

金牡感冒片的质量标准研究^Δ

许舒瑜^{1*}, 彭军^{2#}, 陈小玲¹, 张富洪¹, 陈宇敏¹, 黄鸣清¹, 徐伟¹, 沙玫¹(1.福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2.福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350122)

中图分类号 R283.61; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3682-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.12

摘要 目的:建立金牡感冒片的质量标准。方法:采用薄层色谱法对金牡感冒片中金银花、牡荆根、三叉苦、山甘草、薄荷油进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中绿原酸的含量,色谱柱为 ODS-BP(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89, V/V),柱温为 25 ℃,流速为 1.2 ml/min,进样量为 5 μl,检测波长为 327 nm。结果:金银花、牡荆根、三叉苦、山甘草、薄荷油的薄层色谱图斑点清晰、分离度好、专属性强、阴性无干扰。绿原酸的质量浓度在 14.448~168.560 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9995$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;平均加样回收率为 99.82%, RSD=2.40%($n=9$)。结论:所建标准可用于金牡感冒片制剂的质量控制。

关键词 金牡感冒片;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;绿原酸

Study on Quality Standard of Jinmu Ganmao Tablets

XU Shu-yu¹, PENG Jun², CHEN Xiao-ling¹, ZHANG Fu-hong¹, CHEN Yu-min¹, HUANG Ming-qing¹, XU Wei¹, SHA Mei¹(1.College of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 2.Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Jinmu ganmao tablets. METHODS: The qualitative identification of *Lonicerae japonicae*, *Vitex negundo*, *Evodia lepta*, *Mussaenda Pubescentis*, mentha arvensis oil were carried out by TLC. The content of chlorogenic acid was determined by HPLC. The determination was performed on ODS-BP(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (11:89, V/V) at the flow rate of 1.2 ml/min. The column temperature was 25 ℃, and the sample size was 5 μl. The detection wavelength was set at 327 nm. RESULTS: TLC spots were fairly clear, separated well and specific yet without interference from negative control. The linear range of chlorogenic acid was 14.448-168.560 μg/ml ($r=0.9995$) with an average recovery of 99.28% (RSD=2.40%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%. CONCLUSIONS: The established quality standard is suitable for the quality control of Jinmu ganmao tablets.

KEYWORDS Jinmu ganmao tablets; Quality standard; TLC; HPLC; Chlorogenic acid

金牡感冒片由金银花、牡荆根、贯众、葫芦茶、三叉苦、山甘草、薄荷油等 7 味中药组成,具有疏风解表、清热解毒之功效,临床上一般用于外感风热、发热恶寒、头痛咳嗽和咽喉肿痛。原制剂标准^[1]只有金银花的显微鉴别,不能有效地控制该产品的质量。为此,笔者采用薄层色谱(TLC)法对方中金银花、牡荆根、山甘草、三叉苦、薄荷油进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法对方中有效成分绿原酸进行了定量分析,以期为该制剂的质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 型 HPLC 仪(美国戴安公司);KQ 5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DHG-9023A 型台式电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);XS105 型电子分析天平(美国梅特勒-托利多公司);2F1-I 多功

能紫外分析仪(上海佳鹏科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

金牡感冒片(福建片仔癀有限公司,批号:1211017、1209015、1208010);绿原酸、薄荷素油、薄荷脑对照品和金银花、牡荆根、山甘草、三叉苦对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为 200413、200702、200506、201107、110762、110923、120108);硅胶 G(化学纯,青岛海洋化工厂);甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 金银花的 TLC 鉴别^[2] 取本品 5 片,研细,称取 0.5 g,加甲醇 5 ml,密塞振摇数分钟,放置 30 min,滤过,即得供试品溶液。另取缺金银花的阴性样品 0.5 g(按制剂工艺制备)及金银花对照药材 0.4 g,同法制成阴性对照溶液和金银花对照药材溶液。再取绿原酸对照品适量,加甲醇制成每 1 ml 含 2 mg 的溶液,作为绿原酸对照品溶液。照 TLC 法^[2],吸取上述 4 种溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5, V/V/V)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药

