

· 研究报告 ·

清热败毒颗粒剂的质量标准研究

夏天¹, 张兵², 高守红¹, 陆文铨¹, 朴淑娟¹, 庞涛¹ (1. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003; 2. 海军上海水电路离职干部休养所门诊部药房, 上海 200083)

[摘要] **目的** 建立清热败毒颗粒剂的质量标准。**方法** 采用薄层色谱法(TLC)鉴别处方中的板蓝根、连翘、紫花地丁和甘草, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定绿原酸的含量, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)与含 0.2% 甲酸的水溶液(B), 梯度洗脱; 0~12 min, 11%~12% A; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 327 nm; 进样量: 20 μl。**结果** 薄层鉴别色谱中特征斑点明显, 专属性强。绿原酸在 6.19~396.00 μg/ml 浓度范围内呈良好线性关系, 其回归方程为 $Y=60.2394X+9.0963$ ($r>0.9999$), 回收率为 99.66% (RSD=2.82%)。**结论** 该法简便、稳定可靠、重复性好, 为控制清热败毒颗粒的质量标准提供了可借鉴的依据。

[关键词] 高效液相色谱法; 薄层色谱法; 绿原酸; 清热败毒颗粒

[中图分类号] R284

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)05-0450-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.05.018

Quality control standard for Qingre Baidu granules

XIA Tianyi¹, ZHANG Bing², GAO Shouhong¹, LU Wenquan¹, PIAO Shujuan¹, PANG Tao¹ (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Pharmacy of Clinic, Retired Navy Officer Home, Shuidian Road, Shanghai 200083, China)

[Abstract] **Objective** To establish a quality control standard for Qingre Baidu granules. **Methods** Isatidis Radix, Fructus Forsythiae, Herba Violae, and Glycyrrhizae were identified by TLC, and the concentration of chlorogenic acid was determined by HPLC. This method was employed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 30°C with a mobile phase of acetonitrile (A) and 0.2% formic acid (B) using the gradient elution program shown as follows: 0-12 min, 11%-12% A run at the flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume was 20 μl and the detection wavelength was 327 nm. **Results** Characteristic spots could be detected by TLC and the specificity of the method was satisfactory. As for chlorogenic acid, the equation of linear regression of chlorogenic acid was $Y=60.2394X+9.0963$ ($r=0.9999$) with the linear range of 6.19-396.00 μg/ml. The average recovery was 99.66% (RSD=2.82%). **Conclusion** The established method is simple, reliable, reproducible, and can be used for the quantitative determination and quality control of Qingre Baidu granules.

[Key words] HPLC; TLC; chlorogenic acid; Qingre Baidu granules

军队医院制剂具有反应快、调度快、适应强等特点,能够在应急情况下满足军事战争和应对突变的药品需求,加强军队医院制剂质量的监测是保证军民用药安全有效的前提^[1,2]。清热败毒颗粒是我院自制制剂,本处方由金银花、板蓝根、连翘、紫花地丁、桔梗、甘草等十味中药组成,具有清热解毒、疏风散热的功效。该药主要用于感冒及上呼吸道感染、急性扁桃体炎、无名肿毒等。在战时具有抗菌消炎及增强士兵机体免疫力的作用。但目前军队制剂的

质量标准并不完善,随着药品监督管理法制化体系的日趋健全,急需建立通用、有效、便捷的检测方法来进行质量控制^[3]。经处方分析,绿原酸是清热败毒颗粒中重要的活性成分。绿原酸具有抗菌消炎、抗病毒、保肝利胆、抗肿瘤、抗氧化、增强机体免疫等多种药理活性^[4-9],广泛应用于医药、食品、化妆品等许多领域。清热败毒颗粒临床效果好,目前国内外尚未见有关其质量控制的文献报道。因此,为控制其临床用药的质量标准,保证其安全性和有效性,在原标准对板蓝根、连翘、紫花地丁进行 TLC 鉴别的基础上进行优化,并增加了对处方中甘草的鉴别,同时首次采用 HPLC 法测定处方中绿原酸的含量,所建方法简单、准确、重复性好,为评价和控制清热败毒颗粒的质量提供科学依据。

[作者简介] 夏天一,硕士研究生。研究方向:药物分析及临床药学。Tel:15618879906;E-mail:yoyosummer31823@126.com

[通讯作者] 高守红,硕士,主管药师。研究方向:药物分析及临床药学。Tel:(021)60748763;E-mail:gaoshouhong@126.com

1 仪器和试药

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括 G1311A 输液泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1314B-VWD 紫外检测器、Chemstation 色谱工作站(Agilent,美国);CPA225D 型十万分之一电子天平(Sartorius,德国);SK7200H 型超声仪(科导超声仪器有限公司,上海)。

