

柴芩清热胶囊质量控制研究

秦霞^{1,2}, 马华¹, 雷俊文¹

1. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001

2. 太原理工大学校医院, 山西 太原 030024

摘要: 目的 建立柴芩清热胶囊的质量控制方法。方法 采用薄层色谱(TLC)法对组方中柴胡、连翘、诃子、大黄进行定性鉴别, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄芩苷。结果 薄层色谱清晰, 分离良好, 阴性无干扰。黄芩苷定量测定的平均回收率为98.39%, RSD为0.81%。结论 该方法简便易行、灵敏准确、专属性强, 可用于柴芩清热胶囊的质量控制。

关键词: 柴芩清热胶囊; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号: R943.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)06-0515-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.008

Quality standard of Chaikin Qingre Capsules

QIN Xia^{1,2}, MA Hua¹, LEI Jun-wen¹

1. School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. College Hospital, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China

Abstract: **Objective** To establish the quality control method of Chaikin Qingre Capsules. **Methods** *Bupleuri Radix*, *Forsythiae Fructus*, *Chebulae Fructus*, and *Rhei Radix et Rhizoma* in the prescription were identified by thin layer chromatography (TLC); The baicalin content was quantitatively determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The spots from the test solutions on the thin layer plate were clear and well separated without the negative interference. The average recovery rate of paeoniflorin was 98.39%, RSD was 0.81%. **Conclusion** This method is simple to operate, sensitive and accurate with strong specificity, which can be used to control the quality of Chaikin Qingre Capsules.

Key words: Chaikin Qingre Capsules; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; quality control

柴芩清热胶囊由柴胡、连翘、诃子、黄芩、大黄、甘草等组成, 具有解肌透邪、清热泻火的功效, 适用于感冒热证。证见恶寒、发热、头痛、身痛、咽痛或鼻塞、流涕等。经过多年临床应用证实, 其具有较好的临床疗效。为有效控制其质量, 确保该制剂的临床疗效, 本试验对组方主要药味建立了定性鉴别方法, 对方中君药黄芩的有效成分黄芩苷建立了高效液相色谱(HPLC)定量测定方法。试验结果显示, 所建方法简便易行、灵敏准确、专属性强, 可用于柴芩清热胶囊的质量控制。

1 仪器和试药

1.1 仪器

Agilent 高效液相色谱仪; Agilent N1100 化学工作站; DAD 二级阵列紫外检测器; 依立特 ODS-BP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; KQ3200DB 型

数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP211D 型电子天平(德国赛多利斯)。

1.2 试药

芩连清热胶囊(自制样品, 共3批, 批号20130301、20130302、20130303); 黄芩苷对照品(批号110715-200514, 质量分数91.7%)、柴胡皂苷a对照品(批号110777-201309, 质量分数92.0%)、柴胡皂苷d对照品(批号110778-200506, 质量分数96.0%)、柴胡对照药材(批号120992-201108)、连翘苷对照品(批号110821-200340, 质量分数95.3%)、连翘对照药材(批号120908-200512)、没食子酸对照品(批号110831-200302, 质量分数89.9%)、诃子对照药材(批号121015-200503)、大黄对照药材(批号121249-201003)均购于中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯; 去离子水。

