

祛毒清热颗粒质量控制研究

白雪, 刘素香

天津药物研究院, 天津 300193

摘要: **目的** 建立了祛毒清热颗粒的质量标准。**方法** 采用薄层色谱法对方中的连翘、柴胡、甘草、板蓝根进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法对君药虎杖中的大黄素进行了定量测定。**结果** 薄层分离度好, 专属性强; 大黄素在 0.064~0.512 μg 内与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 99.03%, RSD 值为 0.23% ($n=9$)。**结论** 所建立的方法准确可靠, 灵敏度高, 专属性强, 可有效控制祛毒清热颗粒的质量。

关键词: 祛毒清热颗粒; 大黄素; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2013)02-0123-004

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.02.011

Quality control on Qudu Qingre Granule

BAI Xue, LIU Su-xiang

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To establish the quality standard for Qudu Qingre Granule (QQG). **Methods** TLC method was performed to identify *Forsythiae Fructus*, *Bupleuri Radix*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, and *Isatidis Radix* in QQG and HPLC was used to determine the content of emodin in sovereign medicine—*Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*. **Results** TLC had good resolution and specificity. The emodin showed a good linear relationship within the range of 0.064 — 0.512 μg . The average recovery rate was 99.03% with RSD of 0.23% ($n=9$). **Conclusion** The method is accurate, specific, and could be used for the quality control of QQG. **Key words:** Qudu Qingre Granule; emodin; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography

祛毒清热颗粒由虎杖、连翘、柴胡、麻黄、薄荷、板蓝根、甘草、苦杏仁组方, 方中虎杖苦微涩、微寒, 功能祛风、除湿、解表、攻诸肿毒, 止咽喉疼痛, 为君药。连翘性凉味苦, 功能清热、解毒、散结、消肿, 具有升浮宣散之力, 能透肌解表, 清热祛风。柴胡性味苦凉, 功具和解表里。二者共为臣药。本方具有祛风清热、解毒利咽等功效, 适用于急性上呼吸道感染、风热感冒等。为了更好的控制该制剂的质量, 本实验建立了该制剂的质量标准, 对制剂中连翘、柴胡、甘草、板蓝根进行了薄层定性鉴别研究, 以君药虎杖中主要成分大黄素进行了含量测定研究。

1 仪器与试药

戴安液相色谱仪 (包括 P680 四元液相梯度泵、ASI-100 自动进样器、CO-201 柱温箱、Dionex UVD170U 检测器、Chromeleon 色谱工作站); METTLER TOLEDO AB204-N (万分之一) 分析天平; Sartorius BP211D (十万分之一) 分析天平。硅胶 G 薄层板 (青岛洋化工厂); 大孔树脂柱 ywd-04

(中国沧州远威化工有限公司)。祛毒清热颗粒 (天津药物研究院中药现代研究部制备, 批号 20120101、20120102、20120103)。甘草对照药材 (批号 120904-200813)、柴胡对照药材 (批号 120992-200705)、板蓝根对照药材 (批号 121177-201004)、连翘苷对照品 (批号 110821-200911)、大黄素对照品 (批号 110756-200110) 均购自中国药品生物制品检定所。甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 磷酸、三氯甲烷、盐酸 (分析纯); 去离子水。

2 方法与结果

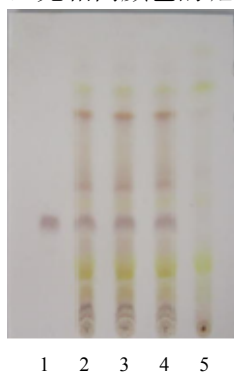
2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 连翘的薄层色谱鉴别 取祛毒清热颗粒样品研细, 称取约 6 g, 加 80%乙醇 50 mL, 超声处理 20 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 40 mL 溶解, 加在大孔树脂柱 YWD-04 (12 cm $\times$ 1.5 cm) 上, 先用水 80 mL 洗脱, 再用 80%乙醇 60 mL 洗脱, 收集 80%乙醇洗脱液, 浓缩至干, 残渣用 25 mL 水饱和正丁醇溶解, 置分液漏斗中, 再用等量氨试液

收稿日期: 2013-01-05

作者简介: 白雪 (1981—), 女, 硕士, 研究方向为中药制剂及其质量控制和天然药物化学。Tel: (022)23006840 E-mail: baix@tjipr.com

