

大自然五花饮的质量标准提高研究^Δ

李 辉*, 谢新民, 李腾霞, 晏 明, 罗新根, 李 健[#](广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)06-0811-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.06.29

摘 要 目的:优化和提高大自然五花饮的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的菊花、甘草和木棉花进行定性鉴别。采用高效液相色谱法分别测定制剂中绿原酸和射干苷的含量;色谱柱为 Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-0.4%磷酸(用三乙胺调pH至2.05)(10:90, V/V, 绿原酸)或乙腈-0.4%磷酸(用三乙胺调pH至2.05)(18:82, V/V, 射干苷),流速为1 ml/min,检测波长为327 nm(绿原酸)或265 nm(射干苷),柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:菊花、甘草、木棉花的TLC图斑点清晰,分离度好。绿原酸、射干苷检测质量浓度线性范围分别为19.7~98.7($r=0.999\ 5$)、25.4~126.8 μg/ml($r=0.999\ 8$);精密性、稳定性、重复性的RSD<4%;加样回收率分别为97.01%~104.98%(RSD=3.64%, $n=9$)、98.44%~104.58%(RSD=1.84%, $n=9$)。结论:优化和提高的标准有利于大自然五花饮的质量控制。
关键词 大自然五花饮;射干苷;绿原酸;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on the Improvement of Quality Standard of Daziran Wuhua Yin

LI Hui, XIE Xinmin, LI Tengxia, YAN Ming, LUO Xingen, LI Jian(Dept. of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, china)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize and improve the quality standards of Daziran wuhua yin. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of Cichorii Herba, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and *Gossampinus malabarica*. HPLC was used for the contents determination of chlorogenic acid and tectoridin. The column was Diamonsil C₁₈ with mobile phase of acetonitrile -0.4% phosphoric acid (pH adjusted with to 2.05 with triethylamine) (10:90, V/V, chlorogenic acid or 18:82, V/V, tectoridin) at a flow rate of 1 ml/min, the detection wavelength was 327 nm (chlorogenic acid) or 265 nm (tectoridin), the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: TLC of Cichorii Herba, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and *G. malabarica* showed clear spots and good separation. The linear range was 19.7-98.7 μg/ml for chlorogenic acid ($r=0.999\ 5$) and 25.4-126.8 μg/ml for tectoridin($r=0.999\ 8$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 4%, average recoveries were 97.01%-104.98% (RSD=3.64%, $n=9$), 98.44%-104.58% (RSD=1.84%, $n=9$). CONCLUSIONS: The optimized and improved standard is helpful for the quality control of Daziran wuhua yin.
KEYWORDS Daziran wuhua yin; Tectoridin; Chlorogenic acid; TLC; HPLC

大自然五花饮是由扁豆花、葛花、木棉花、金银花、菊花、白茅根、甘草7味药材组合而成的袋泡制剂,根据传统中医处方研制而成,具有清热生津、化湿醒脾、凉血解毒之功效,临床多用于湿热内阻,发热头痛,口渴咽痛、小便短赤、胸闷、纳呆等症的治疗^[1]。原质量标准是利用薄层色谱(TLC)法对方中金银花的有效成分进行定性分析,采用高效液相色谱(HPLC)法测定其绿原酸含量,但处方中金银花^[2]、杭白菊^[3]和白茅根^[3-4]3味药材都含有绿原酸,不能追踪该成分从药材到制剂的转移过程,射干苷仅存于葛花中,其转移过程中易追踪。因此,本试验拟建立新的质量控制方法,对方中的菊花、甘草、木棉花进行TLC定性鉴别,采用HPLC法测定处方中金银花、杭白菊和白茅根3味药材中绿原酸的含量,同时测定葛花中射干苷^[5-6]的含量,以为其工业化生产提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Agilent公司);SHZ-DⅢ型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)

Δ基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(No.14Z-JZ15-3)

*主管药师。研究方向:药品检验。E-mail: yjklhui@163.com
[#]通信作者:副主任医师。研究方向:老年病学。电话:020-88653477

司);HWS-28型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);BP211D型十万分之一电子天平(德国Satorius公司);KP03型超声清洗仪(广州市科普超声电子技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

大自然五花饮(广州军区广州总医院药剂科自制,批号:50171461、20120501、50171391,规格:5 g/袋);菊花对照药材(批号:121384-201103)、甘草对照药材(批号:120904-200914)、木棉花对照药材(批号:HX14F01)均购自广东和翔药业有限公司;射干苷对照品(批号111632-200602,纯度:100%)、绿原酸对照品(批号:110753-20134,纯度:96.6%)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(德国Merck公司);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 菊花 取样品粉末(过2号筛)5 g,加乙醚20 ml,超声(功率:1 200 W,频率:40 kHz,下同)处理10 min,滤过,滤液浓缩至1 ml,作为供试品溶液。另取菊花对照药材粉末(过2号筛)1 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按大自然五花饮处方和制备工艺制备缺菊花的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录V B]^[7]试验,吸取上述3种溶液各15 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿为展开剂,置于氨蒸气饱和

