

急支糖浆一板多药味 HPTLC 鉴别和 HPLC 含量测定方法的研究[△]

丁浩然*, 刘峰, 陈艳, 王梦月^{#a}, 李晓波^{#b} (上海交通大学药学院, 上海 200240)

中图分类号 R286.0;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0555-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.08



摘要 目的 优化急支糖浆现有薄层色谱鉴别和含量测定方法。方法 采用高效薄层色谱(HPTLC)法鉴别急支糖浆方中的四季青、鱼腥草、前胡、枳壳和甘草5种药材,采用高效液相色谱(HPLC)法测定原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷的含量。结果 HPTLC法结果显示,具栖冬青苷、白花前胡甲素、柚皮苷、甘草苷4种对照品和鱼腥草对照药材的薄层斑点均显示清晰,比移值均在0.2~0.8范围内;经验证,方法专属性、耐用性和批次重复性良好。HPLC法结果显示,原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷的线性范围分别为4.32~431.67、1.14~114.17、7.02~702.33 $\mu\text{g/mL}$ (r 均大于0.996);平均加样回收率分别为100.61%、100.40%、99.22% (RSD均小于2.00%);精密性($n=6$)、稳定性(24 h, $n=7$)、重复性($n=6$)试验的RSD均小于2.00%。原儿茶酸等3种活性成分在10批急支糖浆中的平均含量依次为623.3、152.1、1 213.9 $\mu\text{g/mL}$ (RSD均小于10.00%)。结论 本研究建立了急支糖浆一板多药味HPTLC鉴别方法,使用1种样品前处理方法、2个薄层色谱条件,实现了对处方中5种药材的快速鉴别;建立了HPLC含量测定方法,实现了对急支糖浆中3种活性成分的快速定量,可用于优化急支糖浆现有法定质量标准中的鉴别项和含量测定项。

关键词 急支糖浆;一板多药味;高效薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定;整体鉴别

Study on HPTLC identification of one-plate multi-drug and HPLC content determination method for Jizhi syrup

DING Haoran, LIU Feng, CHEN Yan, WANG Mengyue, LI Xiaobo (School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the existing thin layer chromatography (TLC) identification and content determination methods of Jizhi syrup. **METHODS** High performance thin-layer chromatography (HPTLC) was used to identify five medicinal materials in Jizhi syrup, such as *Ilex chinensis*, *Houttuynia cordata*, *Peucedanum praeruptorum*, *Citrus aurantium*, *Glycyrrhiza uralensis*. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the contents of procatechuic acid, ephedrine hydrochloride and naringin in Jizhi syrup. **RESULTS** HPTLC results showed that the identification spots of pedunculoside, praeruptorin A, naringin, and liquiritin were clearly displayed, and the retention factors were in the range of 0.2 to 0.8. After validation, the method had been proved to be strongly specific, robust and repeatable. HPLC results showed that the linear ranges of procatechuic acid, ephedrine hydrochloride and naringin were 4.32-431.67, 1.14-114.17 and 7.02-702.33 $\mu\text{g/mL}$ (all $r > 0.996$), respectively. The average recoveries were 100.61%, 100.40% and 99.22%, and RSDs were all less than 2.00%. RSDs of precision ($n=6$), stability (24 h, $n=7$) and repeatability ($n=6$) were all less than 2.00%. The average contents of the three components in 10 batches were 623.3, 152.1, 1 213.9 $\mu\text{g/mL}$ (RSD < 10.00%), respectively. **CONCLUSIONS** In this study, HPTLC method of one-plate multi-drug is established for the identification of Jizhi syrup. One sample pretreatment method and two TLC conditions are used to realize the rapid identification of five kinds of medicinal materials. An HPLC method is established to determine the content of Jizhi syrup, which realizes the fast quantification of three active components in Jizhi syrup, and can be used to optimize the identification and content determination items in the existing legal quality standards of Jizhi syrup.

KEYWORDS Jizhi syrup; one-plate multi-drug; HPTLC; HPLC; content determination; overall identification

急支糖浆处方是来源于复旦大学附属华山医院沈自尹院士的临床经验方,目前收载于2020年版《中国药典》(一部)^[1],也被收入《四川省新型冠状病毒肺炎中医

药防控技术指南(第五版)》^[2]。急支糖浆由四季青、鱼腥草、金荞麦、紫菀、前胡、麻黄、枳壳、甘草8味中药制成,具有清热宣肺、理气化痰的功效^[3]。现代研究发现,急支糖浆对急性支气管炎和慢性支气管炎急性发作引发咳嗽的临床总有效率大于92%^[4],在与抗生素联用治疗支气管炎及外感风热咳嗽方面也有显著疗效^[5]。2020年版《中国药典》鉴别项对急支糖浆中的盐酸麻黄碱(来源于麻黄)、柚皮苷(来源于枳壳)、原儿茶酸和阿魏酸进行了薄层色谱鉴别^[1]。该鉴别项使用3种展开条件,共鉴别4

[△] 基金项目:国家重点研发计划项目(No.2018YFC1707300)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质及质量标准。E-mail: dinghaoran99@163.com

^{#a} 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药效物质及质量标准。电话:021-34204805。E-mail: mywang@sytu.edu.cn

^{#b} 通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药药效物质及质量标准。电话:021-34204806。E-mail: xbli@sytu.edu.cn

种成分,但各展开条件所对应的样品前处理方法不一致,操作繁琐;且所鉴别的原儿茶酸和阿魏酸是来源于处方中四季青、金荞麦、紫菀等多味药材的酚酸类成分^[6-9],专属性差。另外,2020年版《中国药典》中急支糖浆的含量测定项仅对柚皮苷进行测定,对于成分复杂的中药复方仅选择单一药材的特征成分进行质量控制,具有一定局限性,不能满足质量日益提升的要求^[10]。

