

- [6] Kontogianni V G, Exarchou V, Troganis A, *et al.* Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy—Comparison with HPLC methods [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 635(2): 188-195.
- [7] Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L, *et al.* Practical HPLC Method Development [M]. New York: Wiley-Interscience, 1997: 325.
- [8] Hancock W S, Chloupek R C, Kirland J J, *et al.* Temperature as a variable in reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of peptide and protein samples [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 686(1): 31-43.
- [9] 彭 旂, 王秀峰, 王志刚, 等. 熊果酸与齐墩果酸高效液相色谱分离条件优化 [J]. *广州化学*, 2006, 31(4): 26-30.

(收稿日期 2010-02-26)

肃清丸的质量标准研究

李广松, 顾宇虹, 康荣明, 刘志惠, 韩 娜, 殷 军

(沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 制定肃清丸质量控制标准。方法 采用薄层色谱法对肃清丸中的金银花、玄参、当归、黄芪、地榆、甘草、连翘进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定肃清丸中绿原酸的量。色谱柱为 Luna C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90), 柱温 30℃, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 328 nm。结果 金银花、玄参、当归、黄芪、地榆、甘草、连翘薄层色谱斑点清晰, 重现性好, 无干扰; 绿原酸在 5.4~54.0 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率为 99.77%, RSD=1.59% (n=6)。结论 所建立的定性和定量方法结果准确、可靠、重现性好, 可用于肃清丸的质量控制。

关键词:肃清丸; 质量控制; 定性分析; 薄层色谱; 绿原酸; 定量分析; 高效液相色谱

中图分类号: R927.11

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)03-0214-06

Study on quality standard for Suqing Pills

LI Guang-song, GU Yu-hong, KANG Rong-ming, LIU Zhi-hui, HAN Na, YIN Jun

(College of Traditional Chinese Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To establish the quality standard for Suqing Pills. **Methods** TLC was applied to identify *Flos Lonicerae*, *Radix Scrophulariae*, *Radix Angelicae Sinensis*, *Radix Astragali*, *Radix Sanguisorbae*, *Radix Glycyrrhizae*, and *Fructus Forsythiae*. HPLC was applied to determine the contents of chlorogenic acid in the prescription, in which Luna C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (10:90) solution, and the flow rate was 1.0 mL/min. Column temperature was at 30 °C and the detection wavelength was set at 328 nm. **Results** The spots on TLC plates were clear without interference in the blank reference. The linearity range of chlorogenic acid was 5.4—54.0 μg/mL, the average recovery of chlorogenic acid was 99.77%, and RSD was 1.59% (n=6). **Conclusion** The established method is accurate, feasible and reproducible. It can be used for the quality standard control of Suqing Pills.

Key words: Suqing Pills; quality control; qualitative analysis; TLC; chlorogenic acid; quantitative analysis; HPLC

肃清丸是由金银花、玄参、当归、黄芪、地榆、甘草、连翘等组成的中药水丸制剂, 由阜新市中医医院制剂室监制, 具有清热解毒、凉血止血、止泻的功效,

用于湿热蕴脾所致泄泻, 症见腹泻、脓血便、腹痛、里急后重、肛门灼热、尿赤、舌红苔黄腻、脉滑数, 溃疡性结肠炎见上述证候者。经多年临床应用证实, 肃

清丸治疗上述病症疗效确切。为了控制肃清丸的质量,笔者采用薄层色谱(TLC)法对肃清丸中的金银花、玄参、当归、黄芪、地榆、甘草、连翘进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定肃清丸中绿原酸的量,制定了质量标准,对保证临床用药的有效性和安全性具有一定的意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪,LC-10ATvp 溶剂输送泵,SPD-10Avp 紫外-可见检测器,均为岛津产品。N-2000 色谱工作站,浙江大学智达有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂生产;水为超纯水,自制;其他试剂均为分析纯。

1.2 试药

绿原酸,购自中国药品生物制品检定所,批号 110753-200413;肃清丸,批号 090301、090401、090501;每 100 丸约 6 g,由阜新市中医医院制剂室监制。