1.2 试药 清热败毒颗粒(批号:130826、131111、140120)由第二军医大学附属长征医院制剂室生产,板蓝根、连翘、紫花地丁和甘草对照药材由第二军医大学附属长征医院制剂室提供,绿原酸对照品(批号:110753-201314,中国食品药品检定研究院),(*R,S*)-告依春对照品(批号:11753-201304,中国食品药品检定研究院),连翘苷对照品(批号:MB6835,大连美仑生物技术有限公司),秦皮乙素对照品(批号:MB6746,大连美仑生物技术有限公司),甘草苷对照品(批号:111610-201106,中国食品药品检定研究院);甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷、正丁醇均为分析纯,水为超纯水。

2 薄层鉴别

2.1 板蓝根 取本品粉末 1 g,加 80% 甲醇 20 ml,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取板蓝根对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。另取(*R,S*)-告依春对照品,加甲醇制成每 1 ml 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。另取缺板蓝根的阴性样品,按供试品溶液制备项下方法操作,制得阴性对照溶液。照薄层色谱法《《中华人民共和国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 4 种溶液各 30 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外线灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。结果见图 1。

2.2 连翘 取本品 3 g,加水 20 ml 使溶解,用等量乙酸乙酯提取 2 次,合并乙酸乙酯提取液,减压蒸干,残渣加 1 ml 甲醇使溶解,作为供试品溶液。另取连翘对照药材 1 g,加 30 ml 甲醇,加热回流 30 min,放冷,滤过,滤液蒸干至 1 ml,作为对照药材溶液。另取连翘苷对照品,加甲醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。另取缺连翘的阴性样品,按供试品溶液制备项下方法操作,制得阴性对照溶液。照薄层色谱法《《中华人民共和国药典》

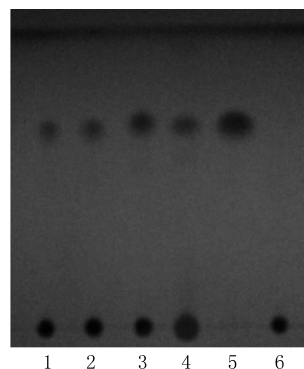


图 1 板蓝根 TLC 图

1,2,3. 供试品溶液(1.批号:130826;2.批号:131111;
3.批号:140120);4. 板蓝根对照药材溶液;
5. (*R,S*)-告依春对照品溶液;6. 缺板蓝根阴性对照溶液

2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述对照药材溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μ l,供试品溶液 30 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(10:2)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。供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。结果见图 2。

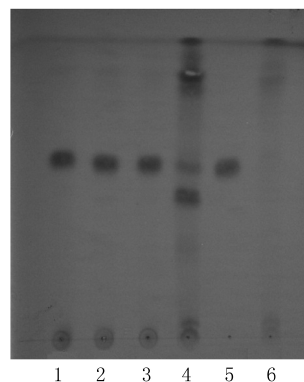


图 2 连翘 TLC 图

1,2,3. 供试品溶液(1.批号:130826;2.批号:131111;
3.批号:140120);4. 连翘对照药材溶液;
5. 连翘苷对照品溶液;6. 缺连翘阴性对照溶液

2.3 紫花地丁 取本品 3 g,加甲醇 20 ml,超声 15 min,滤过,滤液蒸发至 5 ml,作为供试品溶液。另取紫花地丁对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液,药材提取物黏稠,需稀释至 30 ml 再进行点样。另取秦皮乙素对照品,加甲醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。另取缺紫花地丁的阴性样品,按供试品溶液制备项下方法操作,制得阴性对照溶液。照薄层色谱法《《中华人民共和国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述对照药材溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μ l,供试品溶

液5 μl , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 三氯甲烷-甲醇-乙酸(8:0.5:0.1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外线灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。结果见图 3。

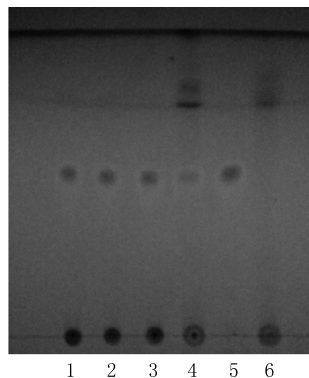


图3 紫花地丁 TLC图

1, 2, 3. 供试品溶液(1.批号:130826;2.批号:131111;3.批号:140120);4.紫花地丁对照药材溶液;5.秦皮乙素对照品溶液;6.缺紫花地丁阴性对照溶液