的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,并以105℃烘烤5 min,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,详见图1。

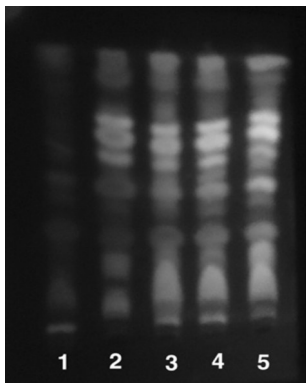


图1 菊花的薄层色谱图

1.阴性对照;2.对照药材;3~5.供试品

Fig 1 TLC chromatograms of Cichorii Herba

1.negative control;2.medicinal material reference substance;3-5.test samples

2.1.2 甘草 取样品粉末(过2号筛)5 g,加50%乙醇20 ml回流提取2 h,滤过,滤液浓缩至1 ml,作为供试品溶液。另取甘草对照药材粉末(过2号筛)0.5 g,按供试品溶液制备方法制得对照药材溶液。按大自然五花饮处方和制备工艺制备缺甘草的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录V B]^[2]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-乙醇-氨水(5:1:2, V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,并加热至斑点清晰,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,详见图2。

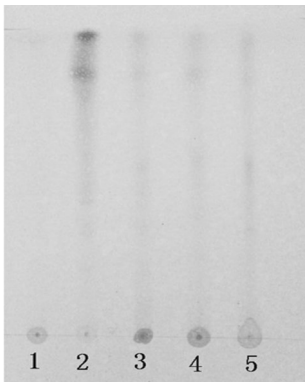


图2 甘草的薄层色谱图

1.阴性对照;2.对照药材;3~5.供试品

Fig 2 TLC chromatograms of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

1.negative control;2.medicinal material reference substance;3-5.test samples

2.1.3 木棉花 取样品粉末(过2号筛)5 g,加乙酸乙酯50 ml,浸泡2 h,超声处理15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取木棉花对照药材粉末(过2号筛)2 g,同供试品溶液制备方法制得对照药材溶液。按大自然五花饮处方和制备工艺制备缺木棉花的阴性样品,并按供试品

溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录V B]^[2]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-丙酮-甲酸(5:1:0.2, V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,并以105℃烘烤5 min,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰,详见图3。

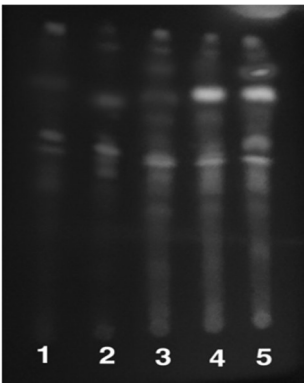


图3 木棉花的薄层色谱图

1.阴性对照;2.对照药材;3~5.供试品

Fig 3 TLC chromatograms of Gossampinus malabarica

1.negative control;2.medicinal material reference substance;3-5.test samples

2.2 绿原酸的含量测定^[7-9]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸(用三乙胺溶液调pH至2.05)(10:90, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:327 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品25.55 mg,置于250 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为98.73 μg/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品约5.0 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,加入甲醇50 ml,超声处理30 min,放冷,滤过,滤液置于100 ml量瓶中,用甲醇润洗锥形瓶3次(每次10 ml),适量甲醇冲洗滤纸,用甲醇定容,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按大自然五花饮处方和制备工艺制备缺金银花、菊花和白茅根的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性试验和专属性试验 分别取“2.2.2”“2.2.3”“2.2.4”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图4。由图4可知,理论板数以绿原酸峰计不少于3 000,分离度>1.5,各成分基线分离良好,且阴性对照无干扰。

2.2.6 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成质量浓度分别为19.7、39.5、59.2、79.0、98.7 μg/ml的系列对照品溶液,精密量取上述系列对照品溶液各10 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以绿原酸质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为y=16 366x-80(r=0.999 5)。结果表明,绿原酸检测质量浓度线性范围为19.7~98.7 μg/ml。

2.2.7 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测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸峰面积的RSD=0.63%(n=6),表明仪器精密度高。