基于中药复方制剂组成药味多,单味药逐一鉴别操作复杂,“整体鉴别”的思路被提出——在首选君药、贵重药、毒性药鉴别的基础上,尽可能多地对制剂中的有效成分、专属性成分进行鉴别^[11-12]。一板多药味鉴别法是“整体鉴别”思路的直接应用,可以节省人工及材料成本,最大程度地提高检测效率^[13-14]。为保证急支糖浆在实际生产过程中原料的可追溯性,简化操作步骤,节省材料,有必要建立一种基于专属性成分的一板多药味高效薄层色谱(high performance thin-layer chromatography, HPTLC)鉴别方法。在优化含量测定项方面,质量标志物为质量控制研究提供了新思路,物质存在性、特有性、可测性、功效关联性和溯源传递性“五原则”已成为选择质量控制指标的重要判断依据^[15];同时新方法的高效性、实用性、耐用性,是否能为实际产品的质量控制提供便利,也是优化含量测定方法需考虑的重要因素。所以,本研究建立了一种一板多药味HPTLC鉴别法,通过1种样品前处理方法、2个薄层色谱条件,实现对急支糖浆中君药四季青和鱼腥草、臣药前胡、佐药枳壳、使药甘草的同时鉴别^[3];建立了一种高效液相色谱(HPLC)含量测定方法,实现对原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷3种活性成分的快速定量。两种方法均简单高效,拟用于优化2020年版《中国药典》中急支糖浆的鉴别项和含量测定项,提升该制剂的质量控制标准。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所使用的主要仪器有PWN85ZH型十万分之一电子分析天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司],HPTLC系统(包括Automatic TLC Sampler 4型自动点板仪、Automatic Developing Chamber 2型自动展开仪、TLC Visualizer 2型自动成像仪,瑞士CAMAG公司),1290 Infinity型HPLC系统(包括G4226A型自动进样器、G1316C型柱温箱、G4212A DAD型检测器、G4220A型二元超高压梯度泵,美国Agilent公司),Research plus型手动移液器(量程100~1 000 μL)、Centrifuge 5417R型离心机(德国Eppendorf公司)等。

1.2 主要药品与试剂

无水乙醇、甲醇、三氯甲烷、乙醚、石油醚、环己烷、氯化钠均购自上海泰坦科技股份有限公司,乙酸乙酯、

硫酸、六水合氯化镁均购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯;乙腈购自北京百灵威科技有限公司,磷酸购自上海安谱实验科技股份有限公司,均为色谱纯;实验用水使用Millipore Milli-Q型超纯水系统制备。高效薄层板HSGF₂₅₄购自烟台江友硅胶开发有限公司,高效薄层板G购自青岛海洋化工有限公司,高效薄层板HSG60购自德国Merck公司。

甘草苷对照品(批号wkq18040902,纯度 $\geq 98\%$)购自四川省维克奇生物科技有限公司;柚皮苷对照品(批号DST191011-099,纯度 $\geq 98\%$)、具栖冬青苷对照品(批号DST19032-034,纯度 $\geq 98\%$)、白花前胡甲素对照品(批号DST190214-020,纯度 $\geq 98\%$)、原儿茶酸对照品(批号DST180428-081,纯度 $\geq 98\%$)、四季青对照药材(批号DST190808-046)均购自成都德思特生物技术有限公司;盐酸麻黄碱对照品(批号171241-201809,纯度 $\geq 99\%$)、甘草对照药材(批号120904-201620)、枳壳对照药材(批号120981-201605)、前胡对照药材(批号120951-201706)、鱼腥草对照药材(批号121046-201607)均购自中国食品药品检定研究院。10批急支糖浆(批号分别为19040073、19040074、19040075、19040077、19040086、19040097、19040098、19040101、19040114、19040116)、6批缺方阴性样品(分别为缺甘草、枳壳、四季青、前胡、鱼腥草、麻黄的阴性样品,厂家未提供生产批号)均由太极集团重庆涪陵制药厂有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 一板多药味HPTLC法鉴定急支糖浆中的5种药材

2.1.1 供试品溶液制备

取本品30 mL,置分液漏斗中,用石油醚振摇提取2次,每次30 mL;弃去石油醚液,水液加乙醚振摇提取2次,每次30 mL;合并乙醚提取液,蒸干,残渣加甲醇8 mL使溶解,作为急支糖浆供试品一溶液。水液再加乙酸乙酯振摇提取2次,每次45 mL;合并乙酸乙酯提取液,蒸干,残渣加甲醇8 mL使溶解,作为急支糖浆供试品二溶液。

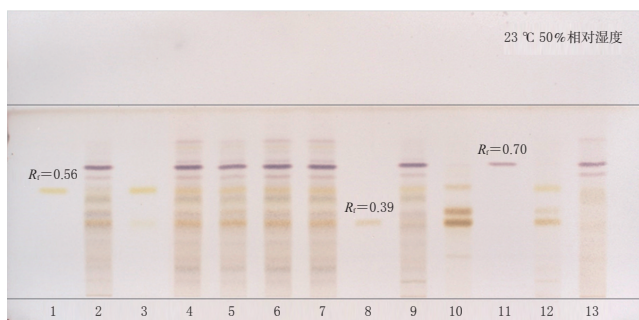
2.1.2 对照品溶液、单味对照药材溶液和缺方阴性样品溶液制备

精密称取甘草苷、柚皮苷、具栖冬青苷、白花前胡甲素对照品,分别加甲醇制成每毫升各含0.25 mg的溶液,作为对照品溶液。分别称取5种对照药材各1 g,加30 mL水,加热回流2.5 h,重复提取2次,4 000 r/min离心10 min,合并2次上清液,浓缩至30 mL,得对照药材浓缩液;取对照药材浓缩液,按照“2.1.1”项下供试品溶液制备方法制备单味对照药材溶液(前胡、鱼腥草参照供试品一溶液;甘草、枳壳、四季青参照供试品二溶液)。分别取缺甘草、枳壳、四季青、前胡、鱼腥草的阴性样品