2.4 甘草 取本品粉末1 g, 加乙醚40 ml, 加热回流1 h, 滤过, 弃去醚液, 药渣加甲醇30 ml, 加热回流1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水40 ml使溶解, 用正丁醇提取3次, 每次20 ml, 合并正丁醇液, 用水洗涤3次, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇5 ml使溶解, 作为供试品溶液。另取甘草对照药材1 g, 同法制成对照药材溶液。另取甘草苷对照品, 加甲醇制成每1 ml含2 mg的溶液, 作为对照品溶液。另取缺甘草的阴性样品, 按供试品溶液制备项下方法操作, 制得阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中华人民共和国药典》2010年版一部附录VI B)试验, 吸取上述4溶液各10 μl , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以10%硫酸乙醇溶液, 在105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰, 置紫外线灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。结果见图 4。

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)与含0.2%甲酸的水溶液(B), 梯度洗脱: 0~12 min, 11%~12% A, 89%~88% B; 流速: 1 ml/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 327 nm; 进样量: 20 μl ; 运行时间: 12 min。

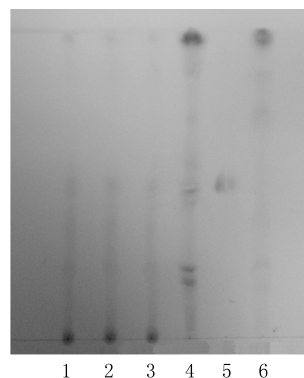


图4 甘草 TLC图

1, 2, 3. 供试品溶液(1.批号:130826;2.批号:131111;3.批号:140120);4.甘草对照药材溶液;5.甘草苷对照品溶液;6.缺甘草阴性对照溶液

3.2 溶液的准备

3.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸对照品4.95 mg, 置5 ml的棕色容量瓶中, 用50%甲醇定容, 摇匀即得浓度为0.99 mg/ml的母液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.2.2 供试品溶液 将清热败毒颗粒样品(批号: 130826)研成细粉, 取约1 g, 精密称定, 装入25 ml用锡箔纸包好的锥形瓶中, 精密加入30%甲醇10 ml, 摇匀, 称重, 超声处理30 min, 冷却后再称重, 用30%甲醇补足失重, 经0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

3.2.3 阴性对照溶液 按处方工艺制备缺金银花、野菊花和蒲公英的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

3.3 方法学考察

3.3.1 系统适用性试验 分别取阴性对照溶液、绿原酸对照品溶液和供试品(批号: 130826)溶液按“3.1”项色谱条件进样分析。在本实验条件下, 绿原酸的保留时间约为9.0 min, 绿原酸与其相邻峰的分度度大于1.5。阴性对照溶液在绿原酸出峰位置处无干扰峰, 供试品溶液中绿原酸色谱峰与其他组分色谱峰能够实现良好分离, 以绿原酸计算理论塔板数大于3 000(图5)。

3.3.2 标准曲线的制备 采用逐级稀释法, 配制绿原酸对照品浓度为6.19、12.38、24.75、49.50、99.00、198.00、396.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列对照品溶液。按“3.1”项色谱条件进样分析, 以液相色谱峰面积为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X)进行线性回归, 得回归方程: $Y=60.2394X+9.0963$, $r=0.9999$, 线性范围6.19~396.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3.3.3 精密度试验 取绿原酸浓度为99.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液, 按“3.1”项色谱条件重复进样6次。

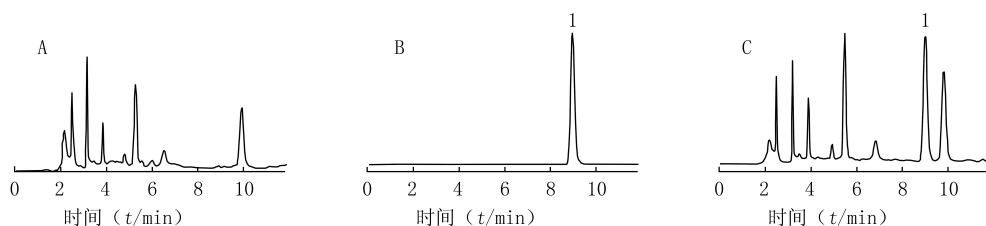


图5 绿原酸 HPLC 色谱图

A. 阴性对照溶液; B. 绿原酸对照品溶液(50 µg/ml); C. 供试品溶液(批号:130826); 1. 绿原酸

计算绿原酸峰面积 RSD 为 0.03%, 结果表明仪器精密度良好。

3.3.4 重复性试验 取清热败毒颗粒(批号:130826),按“3.2.2”项方法制备6份供试品溶液,按“3.1”项色谱条件进样,测定峰面积并计算含量,结果6份供试品溶液中绿原酸含量分别为0.363 0、0.351 9、0.364 7、0.364 2、0.364 1、0.337 1 mg/g,平均值为0.357 5 mg/g, RSD 为 2.84%,表明该方法重复性良好。