2 方法与结果

2.1 金银花的 TLC 鉴别

取肃清丸 15 g,研细,取粉末 10 g,用 60 mL 甲醇超声 30 min,滤过,取滤液于蒸发皿中挥干,残渣用 5%碳酸氢钠溶液 40 mL 在温热条件下溶解,用醋酸乙酯洗涤 2 次,每次 30 mL,取碱水液,用盐酸调 pH 值至 2~3,用醋酸乙酯提取 2 次,每次 30 mL。合并醋酸乙酯层,蒸干,残渣加 2 mL 甲醇使溶解,作为供试品溶液。取绿原酸对照品适量,加甲醇溶解制得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。另取按处方配比缺金银花的本方阴性对照样品,同法制得阴性样品溶液。按照《中国药典》2010 年版一部 TLC 法试验,吸取上述 3 种溶液各 1 μ L,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 36%醋酸为展开剂^[1],展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。结果供试品色谱中,在与绿原酸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。见图 1。

2.2 玄参的 TLC 鉴别

取肃清丸 10 g,研细,取粉末 5 g,加水饱和正丁醇 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液加正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 50 mL,取正丁醇层,蒸干,残渣加水 20 mL 使溶解,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,柱高 14 cm),以水 50 mL 洗脱,弃去水洗液,再用 50%乙醇 50 mL 洗脱,收集 50%乙

醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液^[2]。再取玄参对照药材 1.0 g,加水饱和正丁醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。取按处方配比缺玄参的阴性对照样品,同法制成阴性对照样品溶液。按照《中国药典》2010 年版一部 TLC 法试验,吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-冰醋酸-水(7:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5%香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。见图 2。

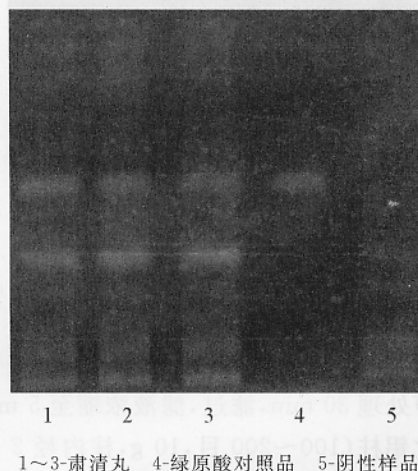


图 1 金银花 TLC 图

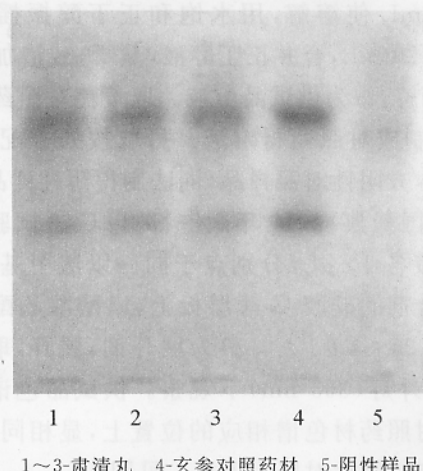


图 2 玄参 TLC 图

2.3 当归的 TLC 鉴别

取肃清丸 10 g,研细,取粉末 5 g,用 50 mL 水加热回流提取 2 h,滤过,滤液用乙醚萃取 3 次,每次 20 mL,合并乙醚层,挥干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取当归对照药材粉碎,取粉末 0.8 g,同法制得对照药材溶液。另取按处方配比缺

当归的阴性对照样品,同法制得阴性样品溶液。照《中国药典》2010 年版一部 TLC 法试验,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,以正己烷-醋酸乙酯(8:1)为展开剂,展开,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。在供试品色谱中,在与当归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。见图 3。