洗涤1次,分取正丁醇层,水浴上蒸干,残渣用甲醇1 mL溶解,作为供试品溶液。取不含连翘的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。称取连翘苷对照品适量,用甲醇制成1 mg/mL溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VI B)实验,分别吸取上述3种溶液各3~5 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-冰醋酸(8:1:0.2)为展开剂,展开,取出晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C烘至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,在阴性对照样品色谱中与对照品色谱相应的位置上,无相同颜色的斑点,见图1。



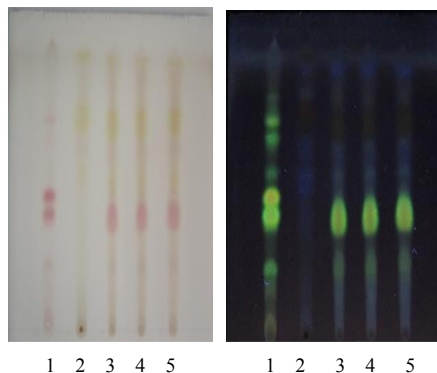
1-连翘苷对照品溶液; 2~4-供试品溶液; 5-缺连翘阴性对照溶液
1-forsythoside reference substance; 2~4-sample solutions; 5-negative sample solution without *Forsythiae Fructus*

图1 连翘的薄层色谱鉴别

Fig. 1 TLC chromatograms of *Forsythiae Fructus*

2.1.2 柴胡的薄层色谱鉴别 取样品研细,称取约6 g,加甲醇50 mL,超声处理20 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 mL溶解,置分液漏斗中,用三氯甲烷提取2次,每次20 mL,三氯甲烷液备用,分取水液,再用水饱和正丁醇提取3次,每次20 mL,合并正丁醇提取液,用40 mL的氨试液洗涤1次,正丁醇提取液蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取不含柴胡的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。取柴胡对照药材粉末2 g,加甲醇20 mL,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VI B)实验,分别吸取上述3种溶液各5 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,以醋酸乙酯-乙醇-水(80:18:6)为展开剂,展开,取出晾干,喷以1%对二甲氨基苯甲醛硫酸乙醇溶液(1 $\rightarrow$ 10),用热风吹至斑点显色清晰。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;置紫外灯(365 nm)下,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧

光斑点;在阴性对照样品色谱中与对照药材色谱相应的位置上,无相同颜色的斑点,见图2。



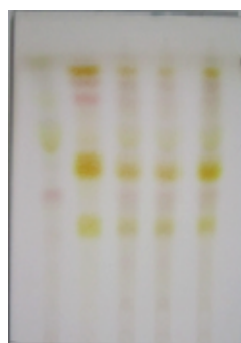
1 柴胡对照药材; 2-缺柴胡阴性对照溶液; 3~5-供试品溶液
1-*Bupleuri Radix* reference medicinal material; 2-negative sample solution without *Bupleuri Radix*; 3~5-sample solutions

图2 柴胡的薄层色谱鉴别

Fig. 2 TLC chromatograms of *Bupleuri Radix*

2.1.3 甘草的薄层色谱鉴别 取本品研细,称取约6 g,加甲醇50 mL,超声处理20 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 mL溶解,置分液漏斗中,用三氯甲烷提取2次,每次20 mL,三氯甲烷液备用,分取水液,再用醋酸乙酯提取3次,每次20 mL,醋酸乙酯提取液蒸干,残渣用甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取不含甘草的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。取甘草对照药材粉末约1 g,加水20 mL,超声处理20 min,放冷,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VI B)实验,分别吸取上述3种溶液各5 μ L,点于同一硅胶薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-醋酸乙酯-甲酸-水(18:6:3:0.4:0.15)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C烘至斑点显色清晰。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,在阴性对照样品色谱中与对照药材色谱相应的位置上,无相同颜色的斑点,见图3。

2.1.4 板蓝根的薄层色谱鉴别 取柴胡、甘草项下的三氯甲烷提取液,合并,用40 mL的氨试液洗涤1次,分取三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取不含板蓝根的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。取板蓝根对照药材粉末5 g,加甲醇40 mL,超声处理30 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VI B)实验,分别吸取上述3种溶液各15 μ L,



1-缺甘草阴性对照溶液; 2-甘草对照药材; 3~5-供试品溶液
1-negative sample solution without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*;
2-*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* reference medicinal material;
3-5-sample solutions

图3 甘草的薄层色谱鉴别

Fig. 3 TLC chromatograms of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

点于同一硅胶G薄层板上,以苯-三氯甲烷-丙酮(6:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,在阴性对照样品色谱中与对照药材色谱相应的位置上,无相同颜色的斑点,见图4。