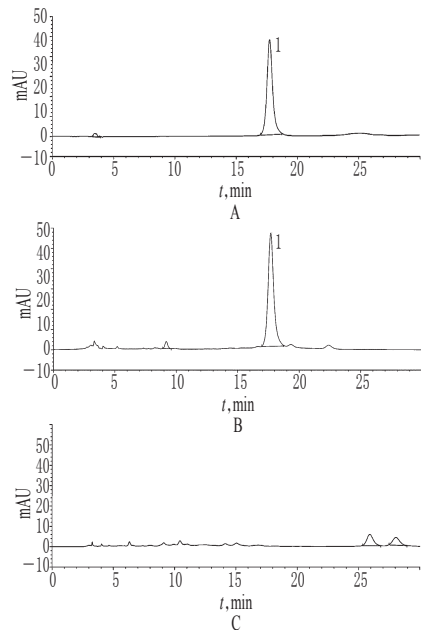


图4 绿原酸的高效液相色谱图
A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.绿原酸

Fig 4 HPLC chromatograms of chlorogenic acid
A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1.chlorogenic acid

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:50171461)适量,分别于放置0、2、4、6、8、10、12 h时进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸峰面积的RSD=0.91%(n=7),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:50171461)适量,按“2.2.3”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。结果,绿原酸峰面积的RSD=3.97%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:50171461)适量,共6份,分别加入高、中、低质量的绿原酸对照品,按“2.2.3”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,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 绿原酸加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test of chlorogenic acid (n=9)						
取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
2.592 2	6.974	3.864	10.792	98.81	100.86	3.64
2.592 1	6.974	3.864	10.722	97.01		
2.591 3	6.972	3.864	10.745	97.64		
2.501 1	6.729	4.832	11.517	99.13		
2.490 2	6.700	4.832	11.501	99.40		
2.501 3	6.730	4.832	11.517	99.11		
2.502 2	6.732	5.800	12.817	104.98	104.98	104.98
2.501 9	6.731	5.800	12.786	104.47		
2.522 5	6.787	5.800	12.873	104.93		

2.2.11 样品中绿原酸含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”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,计算样品含量,结果见表2。

2.3 射干苷的含量测定^[7-9]

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Diamondsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸(用三乙胺溶液调pH至2.05)

(18:82,V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:265 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。

表2 样品中绿原酸含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of chlorogenic acid contents determination of samples (n=3)

样品批号	绿原酸,mg/g
50171461	2.69
20120501	1.69
50171391	4.35

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取射干苷对照品31.69 mg,置于250 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为126.76 μg/ml的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取样品约5.0 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶,加甲醇50 ml,超声处理30 min,放冷,滤过至100 ml量瓶中,用甲醇润洗锥形瓶3次(每次10 ml),适量甲醇冲洗滤纸,用甲醇定容,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 按大自然五花饮处方和制备工艺制备缺葛花的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3.5 系统适用性试验和专属性试验 分别取“2.3.2”“2.3.3”“2.3.4”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图5。由图5可知,理论板数以射干苷峰计不少于3 000,分离度>1.5,各成分基线分离良好,且阴性对照无干扰。

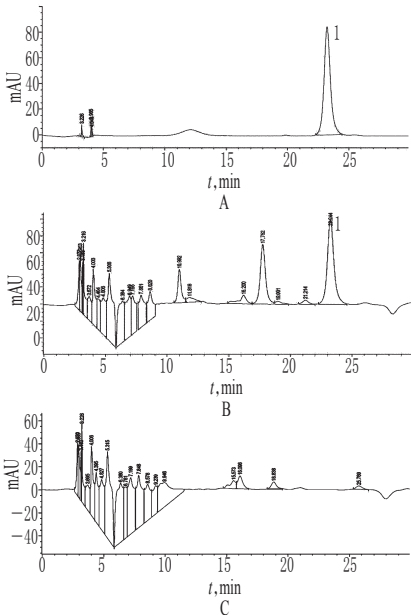


图5 射干苷的高效液相色谱图
A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.射干苷

Fig 5 HPLC chromatograms of tectoridin

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1.tectoridin
2.3.6 线性关系考察 精密量取“2.3.2”项下对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成质量浓度分别为25.34、50.7、76.1、101.4、126.8 μg/ml的系列对照品溶液,精密量取上述系列对照品溶液各10 μl,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以射干苷质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为y=41 493x-61.64(r=0.999 8)。结果表明,射干苷检测质量浓度线性范围为25.4~126.8 μg/ml。

2.3.7 精密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,射干苷峰面积的RSD=2.14%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:50171461)适量,分别于放置0、2、4、6、8、10、12 h时进样测定,记录峰面积。结果,射干苷峰面积的RSD=3.07%(n=7),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.3.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:50171461)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,射干苷峰面积的RSD=3.02%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:50171461)适量,共6份,分别加入高、中、低质量的射干苷对照品,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表3。