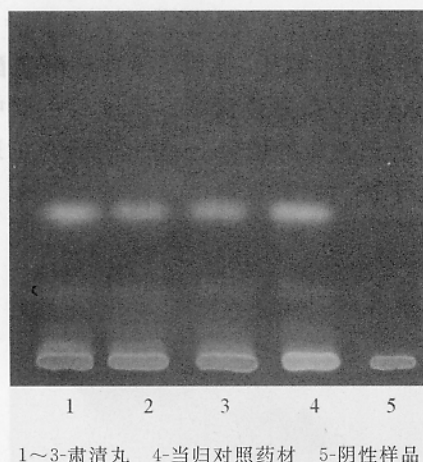


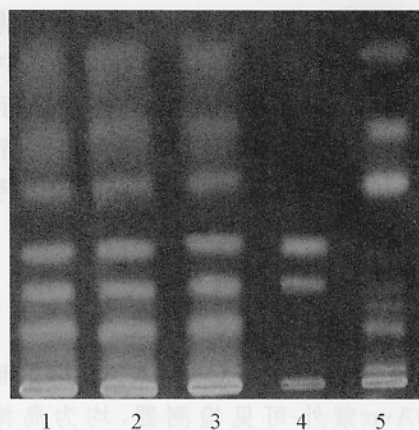
图 3 当归 TLC 图

2.4 黄芪的 TLC 鉴别

取肃清丸 20 g,研细,取粉末 15 g,加甲醇 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至 5 mL,加于中性氧化铝柱(100~200 目,10 g,柱内径 2 cm)上,用 40% 甲醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加水 25 mL 使溶解,用水饱和正丁醇振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取黄芪对照药材 2.5 g,同法制成对照药材溶液。另取按处方配比且缺黄芪的本方阴性对照样品,同法制得阴性样品溶液。按照《中国药典》2010 年版一部 TLC 法试验,吸取上述溶液各 10 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上,以醋酸乙酯-甲醇-水-氨水(20:1:1:0.3)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下观察。供试品色谱中,在与黄芪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。见图 4。

2.5 地榆的 TLC 鉴别

取肃清丸 10 g,研细,取粉末 5 g,用 50 mL 水煮沸 30 min,放冷,离心 10 min,取上清液,用盐酸饱和的乙醚振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并乙醚液,置蒸发皿中挥干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。取地榆对照药材 1 g,粉碎,取粉末 0.5 g,同法制得对照药材溶液。另取除地榆外按本



1~3-肃清丸 4-黄芪对照药材 5-阴性样品

图 4 黄芪 TLC 图

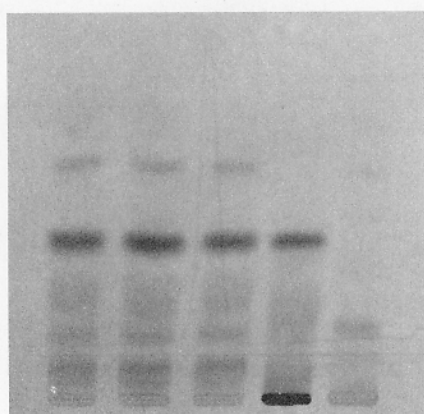
制剂处方配比制成的阴性对照样品,同法制得阴性样品溶液。按照《中国药典》2010 年版一部 TLC 试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯(用水饱和)-醋酸乙酯-甲酸(6:3:1)为展开剂^[2],展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液,日光下检视。供试品色谱中,在与地榆对照药材色谱相应的位置上,显相同的特殊的深蓝色斑点,阴性对照无干扰。见图 5。

2.6 甘草的 TLC 鉴别

取肃清丸 15 g,研成细粉,取粉末 10 g,加乙醚 60 mL,索氏提取器提取 1 h,弃去乙醚液,药渣挥干。药渣加甲醇 50 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水 50 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,收集正丁醇液,用 40 mL 氨试液提取 1 次,取氨水层,用盐酸调节 pH 值至 3~4,加入等体积的醋酸乙酯萃取,收集醋酸乙酯层,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。再取甘草对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。另取缺甘草的按本制剂配比制成的阴性对照样品,同法制得阴性样品溶液。按照《中国药典》2010 年版一部 TLC 法试验,吸取上述 3 种溶液 5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-水(80:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液后置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的荧光斑点。阴性对照无干扰。见图 6。