按“2.1.1”项下供试品溶液制备方法制备缺方阴性样品溶液。

2.1.3 甘草、枳壳和四季青药材的HPTLC鉴别

吸取“2.1.1”“2.1.2”项下急支糖浆供试品二溶液、3种对照品溶液(甘草苷、柚皮苷、具栖冬青苷)、3种单味对照药材溶液及对应阴性样品溶液各2 μL,分别点于同一高效薄层板HSGF₂₅₄上,以三氯甲烷-甲醇-水(体积比16:10:3,4℃静置12h取下层液)为展开剂,预饱和和20 min后,以展距70 mm、温度(24±2)℃、相对湿度(50±5)%的条件展开;取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃加热显色至斑点清晰,在日光下检视。结果见图1。供试品二溶液色谱在与甘草苷对照品色谱相应的位置上,显示相同的黄色荧光斑点,比值(R_f)为0.56;在与柚皮苷对照品色谱相应的位置上,显示相同的棕色荧光斑点, R_f 为0.39;在与具栖冬青苷对照品色谱相应的位置上,显示相同的紫色荧光斑点, R_f 为0.70。甘草、枳壳和四季青对照药材色谱在与对照品色谱相应位置显示相同颜色荧光斑点。各缺方阴性样品色谱在与对照品色谱相应位置无干扰,表明该方法专属性良好。4批急支糖浆供试品二溶液色谱在与对照品色谱相应的位置上显示相同颜色荧光斑点,说明该方法在不同批次的急支糖浆样品间重复性良好。



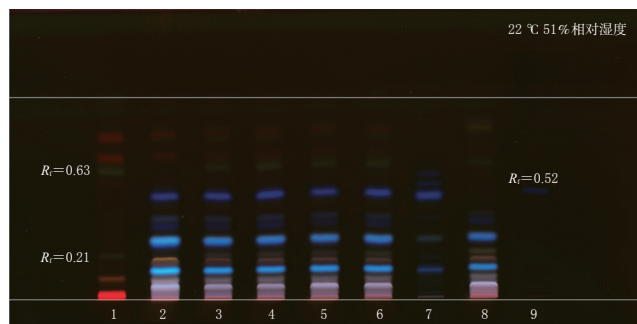
1:甘草苷对照品;2:缺甘草阴性样品;3:甘草对照药材;4:急支糖浆供试品二溶液(批号19040073);5:急支糖浆供试品二溶液(批号19040079);6:急支糖浆供试品二溶液(批号19040086);7:急支糖浆供试品二溶液(批号19040098);8:柚皮苷对照品;9:缺枳壳阴性样品;10:枳壳对照药材;11:具栖冬青苷对照品;12:缺四季青阴性样品;13:四季青对照药材

图1 甘草、枳壳、四季青药材的HPTLC图(日光)

2.1.4 前胡和鱼腥草药材的HPTLC鉴别

吸取“2.1.1”“2.1.2”项下急支糖浆供试品一溶液、白花前胡甲素对照品溶液、2种单味对照药材溶液及对应阴性样品溶液各5 μL,分别点于同一高效薄层板HSGF₂₅₄上,以环己烷-乙酸乙酯(体积比9:5)为展开剂,预饱和和15 min后,以展距75 mm、温度(24±2)℃、相对湿度(50±5)%的条件展开;取出,晾干,在紫外光366 nm下检视。结果见图2。供试品一溶液色谱在与鱼腥草对照药材色谱相应的位置上,显示2个相同的淡黄色荧光斑

点, R_f 分别为0.21和0.63;在与白花前胡甲素对照品色谱相应的位置上,显示相同的蓝色荧光斑点, R_f 为0.52。前胡对照药材色谱在与对照品色谱相应位置上显示相同颜色荧光斑点。各缺方阴性样品色谱在指定对照品色谱相应位置无干扰,表明该方法专属性良好。4批急支糖浆供试品一溶液色谱在与对照品色谱相应的位置上显示相同颜色荧光斑点,说明该方法在不同批次的急支糖浆样品间重复性良好。



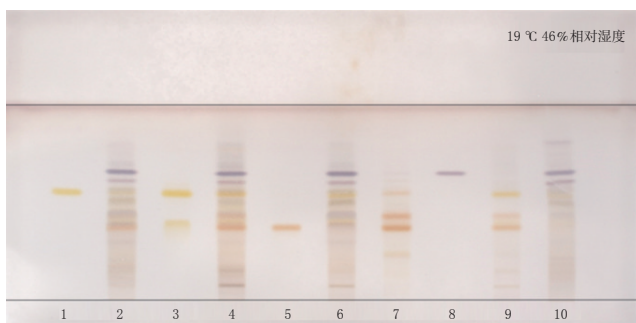
1:鱼腥草对照药材;2:缺鱼腥草阴性样品;3:急支糖浆供试品一溶液(批号19040073);4:急支糖浆供试品一溶液(批号19040079);5:急支糖浆供试品一溶液(批号19040086);6:急支糖浆供试品一溶液(批号19040098);7:前胡对照药材;8:缺前胡阴性样品;9:白花前胡甲素对照品

图2 鱼腥草和前胡药材的HPTLC图(紫外光)

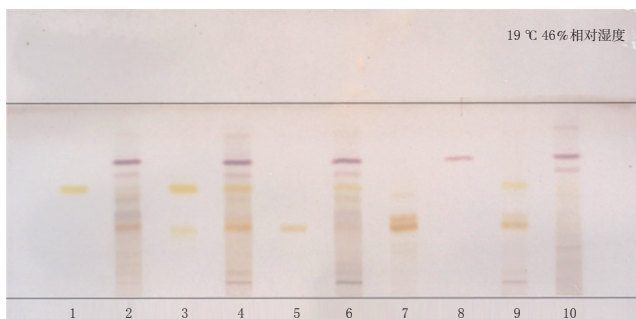
2.1.5 一板多药味HPTLC的耐用性验证

(1)不同厂家的薄层板考察:以“2.1.3”“2.1.4”项下色谱参数进行试验,考察不同厂家的薄层板(烟台江友硅胶开发有限公司、青岛海洋化工有限公司、德国Merck公司)对展开效果的影响。结果显示,采用HPTLC法鉴定甘草、枳壳、四季青药材时,日光下3种薄层板均呈现了较好的分离效果,符合耐用性原则,详见图3;采用HPTLC法鉴定前胡、鱼腥草药材时,在紫外光366 nm下,3种薄层板均呈现了较好的分离效果,符合耐用性原则,详见图4。