Δ 基金项目:福建省科技计划资助项目(No.2012Y4005)

* 硕士研究生。研究方向:中药活性成分及其质量标准。E-mail: xushuyu1990@gmail.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药抗肿瘤。E-mail: pjunlab@hotmail.com

材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰。金银花的TLC图见图1。

2.1.2 牡荆根的TLC鉴别^[3] 取本品20片,研细,称取5g,加甲醇50ml,超声30min,滤过,减压回收至滤液无醇味,加水25ml溶解后加于D101大孔吸附树脂柱(内径1.5cm,柱高15cm,湿法装柱)上^[4],用水洗至水洗液近无色,用40%乙醇50ml洗涤后,再用80%乙醇50ml洗脱,收集洗脱液,蒸干,加10ml甲醇使溶解,即得供试品溶液。另取缺牡荆根的阴性样品5g(按制剂工艺制备)和牡荆根对照药材5g,同法制成阴性对照溶液和牡荆根对照药材溶液。照TLC法^[2],吸取上述3种溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-乙酸乙酯-苯-甲醇(2.4:2:1:1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰。牡荆根的TLC图见图2。

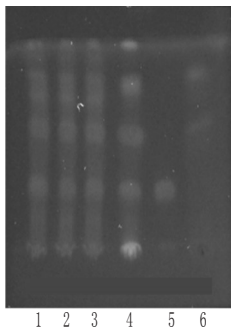


图1 金银花的TLC图

1~3.供试品;4.金银花对照药材;5.绿原酸对照品;6.阴性对照

Fig 1 TLC of *Lonicerae japonicae*

1-3.test samples; 4.*Lonicerae japonicae* reference substance; 5. chlorogenic acid control; 6. negative control

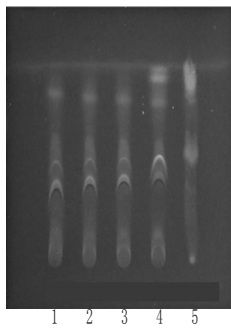


图2 牡荆根的TLC图

1~3.供试品;4.牡荆根对照药材;5.阴性对照

Fig 2 TLC of *Vitex negundo*

1-3. test samples; 4. *Vitex negundo* reference substance; 5. negative control

2.1.3 三叉苦的TLC鉴别^[5] 取本品20片,研细,称取5g,加60%乙醇40ml,加热提取1h,滤过,减压回收至滤液无醇味,加水10ml溶解后,用醋酸乙酯萃取3次,每次20ml,合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇3ml使溶解,即得供试品溶液。另取缺三叉苦的阴性样品5g(按制剂工艺制备)和三叉苦对照药材1g,同法制成阴性对照溶液和三叉苦对照药材溶液。照TLC法^[2],吸取供试品溶液10 μ l,阴性对照溶液、三叉苦对照药材溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以苯-乙酸乙酯-甲醇(15:10:0.1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(302nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰。三叉苦的TLC图见图3。

2.1.4 山甘草的TLC鉴别^[6] 取本品20片,研细,称取5g,加无水乙醇50ml,回流提取1h,滤过,滤液蒸至近3ml,即得供试品溶液。另取缺山甘草的阴性样品5g(按制剂工艺制备)和山甘草对照药材2g,同法制成阴性对照溶液和山甘草对照药材溶液。照TLC法^[2],吸取供试品溶液和山甘草对照药材溶液各5 μ l、阴性对照溶液10 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙醇(3:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯

(365nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰。山甘草的TLC图见图4。

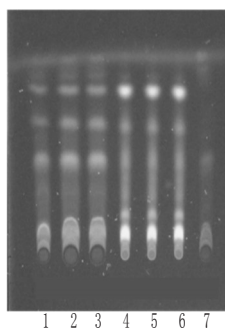


图3 三叉苦的TLC图

1~3.供试品;4~6.三叉苦对照药材;7.阴性对照

Fig 3 TLC of *Evodia lepta*
1-3.test samples; 4-6.*Evodia lepta* reference substance; 7.negative control

