

金翘感冒口服液的质量标准研究

王芳¹, 申屠少婷² (1. 广东省江门市中心医院药剂科, 广东 江门 529030; 2. 浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006)

摘要:目的 研究金翘感冒口服液的质量标准。方法 对金翘感冒口服液中主要药物金银花、连翘、甘草进行薄层色谱鉴别; 采用 RP-HPLC 法测定绿原酸的含量。结果 薄层色谱检出绿原酸、连翘药材、甘草次酸特征斑点, 绿原酸进样量在 0.224 ~ 1.120 μg 线性关系良好, 平均加样回收率 99.81%, RSD 为 0.89%。结论 方法简便易行, 灵敏, 结果准确, 重现性好, 可有效控制金翘感冒口服液的质量。

关键词: 金银花; 连翘; 甘草; 绿原酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R926.23 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)03-0231-04

Study on quality standard of Jinqiao Ganmao Koufuye

作者简介: 王芳(1981-), 女, 副主任药师

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the quality standard of Jinqiao Ganmao Koufuye. **METHODS** TLC was applied to identify Flos Lonicerae Japonicae, Fructus Forsythiae and Radix et Rhizoma Glycyrrhizae in this prescription, and chlorogenic acid content in Kofuye was determined by RP-HPLC. **RESULTS** The characteristic maculae of chlorogenic acid, Fructus Forsythiae and Glycyrrhetinic acid were detected by TLC. The linear rang of chlorogenic acid 0.224 ~ 1.120 μ g, and the average recovery was 99.82%, RSD = 2.3% ($n=5$). **CONCLUSION** The evaluation methods are simple, sensitive, accurate and reproducible, and can be used for the quality control of this medicine.

KEY WORDS: Flos Lonicerae Japonicae; Fructus Forsythiae; Radix et Rhizoma Glycyrrhizae; Weeping forsythia, Licorice root; chlorogenic acid; RP-HPLC

金翘感冒口服液为中药复方制剂,由金银花、连翘、甘草、桑叶等五味药组成。具有清热,解表,利咽,清热化痰的功效,主要用于感冒发热、头痛、咽喉肿痛等症的治疗。为控制本品的质量,我们对该制剂中金银花、连翘、甘草三味药材^[1]进行薄层色谱鉴别,采用高效液相色谱法测定处方君药金银花的有效成分绿原酸(chlorogenic acid)含量。经方法学研究表明,该方法具有简便易行、结果可靠、灵敏度高、重现性好、专属性强等特点,可作为金翘感冒口服液质量控制的标准。

1 仪器与试药

安捷伦 HP-1100 高效液相色谱仪;日本岛津 UV-2401 型可见紫外分光光度仪; Auto Science AS5150A 超声波清洗器;瑞士 METTIER 公司 GB204 电子天平。色谱甲醇;绿原酸对照品(批号 110753-200212, 供含量测定用)、连翘对照药材(批号 120908-200310)、甘草次酸对照品(批号 110723-200310)均为中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 金银花的鉴别 取本品 10mL,用水饱和正丁醇 20mL 分 3 次振摇提取,弃去提取液,水液置水浴上蒸干,加甲醇 1mL 溶解,滤过,滤液作为供试品溶液。另取绿原酸对照品加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液和对照品溶液各 5 μ L,分别点于同一以 5% 醋酸钠溶液和以 0.5% 羧甲基纤维素钠(1:1)制成的硅胶 G 薄层板上,以醋酸丁酯-甲酸-水(5:5:7)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 亚硝酸钠乙醇溶液,日光下检视。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,阴性样品无干扰。

2.1.2 连翘的鉴别 取本品 5mL,加甲醇 10mL,摇匀,滤过,滤液作为供试品溶液。另取连翘对照药材 2g,加水 30mL,置水浴中浸渍 1h,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 25mL,加热回流 1.5h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1mL 使溶解,滤过,滤液作为对照药材溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液 10 μ L、对照药材溶液 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(40:0:1)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,日光下检视^[2]。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的颜色斑点,阴性样品无干扰。

2.1.3 甘草的鉴别 取本品 10mL,水浴蒸干,加盐酸 1mL 与三氯甲烷 20mL,加热回流 1h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2mL 使溶解,作为供试品溶液。另取甘草次酸对照品,加无水乙醇制成每 1mL 含 1mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液与对照品溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯-醋酸(10:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 25% 磷钼酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,日光下检视。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,阴性无干扰。