3.3.5 稳定性试验 取清热败毒颗粒(批号:130826),按“3.2.2”项方法制备供试品溶液,分别在0、2、4、8、24 h时测定绿原酸色谱峰峰面积, RSD 为 0.41% (n=3),结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

3.3.6 加样回收率试验 取清热败毒颗粒(批号:130826)6份,精密加入相当样品含量100%的绿原酸对照品,按“3.2.2”项方法处理样品,按“3.1”项色谱条件进样,计算加样回收率,得绿原酸平均回收率为99.66%, RSD 为 2.82%。结果见表1。

表1 绿原酸加样回收率(n=3)

试验次数	样品量(m/g)	含绿原酸量(m/mg)	加入绿原酸量(m/mg)	测得总量(m/mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	1.000 42	0.357 7	0.360 0	0.706 8	96.97	99.66	2.82
2	1.000 39	0.357 6	0.340 0	0.706 7	102.68		
3	1.000 25	0.357 6	0.370 0	0.720 2	98.00		
4	1.000 17	0.357 6	0.360 0	0.713 2	98.78		
5	1.000 32	0.357 6	0.350 0	0.720 5	103.68		
6	1.000 41	0.357 6	0.370 0	0.719 6	92.83		

3.4 样品含量测定 按“3.2.2”项方法制备供试品溶液,每批制备3份,按“3.1”项色谱条件进样测定峰面积,根据标准曲线计算3批清热败毒颗粒中绿原酸的含量,结果见表2。

4 讨论

4.1 薄层鉴别 原标准中收录了板蓝根、连翘、紫

表2 3批清热败毒颗粒中绿原酸含量(n=3)

批次	绿原酸含量(mg/g)
130826	0.364 5
131111	0.203 0
140120	0.264 7

花地丁的 TLC 鉴别,但是缺乏相应对照品及阴性对照品,无法确定阴性对照溶液是否有干扰。本次薄层鉴别增加了标准对照品及阴性对照品。对连翘进行 TLC 条件摸索时比较了三氯甲烷-甲醇(20:1),三氯甲烷-甲醇(10:2)2种展开剂。结果发现三氯甲烷-甲醇(10:2)展开剂分离效果好,阴性对照没有干扰, Rf 值符合薄层鉴别要求。

4.2 流动相的考察 本实验分别考察了甲醇-甲酸水溶液,乙腈-醋酸水溶液及乙腈-甲酸水溶液,经过对酸的种类及浓度的考察,得出采用乙腈与含0.2%甲酸的水溶液为流动相时,绿原酸分离效果好,无拖尾现象,操作简单。

4.3 色谱柱的考察 本研究选用不同厂家不同填料类型的色谱柱(Agilent ZORBAX SB-C₁₈、Sepax HP-SCX、Diamosil C₁₈、GraceSmart RP₁₈),结果发现在 Diamosil C₁₈ 柱上绿原酸与邻近峰分离度未达标,无法对绿原酸进行含量测定,其他两根色谱柱同样条件下绿原酸出峰时间推迟,故最终选择了 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱,其分离效果好且稳定性和重现性好。

4.4 柱温和流速的考察 本研究考察了25、30、35℃3个不同柱温,结果发现30℃时,绿原酸的分离度较好,本研究还考察了1、1.1、1.2 ml/min不同流速对实验的影响,结果发现流速对实验结果影响不大,综合考虑柱压因素,最终确定流速为1 ml/min。

4.5 提取方法的优化 供试品溶液提取考察了超声和回流两种提取方法,结果无显著性差异,超声提取简便,故选择超声提取。同时考察了水、10%甲醇、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇和100%甲醇等不同比例的溶剂,结果30%甲醇对绿原酸提取效果

好(表3)。

表3 不同提取溶剂考察结果

提取溶剂	称样量 (m/g)	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)
100% 甲醇	1.000 72	0.053 9	0.0539
	1.000 72	0.053 9	
70% 甲醇	1.000 71	0.252 1	0.251 8
	1.000 71	0.251 6	
50% 甲醇	1.000 46	0.355 4	0.354 3
	1.000 46	0.353 3	
30% 甲醇	1.000 78	0.360 5	0.360 2
	1.000 78	0.359 9	
10% 甲醇	1.000 32	0.324 9	0.325 1
	1.000 32	0.325 3	
水	1.000 29	0.326 4	0.327 2
	1.000 29	0.328 0	