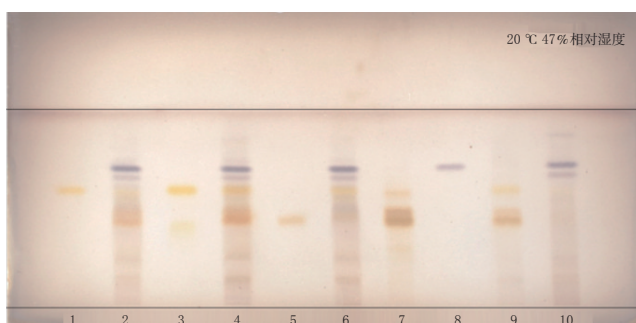
(2)温湿度联合考察:以“2.1.3”“2.1.4”项下色谱参数进行试验,考察不同温湿度的展开缸环境对展开效果的影响。以800 mL饱和氯化钠溶液控制薄层展开系统的高相对湿度为(75±5)%,分别在室内偏低温度(20±2)℃和室内偏高温度(28±2)℃条件下展开;以800 mL饱和六水合氯化镁溶液控制薄层展开系统的低相对湿度为(38±5)%,分别在室内偏低温度(20±2)℃和室内偏高温度(28±2)℃条件下展开。甘草、枳壳和四季青药材的HPTLC结果显示,除室内偏高温度、低相对湿度条件下 R_f 偏高外,整体展开效果较好,该方法耐用性良好,详见图5。前胡和鱼腥草药材的HPTLC结果显示,除室内偏高温度、高相对湿度条件下斑点整体 R_f 偏高外,其他温湿度条件下整体展开效果较好,该方法耐用性良好,详见图6。



A. Merck 高效薄层板 HSG60



B. 烟台高效薄层板 HSGF₂₅₄



C. 青岛高效薄层板 G

1: 甘草苷对照品; 2: 缺甘草阴性样品; 3: 甘草对照药材; 4: 急支糖浆供试品二溶液(批号 19040073); 5: 柚皮苷对照品; 6: 缺枳壳阴性样品; 7: 枳壳对照药材; 8: 具栖冬青苷对照品; 9: 缺四季青阴性样品; 10: 四季青对照药材

图3 甘草、枳壳和四季青药材在不同厂家薄层板上的 HPTLC 图(日光)

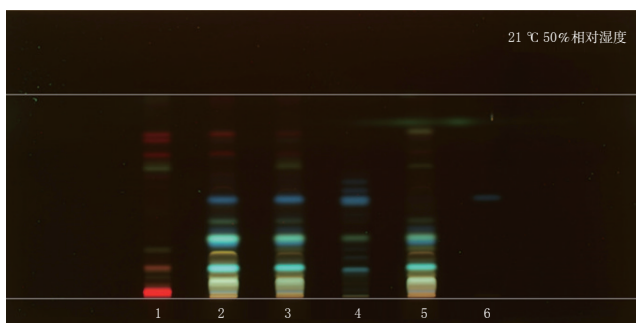
2.2 HPLC 法测定急支糖浆中 3 种活性成分的含量

2.2.1 供试品溶液制备

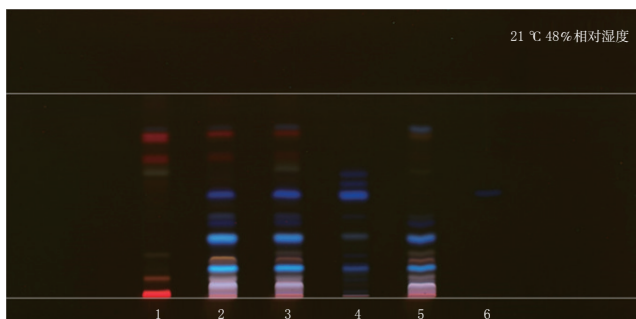
将瓶装急支糖浆充分摇匀,精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加入 80% 甲醇定容,摇匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 混合对照品溶液和缺方阴性样品溶液制备

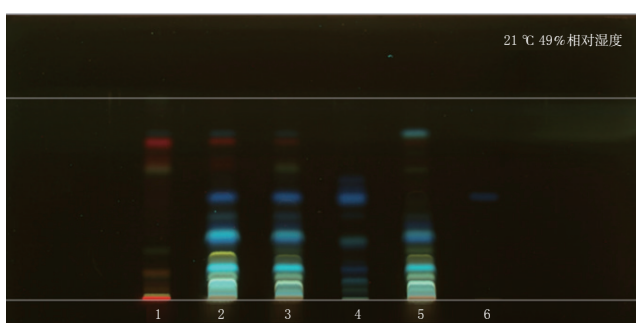
取盐酸麻黄碱、原儿茶酸、柚皮苷对照品适量,精密称定,分别加 80% 甲醇溶解得 0.913 mg/mL 的盐酸麻黄碱对照品溶液、1.233 mg/mL 的原儿茶酸对照品溶液、2.007 mg/mL 的柚皮苷对照品溶液。分别吸取上述 3 种对照品溶液 250、700、700 μL,置于同一 2 mL 量瓶中,加入 80% 甲醇定容,摇匀,配制成为上述成分质量浓度分别为 0.114、0.432、0.702 mg/mL 的混合对照品溶液。分别取缺麻黄、枳壳阴性样品按照“2.2.1”项下供试品溶液制



A. Merck 高效薄层板 HSG60



B. 烟台高效薄层板 HSGF₂₅₄



C. 青岛高效薄层板 G

1: 鱼腥草对照药材; 2: 缺鱼腥草阴性样品; 3: 急支糖浆供试品一溶液(批号 19040073); 4: 前胡对照药材; 5: 缺前胡阴性样品; 6: 白花前胡甲素对照品

图4 鱼腥草和前胡药材在不同厂家薄层板上的 HPTLC 图(紫外光)