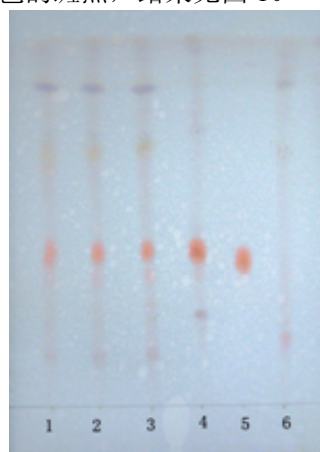
收稿日期: 2014-04-22

作者简介: 秦霞, 女, 山西医科大学公共卫生学院。Tel: 13703588539 E-mail: 846835785@qq.com

2 方法与结果

2.1 薄层色谱(TLC)鉴别

2.1.1 柴胡 取本品内容物 3 g, 加 5% 浓氨甲醇溶液 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用乙醚振摇洗涤 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 弃去, 水层用水饱和的正丁醇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 3 次, 每次 15 mL, 弃去氨液, 分取正丁醇液, 用正丁醇饱和的水洗涤 3 次, 每次 15 mL, 弃去水洗液, 正丁醇液回收溶剂至干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 过中性氧化铝柱(100~200 目, 3 g, 内径为 1.2 cm), 用 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取柴胡对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液; 再取柴胡皂苷 a 对照品、柴胡皂苷 d 对照品, 加甲醇制成 0.5 mg/mL 的混合溶液, 作为对照品溶液。按处方制备缺柴胡的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)配制、并在 10 $^{\circ}$ C 放置后的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液, 60 $^{\circ}$ C 加热至显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 分别显相同颜色的斑点, 结果见图 1。



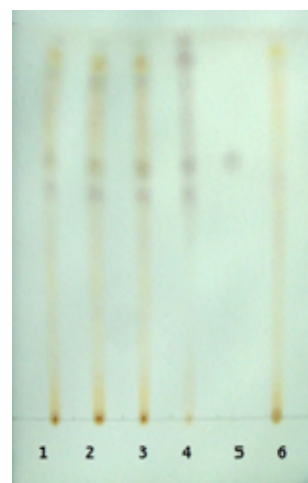
1~3 供试品 4 柴胡对照药材
5 柴胡皂苷 ad 6 柴胡阴性样品
1—3 sample 4 *Bupleuri Radix* reference
5 saikoside ad reference 6 *Bupleuri Radix* negative sample

图 1 柴胡鉴别薄层色谱图

Fig.1 TLC of *Bupleuri Radix*

2.1.2 连翘 取本品内容物 2 g, 加水 30 mL, 加热回流 20 min, 趁热滤过, 滤液用醋酸乙酯振摇提取

3 次, 每次 30 mL, 合并醋酸乙酯液, 蒸干, 残渣加 30% 乙醇 5 mL 使溶解, 加至已处理好的大孔树脂(D101, 内径 1.2 cm, 高 24 cm)上, 用 30% 乙醇溶液 30 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 再以 50 mL 50% 的乙醇溶液洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取连翘对照药材 1 g, 同法制成连翘对照药材溶液; 再取连翘苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液; 按处方制备缺连翘的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述溶液各 5 μ L, 以三氯甲烷-甲醇(5:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以 10% 的硫酸乙醇溶液, 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。



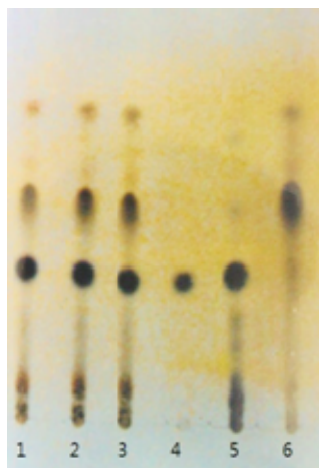
1~3 供试品 4 连翘对照药材
5 连翘苷对照品 6 连翘阴性样品
1—3 sample 4 *Forsythiae Fructus* reference
5 phyllirin reference 6 *Forsythiae Fructus* negative

图 2 连翘鉴别的薄层色谱图

Fig.2 TLC of *Forsythiae Fructus*

2.1.3 诃子 取本品内容物 0.5 g, 加乙醇 20 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 用醋酸乙酯提取 2 次, 每次 10 mL, 合并醋酸乙酯液, 水浴蒸干, 残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取没食子酸对照品, 加醋酸乙酯制成 0.5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。按处方制备缺诃子的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验, 吸取上述溶液各 5

μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲酸 (6:4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液。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, 结果见图 3。