通过对3批样品的检测,结果发现不同批次间绿原酸含量差异较大,推测与原药材质量有关,为此,有必要采用本法对清热败毒颗粒中绿原酸含量进行检测,为评价和控制清热败毒颗粒的质量提供科学依据。

【参考文献】

[1] 汤迎爽,李富军. 浅议军队医院制剂发展方向[J]. 中医药导

报,2012,18(7):120-121.
 [2] 周苏萍,夏晓东,傅小英. 军队药品制剂抽验质量分析与建议[J]. 解放军药学学报,2010,26(2):176-177.
 [3] 黄立峰,宋洪涛. 目前形势下医院制剂在大型军队医院中的存在与发展[J]. 解放军药学学报,2006,22(1):77-79.
 [4] 李霞,杨颖博,李君丽,等. HPLC法同时测定皱皮木瓜中原儿茶酸和绿原酸的含量[J]. 中国医药导报,2012,9(34):110-112.
 [5] 赵金娟,戴雪梅,曲永胜,等. 绿原酸药效学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2013,32(4):1-5.
 [6] 吴卫华,康楨,欧阳冬生,等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:691-694.
 [7] 王丽萍,郭栋,王果,等. 中药绿原酸的研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(4):961-963.
 [8] Cai Y, Zhang ZH, Jiang SS, et al. Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination [J]. J Hazard Mater, 2014, 268:1-5.
 [9] Francisco V, Costa G, Figueirinha A, et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor-κB pathway inhibition; contribution of chlorogenic acid [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(1):126-134.

[收稿日期] 2015-03-06 [修回日期] 2015-06-28
 [本文编辑] 顾文华

(上接第436页)

3 讨论

海参是重要的海洋食物和药物资源,具有抗肿瘤、抗凝血、抗真菌、降低血黏度等作用^[11]。本文通过提取分离发现花刺参中3个新三萜皂苷类化合物,并对化合物I、II进行初步的抗肿瘤及抗真菌活性实验,化合物II的稻瘟霉活性筛选模型结果显示其具有一定的抗稻瘟霉活性,化合物I、II对白色念珠菌、近平滑念珠菌和新生隐球菌均具有一定抗真菌活性(MIC值分别为12.5、3.4 μg/ml;25、3.4 μg/ml;50、6.8 μg/ml),化合物II对人肝癌细胞株(BEL-7402)有一定的抑制作用。对该2个化合物的抗肿瘤、抗真菌活性机制有待进一步研究。

【参考文献】

[1] 姚新生. 海洋抗肿瘤药物研究展望[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(3): 233-235.
 [2] Hawa IJr, Zulaikah M, Jamaludin M, et al. The potential of the coelomic fluid in sea cucumber as an antioxidant [J]. Malays J Nutr, 1999, 5(1): 55-59.
 [3] 李茵,梁承红,张勇. 海参中有毒有害物质的分析研究

进展[J]. 化学研究与应用,2014,26(1):1-5.
 [4] 廖玉麟. 中国动物志棘皮动物门海参纲[M]. 北京:科学出版社,1997:154-155.
 [5] 王利民,蔡生业,姚成芳,等. 花刺参粘多糖对大鼠血管平滑肌细胞粘附分子表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(7):565-568.
 [6] 王华亭,魏芳,左希宏,等. 复方花刺参粘多糖对血管损伤后再狭窄家兔血管内膜增殖与凋亡的影响[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(4): 293-296.
 [7] 姚成芳,蔡生业. 复方花刺参制剂抗凝血机制的实验研究[J]. 中国海洋药物,2000,19(1):33-35.
 [8] 张佳佳. 花刺参中两个新的四环三萜化合物[J]. 中草药, 2011, 42(1): 10-14.
 [9] 卢霞,刘爱芹,孙怀玉. 花刺参酸性粘多糖的提取及鉴定[J]. 齐鲁药事,2004,23(2):41-42.
 [10] Kitagawa I, Kobayashi M, Inamoto T, et al. The structures of six antifungal oligoglycosides, stichlorosides A1, A2, B1, B2, C1, and C2, from the sea cucumber *Stichopus chloronotus* (BRANDT) [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(8): 2387-2391.
 [11] 姜健,杨宝灵,郇阳. 海参资源及其生物活性物质的研究[J]. 生物技术通讯,2004,15(5):537-540.

[收稿日期] 2015-03-13 [修回日期] 2016-07-01
 [本文编辑] 顾文华