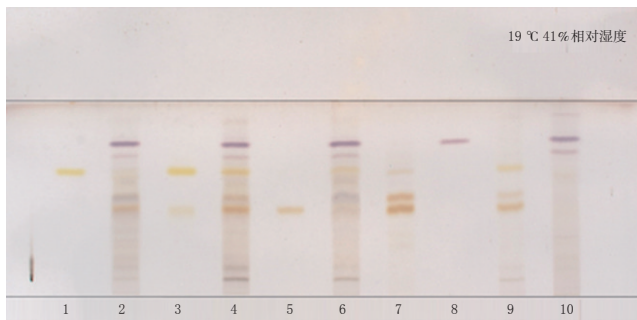
备方法制备缺方阴性样品溶液。

2.2.3 色谱条件

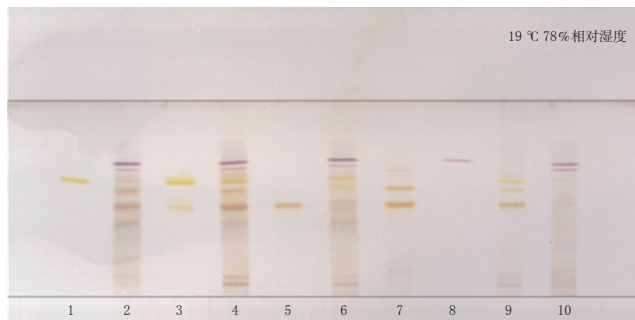
以 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) 为色谱柱,以 0.1% 磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~4 min, 11% B; 4~7 min, 11% B→18% B; 7~18 min, 18% B→21% B); 检测波长为 210 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 40 °C; 进样量为 5 μL。

2.2.4 系统适用性试验

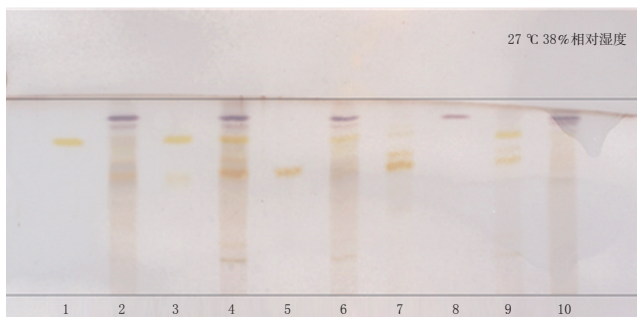
分别取上述供试品溶液、混合对照品溶液和缺方阴性样品溶液适量,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,各待测成分色谱峰峰形好,且分离度均大于 1.5,理论板数均不低于 10 000,缺麻黄阴性样品溶液对盐酸麻黄碱的测定无干扰,缺枳壳阴性样品溶液对柚皮苷的测定无干扰,结果见图 7。



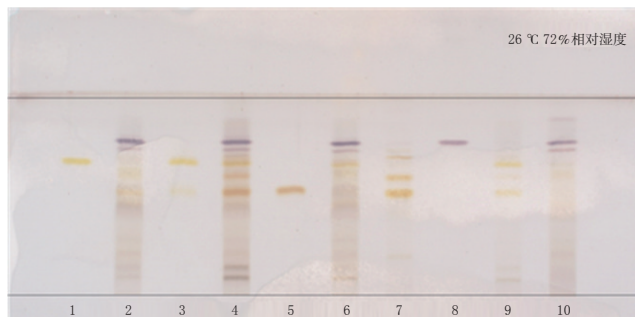
A. 室内偏低温度、低相对湿度



B. 室内偏低温度、高相对湿度



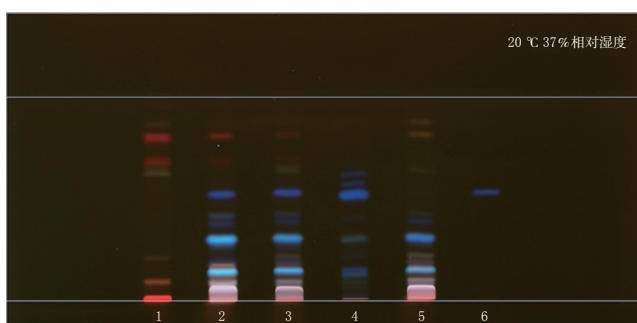
C. 室内偏高温度、低相对湿度



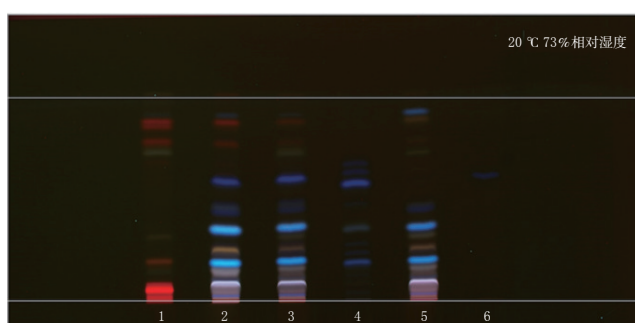
D. 室内偏高温度、高相对湿度

1: 甘草苷对照品; 2: 缺甘草阴性样品; 3: 甘草对照药材; 4: 急支糖浆供试品二溶液(批号19040073); 5: 柚皮苷对照品; 6: 缺枳壳阴性样品; 7: 枳壳对照药材; 8: 具桫冬青苷对照品; 9: 缺四季青阴性样品; 10: 四季青对照药材

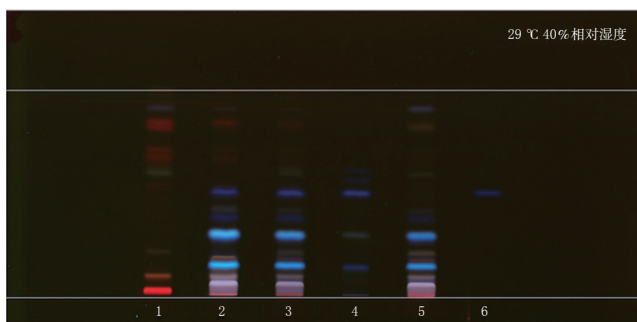
图5 甘草、枳壳和四季青药材在不同温湿度下的HPTLC图(日光)