2.7 连翘的 TLC 鉴别

取肃清丸 15 g,研成细粉,取粉末 10 g,加三氯甲烷 50 mL,索氏提取器提取 1 h,弃去三氯甲烷液,



1~3-肅清丸 4-地榆对照药材 5-阴性样品

图5 地榆的TLC图



1~3-肅清丸 4-甘草对照药材 5-阴性样品

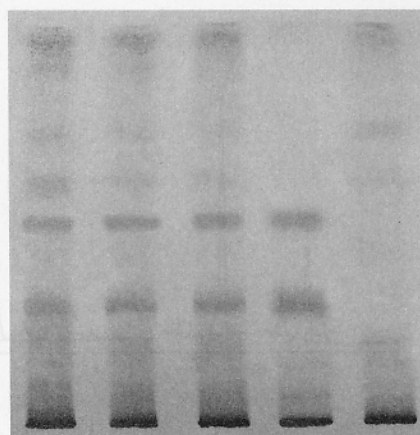
图6 甘草的TLC图

药渣挥干。药渣加甲醇50 mL,加热回流1 h,滤过,滤液浓缩至1 mL,加于聚酰胺柱(14~30目,5 g;内径1.2~1.5 cm,用水50 mL预洗)上,用水50 mL洗脱,弃去水液,再用无水乙醇100 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。再取连翘对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。另取缺连翘的按本制剂配比制得阴性对照样品,同法制得阴性样品溶液。按照《中国药典》2010年版一部TLC法试验,吸取上述3种溶液5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-冰醋酸(80:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,晾干,置105 $^{\circ}$ C加热至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照无干扰。见图7。

2.8 绿原酸的测定

2.8.1 色谱条件

Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流



1~3-肅清丸 4-连翘对照药材 5-阴性样品

图7 连翘的TLC图

动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90)^[1];柱温为30 $^{\circ}$ C;体积流量为1.0 mL/min;检测波长为328 nm。

2.8.2 对照品溶液的制备

取绿原酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成30 μ g/mL的溶液,即得。

2.8.3 供试品溶液的制备

取肅清丸15丸,研成细粉,取500.0 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇20 mL,称定质量,超声30 min,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,滤过,精密量取续滤液1 mL至10 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,即得。

2.8.4 阴性对照溶液的制备

按本制剂处方配比及制法,制成缺金银花的阴性样品,按“2.8.3”项下方法制成阴性样品溶液。

2.8.5 专属性试验

分别精密吸取绿原酸对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μ L,注入HPLC色谱仪,测定。在供试品溶液色谱中,在与绿原酸对照品相应的保留时间有吸收峰,而阴性对照溶液则在相应的保留时间无吸收峰出现,说明阴性对照无干扰。见图8。

2.8.6 线性关系考察

精密称取绿原酸对照品5.4 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。将此储备液逐级稀释至质量浓度分别为5.40、10.80、21.60、32.40、43.20、54.00 μ g/mL的溶液,摇匀,按上述色谱条件分别进样10 μ L,测定峰面积。以绿原酸的质量浓度为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y)进行线性回归,回归方程为

