4):47-51.
- [11] 李媛,张苗苗,张鑫,等.多成分含量测定结合高效液相色谱指纹图谱评价不同产地大青叶药材质量[J].中国药业,2019,28(17):15-18.
- [12] 卢端萍,蒋婷婷,陈硕,等.高效液相色谱法测定灵芝提取物中腺苷和腺苷含量[J].中国药业,2013,22(14):17-19.
- [13] 黄燕俊,张伟贤,曾常青.广东紫荆皮的质量标准研究及其易混品辨析[J].广东药科大学学报,2017,33(4):471-474.
- [14] 翟巧利,麦格皮热提·阿不力米提,李媛,等.解热颗粒质量标准研究[J].中国药业,2023,32(1):72-75.
- [15] 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.
- [16] 施敏,管敏.上感合剂质量标准研究[J].中国药业,2019,28(3):42-45.
- [17] 白玲玲,李泽平,彭晨,等.射干抗病毒口服液薄层色谱鉴别优化研究[J].中国药业,2023,32(6):71-74.
- [18] 喻淑庆,陈湘漪,余凌.大青叶提取物抗单纯疱疹病毒Ⅱ型的体外实验研究[J].医药导报,2008,27(4):394-396.
- [19] 黄继金.大青叶抗内毒素的实验研究[J].江西中医学院学报,2007,19(2):70-71.
- [20] 崔伟亮,李慧芬,刘江亭.大青叶抗病毒抑菌作用研究进展[J].山东中医杂志,2014,33(5):410-411.
- [21] 乔凤霞.大青叶注射液治疗单纯疱疹病毒性角膜炎[J].现代