图1 金银花薄层色谱图
Fig 1 TLC diagram of Flos Lonicerae Japonicae
1. Standard solution of chlorogenic acid; 2. Tested solution; 3. Blank solution

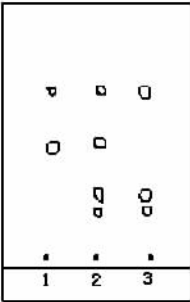


图2 连翘薄层色谱图
Fig 2 TLC diagram of Fructus Forsythiae
1. Standard solution of Fructus Forsythiae; 2. Tested solution; 3. Blank solution

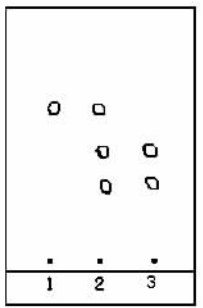


图3 甘草薄层色谱图

Fig 3 TLC diagram of Radix et Rhizoma Glycyrrhizae

1. Standard solution of glycyrrhetic acid; 2. Tested solution; 3. Blank solution

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Symmetry C18 (3.9 × 150mm, 5μm), Phenomenex ODS 预柱。流动相: 甲醇-11% 冰醋酸溶液 (10:90); 检测波长: 325nm; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 20℃; 灵敏度: 0.5AUFS。理论塔板数按绿原酸峰计算不低于 2000。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取本品 1mL, 置 100mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45μm) 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2.3 对照品液的制备 精密称取绿原酸对照品适量, 加水超声溶解制成每 1mL 约含 0.1mg 的溶液, 即得。

2.2.4 阴性对照供试溶液的制备 取除金银花外的其余四味药按处方比例及成药制法制成阴性对照品, 样品处理方法同“2.2.2”项。

2.2.5 线性范围考察 精密量取绿原酸对照品溶液 (0.110 mg/mL) 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0μL 进样, 按色谱条件测定。以峰面积值 A 为纵坐标, 进样量 C (μg) 为横坐标, 得回归方程: $A = 259\,974C + 31\,943$, $r = 0.999\,9$ 。线性范围为: 0.22 ~ 1.10μg。

2.2.6 精密度试验 精密吸取绿原酸对照品溶液 (0.110 mg/mL), 重复进样 6 次, 每次进样 5μL。峰面积值分别为 1 313 649, 1 312 897, 1 323 756, 1 323 575, 1 315 963, 1 314 782; 平均值 1 317 437, $RSD = 0.37\%$ 。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品 6 份, 分别按含量测定项下的方法进行测定, 计算含量, 测得样品含量分别为 0.530, 0.522, 0.525, 0.516, 0.520, 0.526mg/mL; 平均含量为 0.523mg/mL, $RSD = 0.94\%$ 。

2.2.8 中间精密度试验 取同一批样品, 由 3 位试验人员, 每 2h 进样分析一次, 按含量测定项下的方法进行测定, 结果样品峰面积值分别为 1 294 774, 1 309 797, 1 281 462, 1 324 655, 1 354 505, 1 305 743; 平均值 1 311 823, $RSD = 1.94\%$ 。

2.2.9 空白干扰试验 照供试品溶液的制备方法制备阴性供试品溶液, 按色谱条件测定, 在原绿原酸对照品出峰位置无吸收峰, 表明口服液中其他药材成分及辅料不干扰绿原酸的测定。