1-板蓝根对照药材; 2-缺板蓝根阴性对照溶液; 3~5-供试品溶液
1-*Isatidis Radix* reference medicinal material; 2-negative sample solution without *Isatidis Radix*; 3-5-sample solution

图4 板蓝根的薄层色谱鉴别

Fig. 4 TLC chromatograms of *Isatidis Radix*

2.2 大黄素的含量测定

2.2.1 检测波长确定 精密称取大黄素对照品适量加甲醇溶解,制成0.079 mg/mL溶液,以甲醇为空白,在可见-紫外分光光度仪上进行紫外扫描,确定最大吸收波长。结果,大黄素对照品溶液在253 nm处有最大吸收。参照2010年版《中国药典》一部,虎杖中大黄素的HPLC测定波长为254 nm,故确定254 nm作为本品中大黄素HPLC含量测定的检测波长。

2.2.2 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为甲醇-0.1%磷酸(80:

20), 体积流量1.0 mL/min, 检测波长254 nm, 进样量10 μL。

2.2.3 溶液制备 供试品溶液:取本品0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加水30 mL,浓盐酸3 mL溶解,精密加入三氯甲烷50 mL,置水浴上加热回流1 h,冷却,于分液漏斗中分取三氯甲烷液;酸水再加三氯甲烷50 mL回流1 h,冷却,于分液漏斗中分取三氯甲烷液;酸水再加三氯甲烷50 mL回流1 h,冷却,于分液漏斗中分取三氯甲烷液,合并3次三氯甲烷液,减压浓缩三氯甲烷至干,残渣加甲醇使溶解,转移置50 mL量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液即得供试品溶液。

阴性样品制备:取不含虎杖的阴性样品,同供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

对照品制备:称取大黄素对照品适量,用甲醇制成0.025 mg/mL的溶液,作为对照品溶液。

2.2.4 空白干扰实验 分别取供试品溶液、对照品溶液和阴性供试品溶液10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明阴性供试品在大黄素色谱峰位置处无相应峰出现,与其相邻的成分色谱峰达到基线分离,对含量测定结果无影响;对照品、样品和阴性供试品的HPLC图,见图5。

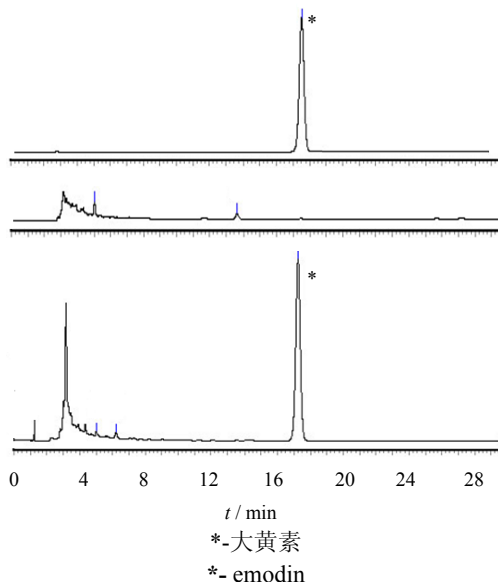


图5 大黄素对照品(A)、缺虎杖阴性对照溶液(B)、祛毒清热颗粒(C) HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of emodin reference substance (A), negative sample solution without *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* (B), and QQG (C)

2.2.5 线性关系考察 精密称取大黄素对照品32 mg于25 mL量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,

摇匀,制成 1.28 mg/mL 对照品溶液。分别精密吸取 0.5、1、2、3、4 mL 置 100 mL 量瓶中,甲醇定容,制得大黄素质量浓度分别为 6.4、12.8、25.6、38.4、51.2 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。取以上大黄素对照品溶液,依次精密吸取 10 μL 按上述色谱条件进样检测分析,以样品中大黄素的峰面积值为纵坐标,大黄素质量为横坐标绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y=5 \times 10^6 X + 36\,084$, $r=0.999\,7$,结果表明,大黄素在 0.064~0.512 μg 内呈良好的线性关系。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品(批号 20120101)约 0.5 g,按供试品溶液制备方法制备,在室温下固定时间 0、2、4、8、12 h 进样测定大黄素峰面积值,结果 RSD 为 0.76%,表明大黄素在 12 h 内稳定。