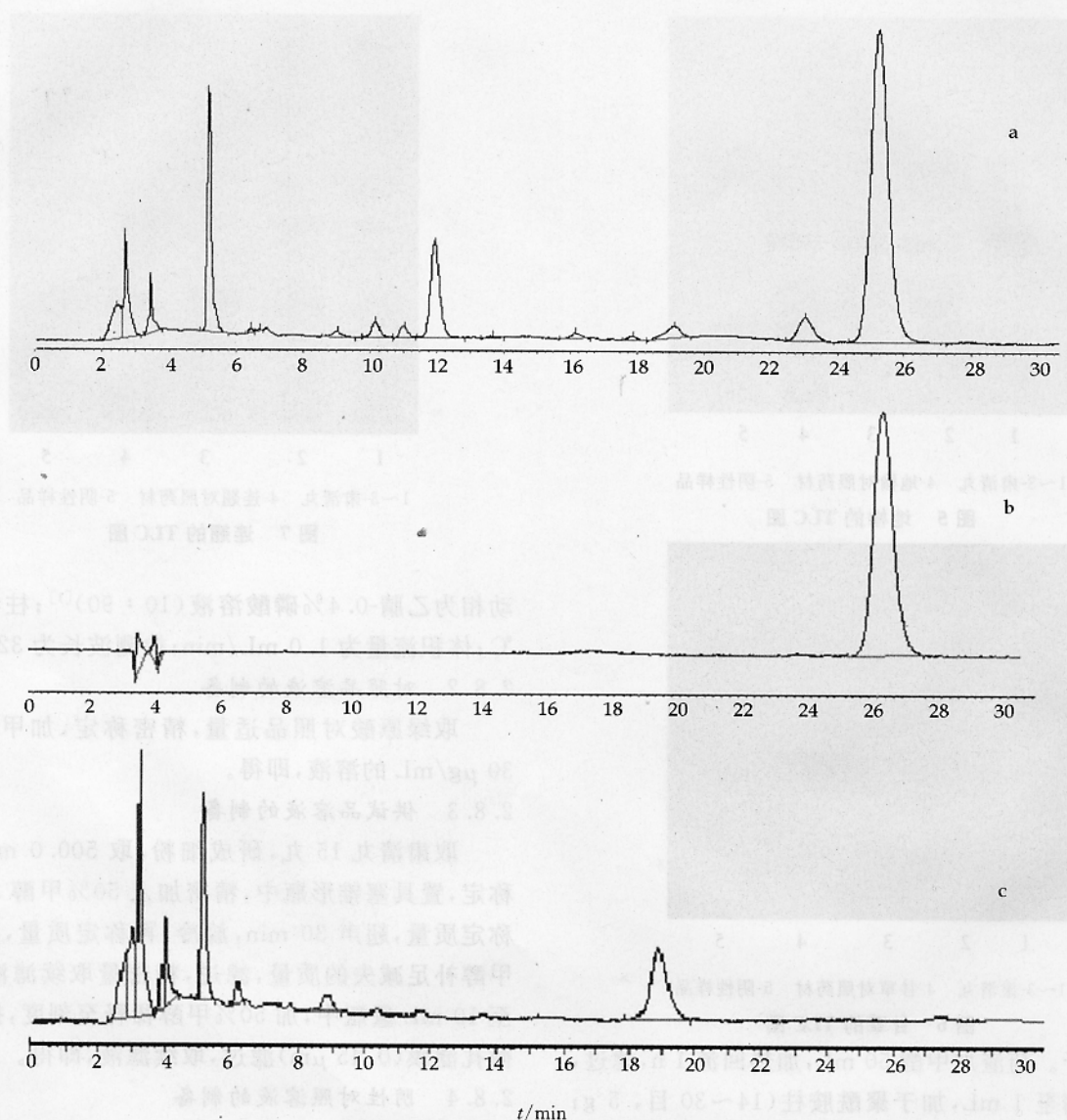


图8 肃清丸供试品(a)、绿原酸对照品(b)、阴性样品(c)的HPLC图

$Y=14\,589X-35\,720$, $r^2=0.999\,4$ 。结果表明,绿原酸在 $5.4\sim54.0\,\mu\text{g/mL}$ 与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.8.7 精密度试验

取肃清丸供试品溶液1份,按“2.8.1”色谱条件,重复进样6次,测定绿原酸峰面积积分值,结果RSD为1.78%。

2.8.8 重现性试验

取肃清丸(批号为090501),平行制备6份供试品溶液,按“2.8.1”项下色谱条件分别测定,结果绿原酸的平均质量分数为 $4.17\,\text{mg/g}$, RSD为1.47%。

2.8.9 稳定性试验

取肃清丸(批号为090501)供试品溶液,分别于

0、2、4、8、16、24 h 进样 $10\,\mu\text{L}$,按“2.8.1”项下色谱条件分别测定绿原酸峰面积积分值,结果RSD为1.11%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8.10 加样回收试验