1~3 供试品 4 没食子酸对照品
5 诃子对照药材 6 诃子阴性样品
1—3 sample 4 gallic acid reference 5 *Chebulae Fructus* reference
6 *Chebulae Fructus* negative sample

图 3 诃子鉴别薄层色谱图

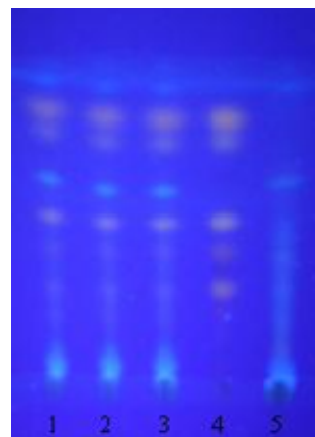
Fig.3 TLC of *Chebulae Fructus*

2.1.4 大黄 取本品内容物 3 g, 加甲醇 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 再加盐酸 2 mL, 加热回流 30 min, 立即冷却, 用乙醚振摇提取 3 次, 每次 10 mL, 合并乙醚液, 挥干, 残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取大黄对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。按处方制备缺大黄的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 版一部附录 VI B) 试验, 吸取供试品溶液及阴性样品溶液 10 μL、对照药材溶液 4 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸 (15:5:1) 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。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的橙黄色荧光斑点, 见图 4。

2.2 HPLC 法测定黄芩苷

2.2.1 色谱条件 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶柱 (250 mm×4.6 mm), 柱温 25℃, 流动相为甲醇-0.2%磷酸 (49:51), 检测波长为 280 nm, 理论板数按黄芩苷峰计算应不低于 2500。

2.2.2 对照品溶液的制备 取黄芩苷对照品适量,



1~3 供试品 4 大黄对照药材 5 大黄阴性样品溶液
1—3 sample 4 *Rhei Radix et Rhizoma* reference 5 *Rhei Radix et Rhizoma* negative sample

图 4 大黄鉴别薄层色谱图

Fig.4 TLC of *Rhei Radix et Rhizoma*

精密称定, 加甲醇制成 40 μg/mL 的溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 参照《中国药典》2010 年版一部含黄芩的中药复方制剂项下含量测定方法试验。柴芩清热胶囊供试品提取方法选择超声处理, 制得的供试品溶液 25 mL, 超声处理 30 min, 并对提取所用溶剂、超声时间进行考察。结果, 确定提取溶剂为 70%乙醇、超声时间为 30 min。

2.2.4 专属性试验 按处方工艺制备缺黄芩药材的阴性样品, 按 2.2.3 项下供试品方法制备, 即得阴性供试品溶液。吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性溶液, 进样, 测定。结果阴性样品不干扰黄芩苷的测定。见图 5。

2.2.5 线性关系考察 精密称取黄芩苷对照品, 加甲醇制成 47.6 μg/mL 的溶液。分别精密吸取 1、2、5、10、15 μL 进样, 依法测定, 以黄芩苷质量为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 计算得回归方程: $Y=2\ 669.9X-2.980\ 6$, $r=1$ 。表明黄芩苷在 0.0436~0.654 μg 与峰面积具有良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 精密量取黄芩苷对照品溶液 (43.6 μg/mL), 按上述色谱条件连续进样 6 次, 每次进样 10 μL 测定, 计算黄芩苷峰面积积分值的 RSD 值为 1.09%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批 (批号 20130303) 中试样品, 按供试品溶液的制备方法制备; 每隔一定时间测定一次, 进样 6 次; 计算黄芩苷峰面积积分值的 RSD 值为 2.15%, 表明供试品在 10 h 内稳定性良好。