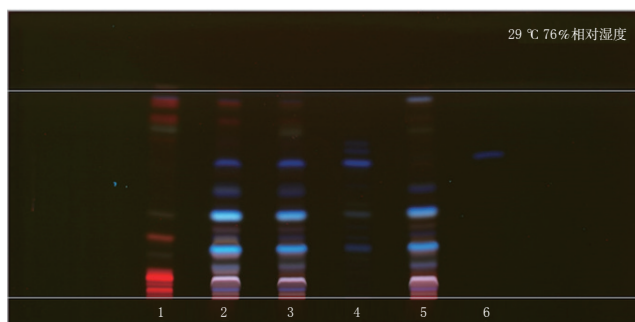
A. 室内偏低温度、低相对湿度



B. 室内偏低温度、高相对湿度



C. 室内偏高温度、低相对湿度



D. 室内偏高温度、高相对湿度

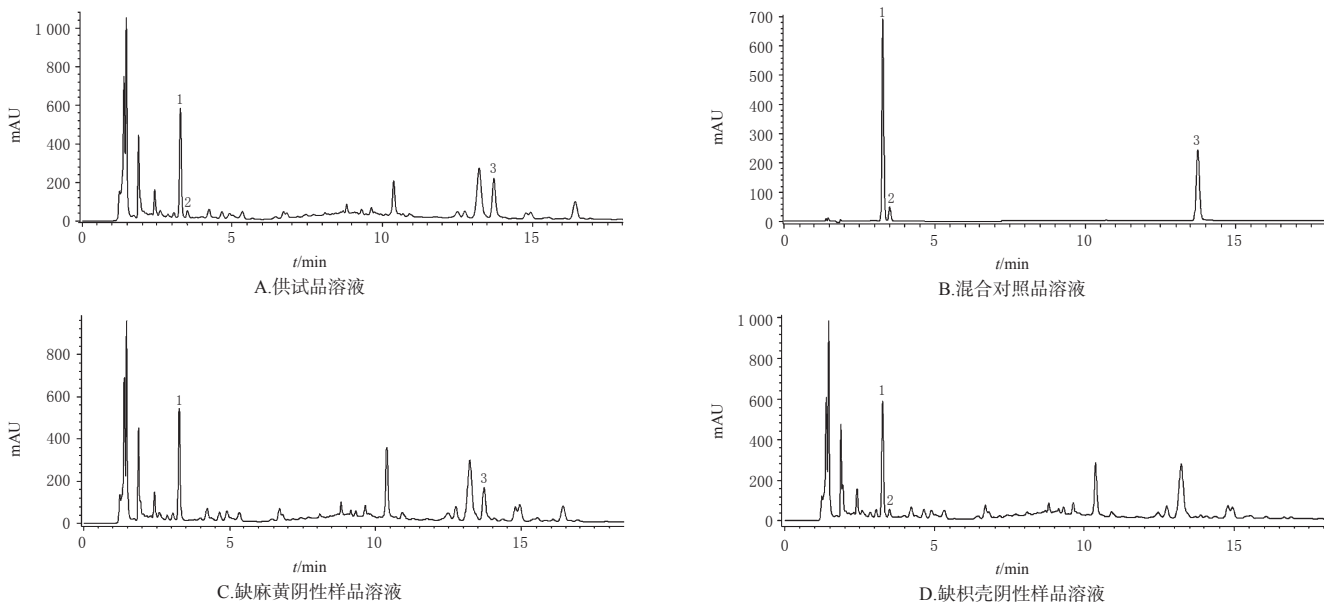
1: 鱼腥草对照药材; 2: 缺鱼腥草阴性样品; 3: 急支糖浆供试品一溶液(批号19040073); 4: 前胡对照药材; 5: 缺前胡阴性样品; 6: 白花前胡甲素对照品

图6 鱼腥草和前胡药材在不同温湿度下的HPTLC图(紫外光)

2.2.5 线性关系考察及定量限、检测限测定

取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,用80%甲醇分别稀释2、5、10、25、50、100倍,将混合对照品溶液及系列稀释混合对照品溶液按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,

记录峰面积。以对照品浓度(x)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标,计算得回归方程;以峰高信号为基线噪音信号的10倍确定定量限,以峰高信号为基线噪音信号的3倍确定检测限,结果见表1。



1:原儿茶酸;2:盐酸麻黄碱;3:柚皮苷

图7 供试品溶液、混合对照品溶液和阴性样品溶液HPLC图

表1 原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷的回归方程、线性范围、定量限、检测限测定结果

成分	线性回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	检测限/($\mu\text{g/mL}$)	定量限/($\mu\text{g/mL}$)
原儿茶酸	$y=31.88x+151.16$	0.996 4	4.32~431.67	0.06	0.11
盐酸麻黄碱	$y=11.29x-3.65$	0.999 9	1.14~114.17	0.23	0.57
柚皮苷	$y=13.57x-11.55$	0.999 9	7.02~702.33	0.35	0.70

2.2.6 精密度考察

取一份供试品溶液(批号19040075),按“2.2.3”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示,原儿茶酸、盐酸麻黄碱、柚皮苷峰面积的RSD分别为0.16%、0.71%、0.09%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性考察

取同一批急支糖浆样品(批号19040075),按“2.2.1”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积,并代入线性回归方程计算含量。结果显示,原儿茶酸、盐酸麻黄碱、柚皮苷含量的RSD分别为1.50%、1.30%、1.45%($n=6$),表明供试品溶液制备方法的重复性良好。

2.2.8 稳定性考察

取一份供试品溶液(批号19040075),分别于室温放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,原儿茶酸、盐酸麻黄碱、柚皮苷峰面积的RSD分别为0.33%、1.10%、0.26%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验

基于实测1 mL急支糖浆(批号19040075)中含原儿茶酸679.3 μg 、盐酸麻黄碱151.6 μg 、柚皮苷1 170.8 μg ,精密量取该批次急支糖浆1 mL置于10 mL量瓶中,加入1.280 mg/mL的原儿茶酸对照品溶液500 μL 、0.770

mg/mL的盐酸麻黄碱对照品溶液200 μL 、2.314 mg/mL的柚皮苷对照品溶液500 μL ,加入80%甲醇定容,摇匀,12 000 r/min离心10 min,取上清液,用0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得加样回收样品溶液。平行制备6份样品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,原儿茶酸、盐酸麻黄碱、柚皮苷的平均回收率分别为100.61%、100.40%、99.22%,RSD分别为1.21%、1.82%、1.58%($n=6$),表明该方法准确可靠。结果见表2。