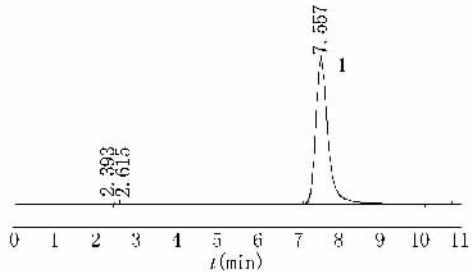


图4 绿原酸对照品 HPLC 图

Fig 4 Chromatogram of chlorogenic acid

1. 绿原酸

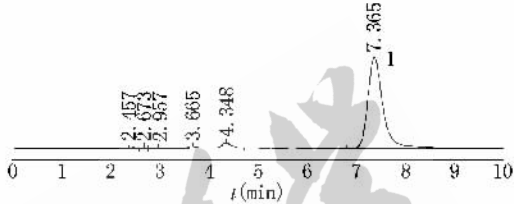


图5 金银花药材 HPLC 图

Fig 5 Chromatogram of Flos Lonicerae Japonicae

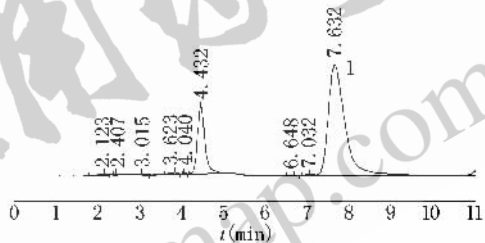


图6 金翘感冒口服液样品 HPLC 图

Fig 6 Chromatogram of sample

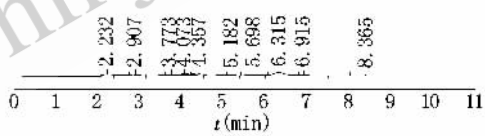


图7 缺金银花阴性样品 HPLC 图

Fig 7 Chromatogram of blank sample

2.2.10 准确度试验 精密称取已知含量的样品溶液, 加入绿原酸对照品一定量, 照含量测定项下操作, 结果见表 1。

表 1 加样回收实验结果

Tab 1 Recovery of chlorogenic acid

No	Samples (mL)	Amount of Chlorogenic acid in samples (mg)	Added (mg)	Founded (mg)	Recovery (%)	Average (%)	RSD (%)
1	0.5	2.596	2.597	5.1567	98.57		
2	0.5	2.596	2.597	5.2078	100.54		
3	0.5	2.596	2.597	5.2189	100.97	99.81	0.89
4	0.5	2.596	2.597	5.1927	99.96		
5	0.5	2.596	2.597	5.1695	99.06		
6	0.5	2.596	2.597	5.1877	99.77		

平均回收率为 99.81%, $RSD = 0.89\%$ 符合含量测定的要求。

2.2.11 稳定性试验 取同一批号样品, 精密称定, 余同供

试品制备方法制备含量测定样品,隔 2h 进样测定,每次 5 μ L,每份测定 3 次,取平均值,比较峰面积。结果表明,样品制备后 8h 内测定,结果均稳定,RSD 为 1.14%。

2.2.12 样品测定 用上述方法对 3 批中试样品进行含量测定,试验结果表明:三批含量的均值为 5.043mg/mL,考虑到药材的来源、炮制加工、制剂生产及贮存等因素,含量限度在三批均值的基础上下降 20%,故暂定本品含量限度为含金银花以绿原酸($C_{16}H_{18}O_9$)计,不得少于 40mg/支。

3 小结与讨论

3.1 金银花为处方中君药,其有效成分主要有挥发油、黄酮类、三萜类、有机酸、无机元素及其它成份^[3]。绿原酸类化合物是金银花的主要有效成份,包括绿原酸和异绿原酸,其它有机酸还有棕榈酸和肉豆蔻酸。临床证明,本品具有广谱抗菌作用,对金黄色葡萄杆菌、痢疾杆菌有较强的抑制作用,对钩端螺旋体、流感病毒已致病霉菌等多种病原微生物亦有抑制作用;有明显抗炎及解热作用;另具有一定降低胆固醇作用;抑菌有效成分为绿原酸,分子式为($C_{16}H_{18}O_9$)。本实验采用高效液相色谱法测定金银花药材中的主要有效成分绿原酸,有效的控制了制剂的质量。

3.2 文中研究的关键在于流动相的选择。曾经试用过文献报道的甲醇-0.4% 磷酸溶液(20:80),乙腈-0.4% 磷酸溶液(13:87),均不能使样品中绿原酸和其他干扰组分峰完全分

离。经多次试验,以甲醇、水组合成流动相,水中含 11% 的冰醋酸对样品的分离较好。当两者比例为 10:90 时样品中绿原酸不仅与其他干扰峰完全分离,而且保留时间适中($t_R = 7.626\text{min}$),峰形对称且尖锐,故选择甲醇-11% 冰醋酸溶液(10:90)为含量测定的流动相。

参考文献

- [1] LI H B. TLC identification of honey suckle flower and weeping forsythia capsule in Fufang JinLian Pian [J]. Guangxi Traditional Chinese Medical University J (广西中医学院学报), 2002, 5 (3):84-85.
- [2] XIE P SH. TLC color chromatograms of Chinese traditional medicine of pharmacopoeia of people's republic of China (中华人民共和国药典中药薄层色谱彩色图集) [M]. Guangdong :Tech. publishing house of Guangdong (广东科技出版社), 1993: Pharmacopoeia committee of Ministry of health people's republic of china (中华人民共和国卫生部药典委员会).
- [3] Chinese traditional and herbal drugs information key station of national medical authority (国家医药管理局中草药情报中心站). Active components of vegetable (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: The People's health republishing house, 1986:303.

收稿日期:2005-08-25