表3 射干苷加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery test of tectoridin (n=9)						
取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
2.592 2	4.222	3.997	8.174	99.39		
2.592 1	4.221	3.997	8.191	99.82		
2.591 3	4.220	3.997	8.199	100.04		
2.501 1	4.073	4.996	9.028	99.77		
2.490 2	4.056	4.996	8.980	99.16	99.90	1.84
2.501 3	4.074	4.996	9.267	104.58		
2.502 2	4.075	5.995	9.987	99.28		
2.501 9	4.075	5.995	9.937	98.44		
2.522 5	4.108	5.995	9.980	98.61		

2.3.11 样品中射干苷含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表4。

表4 样品中射干苷含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of tectoridin contents determination of samples (n=3)	
样品批号	射干苷,mg/g
50171461	1.63
20120501	2.12
50171391	3.13

3 讨论

3.1 薄层鉴别

菊花日光下阴性样品和供试品仅有一个斑点不同(比移值约0.625),其他斑点均存在干扰。为此,在将显色后的同一块薄层板置紫外灯365 nm检视,发现在紫外灯下检视灵敏度更好,菊花对照药材色谱中桃红色荧光斑点(比移值约0.625)以下的各斑点均有干扰,而桃红色斑点以上的三个绿色主斑点为菊花特征成分,菊花阴性样品无干扰。因此,设定于紫外灯365 nm处检视,供试品色谱在于对照药材色谱主要斑点相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。原木棉花的鉴别方法可靠,本次未予修改,由于中国食品药品检定研究院无木棉花对照药材,本次试验采用广东和翔药业有限公司药材作为对照药材,其色谱中淡红色斑点(比移值约0.525)处为主斑点,阴

性对照无干扰。甘草鉴别中笔者将原标准105 ℃烘烤5 min改为热风吹至斑点清晰,甘草和对照药材色谱中桃红色斑点(比移值约0.875)处为主斑点,阴性对照无干扰。

3.2 含量测定中提取溶剂的选择

根据射干苷、绿原酸的化学性质,试验中考察了甲醇、50%甲醇、70%乙醇和乙醇的提取效率。结果显示,用甲醇和70%乙醇超声30 min提取射干苷,测定结果相近,能够完全提取;用甲醇和50%甲醇超声30 min提取绿原酸,测得结果相近,能够完全提取。综合考虑,选择甲醇作为提取溶剂,色谱图杂质少,且色谱峰峰形好,与相邻的色谱峰分离良好。

3.3 含量测定中流动向的选择

笔者曾参考文献^[1-9]乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾等作流动相,发现各化合物的峰形较宽,而改用乙腈、磷酸作为流动相各化合物峰形变窄;磷酸体积分数为0.4%,因为pH<2容易使色谱柱损伤,因此选择了pH2.05。试验中比较了不同比例的乙腈-0.4%磷酸系统,也尝试了同时测定其含量,结果绿原酸以乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90,V/V)、射干苷以乙腈-0.4%磷酸溶液(18:82,V/V)作流动相的结果较好,色谱峰与其他杂质峰分离度较好,保留时间适中,峰形好。

综上所述,优化和提高的标准有利于大自然五花饮的质量控制。

参考文献

[1] 赵玮,兰俊峻,吴新荣.大自然五花饮质控标准的研究[J].广东药学院学报,2003,19(2):109.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:205、292、附录27.

[3] 王海侠,姚青春,时维静,等.白茅根中绿原酸的提取与含量测定[J].中国中医药科技,2010,17(4):331.

[4] 陶福芳,李艳蕾,郭永逵,等.肾炎片的质量标准研究[J].西北药学杂志,2011,26(6):403.

[5] 沙东旭,郝延军,康强,等.高效液相色谱法测定抗病毒颗粒中射干苷、绿原酸和苦参碱[J].中成药,2012,34(10):1 928.

[6] 戎晓娟,张瑞萍,贺金华,等.应用LC-MS/MS法筛选宝心艾维西木口服液质量控制中的含量测定指标[J].中国药房,2015,26(23):2 157.

[7] 沙东旭,郝延军,康强,等.高效液相色谱法测定抗病毒颗粒中射干苷、绿原酸和苦参碱[J].中成药,2012,34(10):1 928.

[8] 曹岳华,彭国庆.高效液相色谱法测定射干利咽口服液中射干苷、次野鸢尾黄素的含量[J].中南药学,2010,8(16):431.

[9] 宁科贤,黄燕萍.HPLC法同时测定双黄连颗粒中绿原酸、木犀草、连翘苷和黄芩苷的含量[J].中国药房,2014,25(40):3 819.

(收稿日期:2015-05-19 修回日期:2015-09-21)
(编辑:张 静)