表2 原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷的加样回收率试验结果($n=6$)

成分	初始含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
原儿茶酸	679.3	640.0	1 333.1	102.16	100.61	1.21
	679.3	640.0	1 320.2	100.14		
	679.3	640.0	1 315.9	99.47		
	679.3	640.0	1 313.8	99.14		
	679.3	640.0	1 326.1	101.06		
	679.3	640.0	1 330.1	101.69		
盐酸麻黄碱	151.6	154.0	305.3	99.81	100.40	1.82
	151.6	154.0	304.7	99.42		
	151.6	154.0	309.1	102.27		
	151.6	154.0	309.2	102.34		
	151.6	154.0	307.1	100.97		
	151.6	154.0	301.9	97.60		
柚皮苷	1 170.8	1 157.0	2 325.1	99.77	99.22	1.58
	1 170.8	1 157.0	2 319.5	99.28		
	1 170.8	1 157.0	2 306.5	98.16		
	1 170.8	1 157.0	2 332.8	100.43		
	1 170.8	1 157.0	2 338.9	100.96		
	1 170.8	1 157.0	2 289.5	96.69		

2.2.10 急支糖浆样品含量测定

取10批急支糖浆样品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面

积,并代入线性回归方程计算样品中原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷的含量。每批样品平行测定2次,取平均值,结果见表3。

表3 10批急支糖浆含量测定结果($n=2$, $\mu\text{g/mL}$)

批号	原儿茶酸	盐酸麻黄碱	柚皮苷
19040073	593.8	155.1	1224.2
19040074	584.8	147.8	1166.1
19040075	679.3	151.6	1170.8
19040077	621.8	145.5	1237.4
19040079	688.9	148.7	1294.4
19040097	563.8	162.1	1212.7
19040098	678.2	165.1	1258.1
19040101	640.7	130.2	1116.9
19040114	651.2	158.4	1234.3
19040116	530.8	156.6	1224.4
平均值	623.3	152.1	1213.9
RSD/%	8.62	6.54	4.18

3 讨论

3.1 HPTLC鉴别和HPLC含量测定指标成分的选择

基于“整体鉴别”思路,为实现一板多药味鉴别,本研究选择甘草、枳壳、四季青药材中的黄酮类成分甘草苷、柚皮苷、具栖冬青苷进行同板鉴别,选择前胡药材中的香豆素类成分白花前胡甲素和鱼腥草对照药材进行同板鉴别;使用鱼腥草对照药材鉴别虽无法指认具体成分,但2个特征性斑点仍可保证鉴别的准确性。薄层鉴别指标成分的选择均参照2020年版《中国药典》标准:柚皮苷、具栖冬青苷(又名长梗冬青苷)、白花前胡甲素均为鉴别枳壳、四季青、前胡药材的特征成分,甘草苷是甘草药材含量测定的特征成分,满足专属性条件。本研究较2020年版《中国药典》,去除了非专属性成分原儿茶酸和阿魏酸成分的鉴别,增加专属性成分甘草苷(来源于甘草)、具栖冬青苷(来源于四季青)及鱼腥草对照药材特征斑点的鉴别。专属性成分的鉴别可以实现工业生产中原药材的可追溯性;而非专属性成分由于来源于多个药材,即便检出也无法准确判定该批次急支糖浆的质量,所以专属性成分鉴别是中药复方制剂薄层鉴别的发展趋势。对于麻黄、金荞麦、紫菀3种处方药材,麻黄中的代表性成分为生物碱类成分,样品制备条件和展开系统条件均要求偏碱性条件^[16],不适宜与其他成分进行同板鉴别,所以仍沿用药典方法;目前金荞麦、紫菀的水提液中可检出特征成分表儿茶素和紫菀酮,但在急支糖浆中无法检出,推测与这2种成分水溶性差、工业化生产未粉碎药材等因素相关^[17],笔者推荐使用液质联用技术对金荞麦和紫菀的特征成分进行鉴别。

结合质量标志物筛选“五原则”中的可测性、特有性和功效关联性原则,本研究的含量测定选择原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷3种活性成分进行含量测定。原儿茶酸、盐酸麻黄碱、柚皮苷在10批急支糖浆中的平均含

量分别为623.3、152.1、1213.9 $\mu\text{g/mL}$,且其色谱峰分离度均大于1.5,满足可测性原则^[15]。原儿茶酸来源于四季青、金荞麦、鱼腥草等多味药材,虽非专属性成分,却是复方中的代表性酚酸类成分,具有调节机体氧化应激和炎症反应等作用^[18];盐酸麻黄碱是麻黄药材的特征性生物碱成分,有解热、发汗、止咳、抗哮喘等功效^[19];柚皮苷是枳壳药材的特征性二氢黄酮类成分,有抗氧化、抗炎、抗凋亡、抗溃疡等作用^[20]。以上3种活性成分均与急支糖浆的功效作用相关,是潜在的质量标志物。