2.2.7 精密度试验 取同一供试品(批号 20120101)约 0.5 g,按供试品溶液制备方法制备,连续进样 6 次,结果 RSD 为 0.85%,表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 取供试品(批号 20120101)约 0.5 g,6 份,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,并测定含量,结果 RSD 为 0.69%,表明方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取供试品(批号 20120101)约 0.3 g 共 9 份,分成 3 组,分别次加入大黄素对照品约 0.45、0.56、0.67 mg,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件进行分析,进行回收率测定,结果平均回收率为 99.03%,RSD 为 0.23% ($n=9$)。

2.3 样品含量测定 依照供试品溶液制备方法,制备 3 批中试供试品溶液(批号 20120101、20120102、20120103),分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL ,按上述色谱条件测定,计算大黄素含量,结果见表 1。

表 1 祛毒清热颗粒中大黄素的测定结果
Table 1 Determination of emodin in QQG

批号	大黄素/(mg·g ⁻¹)	大黄素含量/(mg·袋 ⁻¹)
20120101	3.50	17.5
20120102	3.58	17.9
20120103	3.51	17.6

3 讨论

在连翘的薄层鉴别中,通过对样品醇提后采用不同极性溶媒萃取、上大孔树脂柱等不同处理方法实验对比研究,确定了供试品溶液的处理方法^[1-3];在柴胡的薄层鉴别中,经过对三氯甲烷-甲醇-水(9:2:0.2)、醋酸乙酯-乙醇-水(8:2:1)展开系

统比较,确定以醋酸乙酯-乙醇-水为展开系统,通过比例的调整最终确定以醋酸乙酯-乙醇-水(80:18:6)为本品柴胡薄层色谱鉴别的展开剂^[4-5];在甘草的薄层鉴别中,对供试品溶液的处理方法采用不同极性溶媒的萃取,及碱化处理后萃取去除干扰物的办法,然后再用盐酸调 pH 值至 2 再用醋酸乙酯萃取的办法,最终确定供试品溶液制备方法^[6-7];在板蓝根的薄层鉴别中,比较了苯-三氯甲烷-醋酸乙酯(8:1:1)、三氯甲烷-石油醚(30~60 $^{\circ}\text{C}$)-甲醇(7:2:0.4)、苯-三氯甲烷-丙酮(5:4:1)、甲苯-三氯甲烷-丙酮(2:2:1)等展开系统,确定苯-三氯甲烷-丙酮(5:4:1)为本品展开溶媒,优化展开系统各溶媒的比例最终确定苯-三氯甲烷-丙酮(6:4:1)为本品鉴别的展开剂^[8-9]。以上各味药经阴性对照试验,阴性对照色谱在与药材相对应位置无其他成分斑点,具有较好的专属性。

在实验中对水解用酸的种类、水解方式及回流次数进行了考察,结果用硫酸水解和用盐酸水解得到的大黄素含量相近,但用硫酸水解碳化严重,因此选择用盐酸水解样品;比较了先水解再回流的提取方法和水解回流一步完成的提取方法,结果表明提取的大黄素含量相近,从操作方便考虑,选择水解回流一步完成的提取方法;对回流提取的次数进行了考察,结果表明回流 3 次能将大黄素提取完全。

本制剂由多味中药材组方,本试验对其中的 4 味药材进行薄层色谱定性鉴别,同时还对虎杖进行含量测定,因此本质量控制方法能很好控制产品质量。

参考文献

- [1] 汤云莉,江启蓉,徐正明. 银花感冒颗粒中主要药味的薄层色谱鉴别[J]. 药物鉴定, 2004, 13(11): 41-42.
- [2] 李怀斌,邵可众,杨安萍. 复方金连片中金银花与连翘的薄层鉴别[J]. 广西中医学院学报, 2002, 5(3): 84-85.
- [3] 王 晖,袁海铭,陈梅荣. 羚羊感冒片薄层鉴别研究[J]. 江西中医药, 2008, 39(302): 45-46.
- [4] 薛 强,李 卿,秦 剑,等. 灵芝颗粒质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(39): 3722-3725.
- [5] 吴立蓉,高卫东. 柴胡配方颗粒的质量标准研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(6): 71-74.
- [6] 陈艳霞,林美清. 绿康颗粒质量标准的研究[J]. 中国药品标准, 2010, 11(3): 182-186.
- [7] 陈志琦. 六味甘草丸质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2944-2945.
- [8] 王钢力,张 铮,聂黎行,等. 三种板蓝根制剂质量标准的研究[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1531-1536.
- [9] 王 瑞,杨海英,杨琪伟,等. 板蓝根的质量标准研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 478-481.