取绿原酸对照品适量,精密称定6份,置具塞锥形瓶中,再取肃清丸10丸(批号为090501),研成细粉,取约 $250.0\,\text{mg}$,精密称定,分置于上述6个锥形瓶中,精密加入50%甲醇 $20\,\text{mL}$,按“2.8.3”项下方法操作,制备供试品溶液,并按“2.8.1”项下色谱条件分别测定,计算,绿原酸平均回收率为99.77%, RSD为1.59%。

2.8.11 样品测定

采用外标法,按“2.8.1”项下色谱条件测定肃清丸3批样品(批号为090301、090401、090501)中绿

原酸的质量,结果见表1。

表1 肃清丸中绿原酸的测定结果($n=4$)

批号	绿原酸/(mg·g ⁻¹)
090301	4.279 1
090401	3.989 7
090501	4.185 4

2.8.12 绿原酸的限量范围

根据国家药典委员会关于《国家药品标准中药制剂质量标准编写细则》,以量下限来表示绿原酸的限量,规定肃清丸中每克含金银花以绿原酸计不得低于3.32 mg。

3 讨论

3.1 金银花 TLC 条件选择

首先考察了2010年版《中国药典》中金银花药材的提取方法和薄层色谱条件,发现背景杂质多、斑点不清晰、重现性差,于是在本实验中利用绿原酸易溶于热水的性质对供试品溶液采用5%碳酸氢钠溶液在温热条件下溶解,再用酸化萃取的办法对其进行精制。结果表明,经此方法处理后的样品溶液,在薄层色谱上斑点清晰,重现性好。

3.2 玄参 TLC 条件选择

在玄参的定性鉴别中,曾试验了多种提取、精制其所含苷类的方法,但终因本品所含的苷类成分较多而达不到很好的分离效果,因此采用了大孔吸附树脂柱分离。结果在薄层色谱图上,供试品在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的清晰斑点,分离效果好,无干扰。

3.3 连翘 TLC 条件选择

在连翘药材或含有连翘的中成药制剂定性鉴别中,大多数研究都采取甲醇提取的方法。但肃清丸所含的苷类成分较多,只进行甲醇提取一步操作达不到很好的分离效果,因此本研究采用了先用三氯

甲烷索氏提取除去极性小的部分杂质,再利用聚酰胺柱分离方法精制,结果在薄层色谱上,供试品在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的清晰斑点,分离效果好,无干扰。

3.4 定量测定指标的选择

在本实验中,参考2010年版《中国药典》中金银花药材及含有金银花的复方制剂中绿原酸的测定方法。与2005版《中国药典》不同的是,2010版《中国药典》删除了金银花药材测定项下对木犀草苷量的测定要求。故本研究将绿原酸作为定量的指标。

3.5 定量分析中流动相的选择

参考2010年版《中国药典》中金银花药材及含有金银花的复方制剂中绿原酸的定量测定方法,考察了乙腈-0.4%磷酸溶液、甲醇-水-冰醋酸两种流动相。结果表明以乙腈-0.4%磷酸溶液作为流动相,分离度好;进一步考察了其不同比例,结果表明乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90),体积流量为1.0 mL/min,可以使绿原酸与其他成分达到完全分离,峰形良好,故最终确定以乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90)为流动相。

3.6 提取方式和提取溶剂的选择

考察了水超声、50%甲醇超声、pH为4的70%乙醇超声、pH为4的70%乙醇回流提取1 h后甲醇溶解几种方法。结果表明使用50%甲醇超声提取法能达到很好的提取效果且操作简单、易行,故采用50%甲醇超声作为提取方法。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010:205,108,117.
- [2] 薛东娜. 口炎清咀嚼片的质量标准研究[J]. 中国药房, 2008, 19(6): 446-447.

(收稿日期 2010-04-22)

郑 重 声 明

天津中草药杂志社(出版《中草药》、Chinese Herbal Medicines(CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊)未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议,凡是以天津中草药杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动,均严重侵害了天津中草药杂志社的合法权益,天津中草药杂志社将保留对其采取法律行动的权利,特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津中草药杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com”,切勿上当受骗;若发现假冒天津中草药杂志社及所属期刊的情况,请检举揭发。

电话:022-27474913 E-mail:zcy@tiprpress.com

天津中草药杂志社