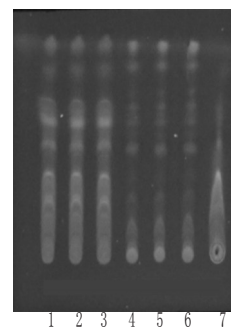


图4 山甘草的TLC图

1~4.供试品;4~6.山甘草对照药材;7.阴性对照

Fig 4 TLC of *Mussaenda pubescentis*
1-4.test samples; 4-6.*Mussaenda pubescentis* reference substance; 7.negative control

2.1.5 薄荷油的TLC鉴别^[7] 取本品20片,研细,称取3g,加石油醚5ml,密塞振摇数分钟,放置30min,滤过,即得供试品溶液。另取缺薄荷油的阴性样品3g(按制剂工艺制备)和薄荷素油对照品0.3ml,同法制成阴性对照溶液和薄荷素油对照品溶液;再取薄荷脑对照品,加石油醚制成每1ml含20mg的溶液,作为薄荷脑对照品溶液。照TLC法^[2],吸取供试品溶液和薄荷脑对照品溶液各10 μ l,薄荷素油对照品溶液、阴性对照溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯(19:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。结果,供试品色谱中,在与薄荷素油对照品和薄荷脑对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。薄荷油的TLC图见图5。

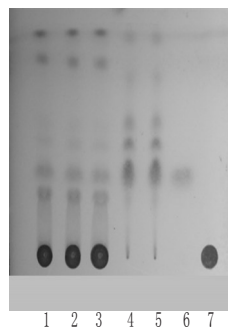


图5 薄荷油的TLC图

1~3.供试品;4~5.薄荷素油对照品;6.薄荷脑对照品;7.阴性对照

Fig 5 TLC of *mentha arvensis* oil
1-3. test samples; 4-5. peppermint oil control; 6. menthol reference substance; 7. negative control

2.2 绿原酸的含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验^[8] 色谱柱:依利特ODS-BP(250mm \times 4.6mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89, V/V);流速:1.2ml/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ l;检测波长:327nm。理论板数按绿原酸色谱峰计数应不低于5000;其余组分的色谱峰能达到基线分离,分离度>1.5。色谱见图6。

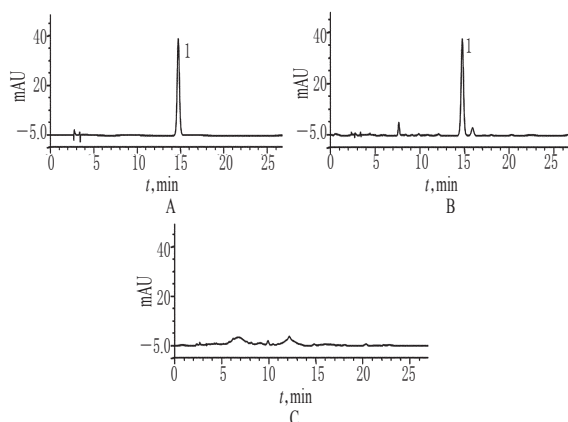


图6 高效液相色谱图

A.绿原酸对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.绿原酸

Fig 6 HPLC chromatograms

A.chlorogenic acid control; B.test sample; C. negative control; 1. chlorogenic acid