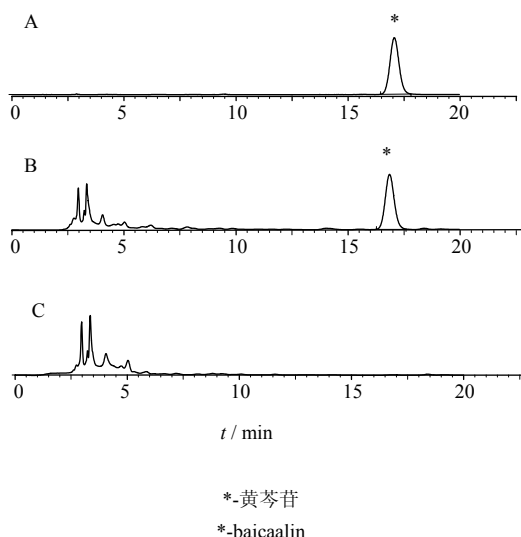


图5 黄芩苷对照品 (A)、供试品 (B) 及阴性样品 (C) 色谱图

Fig. 5 Chromatogram of baicalin (A), sample (B), and negative sample (C)

2.2.8 重复性试验 取同一批 (批号 20130303) 样品, 研细, 混匀; 取约 0.2g, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备, 平行制备 6 份进行含量测定, 每份测 2 次, 取平均值。经计算供试品中黄芩苷平均含量为 30.44 mg/g, RSD 为 1.38 %, 重复性良好。

2.2.9 加样回收试验 分别取已知含量的柴芩清热胶囊样品 6 份约 0.1 g, 精密称定, 分别精密添加一定量的对照品, 按供试品溶液制备方法制备, 测定供试品中黄芩苷峰面积并计算加样回收率。结果表明, 供试品中黄芩苷平均加样回收率为 98.39%, RSD 值为 0.81%。

2.2.10 样品测定 按供试品溶液的制备方法操作, 对柴芩清热胶囊 3 批样品中黄芩苷进行含量测定, 精密吸取供试品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 计算样品中黄芩苷的质量分数, 结果见表 1。

表 1 3 批样品中黄芩苷的含量测定结果

Table 1 Determination of baicalin in three batches of samples

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%
20130301	31.41	1.26
20130302	31.65	0.83
20130303	30.95	2.88

3 讨论

复方中柴胡的薄层鉴别一直是个难点。柴胡主要含有皂苷和挥发油, 此外还有黄酮类、多糖类、甾醇、木脂素、香豆素、色氨酸等^[1]。曾参照《中国药典》2010 年版一部中柴胡药材的鉴别方法^[2]。结果在供试品色谱中, 在对照药材相应的位置上斑点不清晰, 而且底色较重。鉴别效果不理想。通过不断分析原因, 多次试验, 同时参考文献方法^[3-5]。主要是本处方中药味较多, 杂质影响鉴别。柴胡皂苷易溶于水、稀醇, 特别是热水和热醇, 在丁醇和戊醇中溶解度最大, 难溶或不溶于苯, 氯仿等试剂。所以根据柴胡皂苷的性质进行了多步纯化。最后经过反复试验研究, 采用三氯甲烷-甲醇-水 (13:7:2) 配制, 并在 10℃ 以下放置分层的下层溶液为展开剂, 用 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液为显色剂, 采用柴胡对照药材作对照, 供试品样品中柴胡皂苷类成分斑点清晰, 特征性强, 阴性无干扰, 该方法成熟, 重复性好。

参考文献

- [1] 杨柳, 王雪莹, 刘畅, 等. 北柴胡化学成分与药理作用的研究进展[J]. 中医药信息, 2012, 29(3): 143-145.
- [2] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [3] 薛吉利, 丁红, 杜艳, 等. 小柴胡片中柴胡和党参的薄层鉴别[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(11): 1445-1446.
- [4] 刘琳娜, 戚志华, 郭志伟, 等. 小柴胡汤滴丸质量标准研究[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(11): 742-744.
- [5] 张明子, 玄龙洙, 刘汇. 复方熊胆乙肝胶囊中柴胡鉴别的探讨[J]. 药物鉴定, 2011, 20(20): 33-34.