3.2 HPTLC前处理方法及薄层色谱条件考察

在HPTLC方法建立过程中,对甘草、枳壳、四季青药材的鉴别,考察了不同样品前处理方法(直接萃取、5%氢氧化钠溶液调至pH11~12再萃取、稀盐酸调至pH2~3再萃取),不同展开剂[正丁醇-乙醇-水(体积比4:1:5,取上层)、正丁醇-乙酸乙酯-水(体积比4:1:5,取上层)、三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(体积比15:40:22:15,4℃静置取下层)、三氯甲烷-甲醇-水(体积比16:10:3,4℃静置取下层)],不同显色剂(10%硫酸乙醇溶液、5%香草醛硫酸溶液、2%三氯化铝甲醇溶液),不同检视条件(日光、紫外光254 nm和366 nm)以及不同展距(60、70、80 mm)。对急支糖浆中前胡和鱼腥草药材的鉴别,考察了不同样品前处理方法(考察项同上),不同展开剂[二氯甲烷-丙酮(体积比15:1)、环己烷-乙酸乙酯(体积比4:1)、三氯甲烷-甲醇(体积比19:1)、三氯甲烷-乙酸乙酯-丙酮(体积比5:1:4)、环己烷-乙酸乙酯(体积比9:5)],不同显色剂(10%硫酸乙醇溶液、5%磷钼酸乙醇溶液、2,4-二硝基苯腈盐酸乙醇溶液),不同检视条件(考察项同上)和不同展距(65、75、85 mm)等各因素对展开效果的影响。最终所选择的样品前处理方法和薄层色谱条件均为各项考察下的最优结果,经后期各项方法学考察证实,专属性、耐用性、批次重复性良好。

3.3 HPLC前处理方法及色谱条件考察

在采用HPLC法测定含量过程中,考察了不同溶剂(60%甲醇、80%甲醇、甲醇、80%乙醇、乙醇)制备供试品溶液的效果,考察了水相添加剂0.1%磷酸、0.1%甲酸和0.1%冰醋酸的分离效果,考察了柱温30、35、40、45℃的分离效果,也考察了不同检测波长、进样量、流速等多个色谱条件,选择了最优的样品制备方法和色谱条件作为本实验条件。其中,盐酸麻黄碱仅在210 nm下有末端吸收,当使用0.1%磷酸作为添加剂时,在210 nm波长下整体基线平稳,所以本色谱条件对于仅有末端吸收的化合物成分检测非常适用。经验证,本研究所建立的HPLC含量测定方法同样适用于1200型HPLC系统(美国Agilent公司),耐用性好。

综上,本研究建立了急支糖浆的一板多药味 HPTLC 鉴别法和 HPLC 含量测定法。HPTLC 法采用 1 种样品前处理方法、2 个薄层色谱条件,实现了对急支糖浆中 5 种药材的快速鉴别,并同时覆盖君、臣、佐、使 4 类配伍药材,专属性、耐用性、批次重复性良好;HPLC 法实现了对急支糖浆中 3 种活性成分原儿茶酸、盐酸麻黄碱和柚皮苷的快速定量,方法便捷高效,精密度、稳定性、耐用性好。本研究为优化《中国药典》中急支糖浆的鉴别项和含量测定项、提升其质量控制标准提供了依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020 年版.北京:中国医药科技出版社,2020:1372-1373.
- [2] 红星新闻.赶快收藏!四川新冠肺炎中医药防控技术指南(第五版)来了[EB/OL].[2021-10-10]. <https://sichuan.scol.com.cn/sczh/202012/57978238.html>.
- [3] 张娅.急支糖浆研究概述[J]. 亚太传统医药,2019,15(8):182-184.
- [4] 张前进,崔海燕,黎巍威,等.“清肺止咳化痰汤”治疗急性气管-支气管炎及慢性支气管炎急性发作 149 例临床研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2017,23(2):237-239,265.
- [5] 陈延军,郝东伟,杨立波.急支糖浆或抗生素治疗单纯急性气管-支气管炎的随机对照临床研究[J]. 中药药理与临床,2015,31(1):262-264.
- [6] 潘妮婕,刘琳,刘晓星,等.高效液相色谱-电化学法测定四季青叶中 4 种化合物的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(6):870-873.
- [7] 李敏,郭青,张潇. HPLC 法同时测定金荞麦片中 6 个多酚类成分[J]. 药物分析杂志,2015,35(4):644-648.
- [8] 万昶宸,刘艳艳,杨浩天,等. HPLC-MS/MS 法同时测定紫菀中 9 种化学成分[J]. 中草药,2016,47(14):2534-2539.
- [9] VERARDO V, GLICERINA V, COCCI E, et al. Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb[J]. LWT, 2018, 87:217-224.
- [10] 闫凯莉,尹程程,刘梦瑶,等. 芩连润肺汤的 HPLC 指纹图谱建立、含量测定及多元统计分析[J]. 中国药房, 2021, 32(16):1956-1963.
- [11] 周跃华,路金才,周娟,等.关于中药新药复方制剂“整体鉴别”新模式的思考[J]. 中草药,2021,52(8):2199-2204.
- [12] 张子龙,李雯珊,滕菲,等.绞股蓝总苷提取物及总苷片的质量标准研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(24):5976-5981.
- [13] LIU F, WANG M Y, LI X B. Simultaneous qualitative characterization of four herbs in Weikangling capsules by a validated high-performance thin-layer chromatography method[J]. JPC-J Planar Chromatogr-Mod TLC, 2020, 33(5):449-455.
- [14] MEIER B, SPRIANO D. Modern HPTLC: a perfect tool for quality control of herbals and their preparations[J]. J AOAC Int, 2010, 93(5):1399-1409.
- [15] 刘昌孝.中药质量标志物(Q-marker):提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展[J]. 中草药, 2019,50(19):4517-4518.
- [16] 李红霞,丁明玉,吕琨,等.麻黄、含麻黄中成药及生物体液中麻黄碱的定量分析方法[J]. 药物分析杂志,2001,21(2):142-145.
- [17] 巢颖欣,刘梦诗,杨秀娟,等.薄层色谱法快速鉴别广陈皮与陈皮[J]. 中成药,2021,43(7):1937-1940.
- [18] AL OLAYAN E M, ALOUFI A S, ALAMRI O D, et al. Protocatechuic acid mitigates cadmium-induced neurotoxicity in rats: role of oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. Sci Total Environ, 2020, 723:137969.
- [19] WU X, ZHANG H B, FAN S S, et al. Quality markers based on biological activity: a new strategy for the quality control of traditional Chinese medicine[J]. Phytomedicine, 2018, 44:103-108.
- [20] CHEN R, QI Q L, WANG M T, et al. Therapeutic potential of naringin: an overview[J]. Pharm Biol, 2016, 54(12):3203-3210.

(收稿日期:2021-10-12 修回日期:2021-12-14)

(编辑:曾海蓉)