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量,加50%甲醇制成每1 ml含43.20 μg的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品5片,研细,取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 ml,称质量,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次精密称定,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 取绿原酸对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成质量浓度为481.60 μg/ml的溶液。精密量取0.3、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 ml,分别置10 ml棕色量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列质量浓度的对照品溶液,分别按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以绿原酸的质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,以峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程: $y=0.131x-0.672$ ($r=0.9996$, $n=7$)。结果表明,绿原酸的质量浓度在14.448~168.560 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取绿原酸对照品溶液适量(质量浓度:72.24 μg/ml),照上述色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果, $RSD=0.32%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于0、1、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, $RSD=0.68%$ ($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品6份,各约0.5 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸的平均含量为4.67 mg/g, $RSD=1.2%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知绿原酸含量(4.705 mg/g)的金牡感冒片9份,每份约0.25 g,精密称定,置25 ml具塞量瓶中,精密加入绿原酸对照品溶液(质量浓度:1.018 mg/ml)0.8、1.0、1.2 ml,按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,重复3次,计算加样回收率,结果见表1。

2.2.9 样品含量测定 取3批金牡感冒片(批号:1211017、1209015、1208010),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,3批样品中绿原

酸的含量分别为4.57、4.07、5.17 mg/g,平均含量为4.60 mg/g。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=9$)

称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
0.249 5	1.174	0.814	1.992	100.46		
0.250 4	1.178	0.814	2.005	101.56		
0.248 2	1.168	0.814	1.959	97.16		
0.250 1	1.177	1.018	2.158	96.38		
0.251 8	1.185	1.018	2.199	99.60	99.82	2.40
0.250 2	1.177	1.018	2.199	100.36		
0.250 4	1.178	1.222	2.409	100.72		
0.250 2	1.177	1.222	2.375	97.99		
0.252 2	1.187	1.222	2.460	104.17		

3 讨论

在绿原酸的含量测定中,笔者通过查阅文献^[8]并参考2010年版《中国药典》(一部)^[2]的方法,对其色谱条件进行了单因素考察:磷酸体积分数(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.6%)、乙腈-磷酸溶液比例(10:90、11:89、12:88、13:87、15:85, V/V)、进样量(5、10、15 μl)、流速(0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 ml/min)等。结果表明,以乙腈-0.1%磷酸(11:89, V/V)为流动相、进样量5 μl、流速1.2 ml/min时的绿原酸峰形较好,分离度好,出峰时间适宜,且阴性对照无干扰。

在供试品处理方法的考察中,由于绿原酸属小分子有机酸类成分,易溶于水、乙醇^[9]和丙酮,故笔者分别对水、50%甲醇、纯甲醇、70%乙醇4种提取溶剂进行了考察。结果,4种溶剂提取液中绿原酸的含量分别为3.759、3.768、1.761、3.562 mg/g。其中,水和50%甲醇提取效果较好,但考虑到水提取液中极性成分较多,HPLC色谱峰多,容易影响主峰信号,故最终采用50%甲醇作为提取溶剂。同时,笔者还考察了超声时间(20、30、40 min)和溶剂用量(20、30、50、60、70 ml)。结果表明,超声30 min即可提取完全,而溶剂用量在20~70 ml内对提取率影响不大,故本试验最终选用25 ml。

综上所述,本方法准确度、灵敏度高,检测范围广,可作为金牡感冒片的质量控制方法。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第十册[S].北京:化学工业出版社,1998:91.
- [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、附录8、34.
- [3] 高磊.牡荆根的鉴别[J].海峡药学,2004,16(2):82.
- [4] 黄鸣清,李卓明,谢友良,等.消渴通络胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2012,23(27):2557.
- [5] 刘乡乡,康志英,黄晓玲,等.复方感冒灵片质量标准研究[J].中药材,2003,26(4):282.
- [6] 陈鹤立.山甘草的鉴别[J].海峡药学,2005,17(4):94.
- [7] 苏芳,黄力,赖文红,等.复方碘甘油质量鉴别方法[J].中国中医药现代远程教育,2013,11(10):155.
- [8] 魏尊喜.HPLC法测定金牡感冒片中绿原酸的含量[J].药物分析杂志,2009,19(08):1359.
- [9] 贺帅,姚育法,周本杰,等.不同干燥工艺对热毒清颗粒中指标成分保留率的影响[J].中国药房,2013,24(31):2916.

(收稿日期:2013-09-27 修回日期:2014-01-03)