

清热养胃合剂的质量标准

罗浩铭¹, 张晓荧², 董芳³, 陈英红^{3*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林大学第一医院, 长春 130021;
3. 吉林省中医药科学院, 长春 130012)

[摘要] 目的:建立清热养胃合剂质量控制方法。方法:采用薄层色谱法对制剂中牛至、金莲花进行鉴别,其中牛至的薄层色谱鉴别采用咖啡酸为对照品,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(10:7.5:1)为展开剂;金莲花的薄层色谱鉴别采用芦丁为对照品和金莲花对照药材,以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:0.8)为展开剂。采用紫外分光光度法测定总黄酮的含量,高效液相色谱法测定芦丁的含量。结果:清热养胃合剂中的牛至、金莲花的薄层色谱具有鉴别特征、斑点清晰,与相应对照品均呈相同的鉴别反应;总黄酮含量测定中芦丁在0.134~0.670 mg线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率98.42%,RSD 1.2%。含量测定中芦丁在0.400~4.000 μg 有良好的线性关系($r=0.9999$),平均加样回收率为98.91%,RSD 1.2%。结论:鉴别方法专属性强、灵敏度高;定量方法简便快速、结果准确且重复性好,可用于控制清热养胃合剂的质量。

[关键词] 清热养胃合剂;牛至;金莲花;总黄酮;芦丁

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0072-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016030072

Quality Standards of Qingre Yangwei Mixture

LUO Hao-ming¹, ZHANG Xiao-ying², DONG Fang³, CHEN Ying-hong^{3*}

(1. Changchun University of Chinese Traditional Medicine (TCM), Changchun 130117, China;
2. The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China;
3. Jilin Academy of TCM and Material Medical Sciences, Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for quality control of Qingre Yangwei mixture. **Method:** The ingredients of *Origanum Herba* and *Trollii altaici* Flos were identified by thin layer chromatography (TLC). Methylbenzene-ethyl acetate ethyl ethanoate-formic acid (10:7.5:1) was used as developing solvent in the TLC identification of *Origanum Herba*, with caffeic acid as the control product; ethyl acetate ethyl ethanoate-formic acid-water (8:1:0.8) was used as developing solvent in the TLC identification of *T. altaici* Flos, with rutin and crude *T. altaici* Flos as the control products. The content of total flavonoids was determined by ultraviolet spectroscopy, and the content of rutin was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Result:** The TLC method of *Origanum Herba* and *T. altaici* Flos from Qingre Yangwei mixture had identification characteristics with clear spots, and showed the same identifying reaction with the control products. In the determination of total flavonoids content, the good linear range was 0.134-0.670 mg for rutin ($r=0.9999$), with an average recovery rate of 98.42% and RSD of 1.2%. In the contents determination, the good linear range was 0.400-4.000 μg for rutin ($r=0.9999$), with an average recovery rate of 98.91% and RSD of 1.2%. **Conclusion:** This identification method is selective and sensitive. The quantitative method is simple, rapid, accurate and reproducible, and can be used to control the quality of Qingre Yangwei mixture.

[Key words] Qingre Yangwei mixture; *Origanum Herba*; *Trollii altaici* Flos; total flavonoids; rutin

[收稿日期] 20150118(002)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20115092)

[第一作者] 罗浩铭,讲师,从事中药天然药物新药研究与开发,Tel:0431-86058667,E-mail:zhongyanjrjz@sina.com

[通讯作者] *陈英红,Tel:0431-86058667,E-mail:zhongyancyh@aliyun.com.cn

清热养胃合剂由金莲花、新塔花、牛至 3 味药材制备而成。具有平衡人体恒寒恒热,清胃热的功效,用于治疗咽喉痛、口腔溃疡、糜烂、消化不良、便秘等。本方为哈萨克民族名老中医的经验方,处方中的新塔花和牛至均产于新疆,为民间常用中药,临床应用多年,疗效显著。现已开发为院内制剂,并对其进行了质量标准的研究与建立,保证了产品的疗效及稳定性,本实验对方中牛至、金莲花采用薄层色谱法进行了定性鉴别,鉴别方法专属性强、灵敏度高。处方中君药金莲花具有清热解毒、抗菌消炎的功效,用于治疗扁桃体炎、咽炎、上呼吸道感染^[1]。其主要成分为黄酮类化合物,属于 5-羟基黄酮类,与芦丁的母核相类似,故采用紫外分光光度法以芦丁为对照品测定其总黄酮含量,采用高效液相色谱法对金莲花主要成分芦丁的含量进行了测定,可有效控制清热养胃合剂的质量。

1 材料

752 型紫外光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),AB204-N 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),WFH-203B 型三用紫外分析仪(上海精密科学仪器有限公司),LC-2010 型高效液相色谱仪(CLASS-VP 工作站,日本岛津)。

芦丁(批号 111752-200601),咖啡酸(批号 110885-200102)对照品购于中国食品药品检定研究院。10 批清热养胃合剂由吉林大学第一医院制剂室制备(批号 20131204, 2131205, 20131206, 20140101, 20140102, 20140201, 20140202, 20140203, 20140204, 20140205),阴性对照样品(按处方药味除去被测药材,其余药味按成药的生产工艺制备的模拟样品),硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工厂分厂,规格 10 cm × 10 cm,厚度 0.20 ~ 0.25 mm),聚酰胺薄膜板(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂出品,规格 10 cm × 10 cm),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 牛至^[2] 取本品 10 mL,加 0.5% 氢氧化钠 40 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液用稀盐酸调 pH 3~4,加乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 30 mL,合并乙酸乙酯液,挥干,残渣加甲醇 5 mL 溶解,作为供试品溶液。取缺牛至阴性对照样品 10 mL,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。另取咖啡酸对照品,加甲醇制成 0.5 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试

验,吸取上述 3 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(10:7.5:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性对照溶液在相应的位置上无斑点。

2.1.2 金莲花 取本品 10 mL,加水稀释一倍,加乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯液,挥干,残渣加乙醇 5 mL 溶解,作为供试品溶液。取缺金莲花阴性对照样品 10 mL,同供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。另取金莲花对照药材 1 g,加水 100 mL 煎煮 30 min,滤过,滤液浓缩至 20 mL,加乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯液,挥干,残渣加乙醇 5 mL 溶解,作为对照药材溶液。另取芦丁对照品,加乙醇制成 0.2 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB)试验,吸取上述 4 种溶液各 5 μL,分别点于同一聚酰胺薄膜板上,以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:0.8)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铝乙醇试液。待乙醇挥干后,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性对照溶液在相应的位置上无斑点。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 120 °C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加 60% 乙醇适量,超声使溶解,加 60% 乙醇至刻度,摇匀,即得 0.1 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 1 mL,加 60% 乙醇稀释至 50 mL,作为供试品溶液。

2.2.3 标准曲线的制备与线性范围的确定 精密量取芦丁对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,用 60% 乙醇补足至 6 mL,加 10% AlCl₃ 1 mL,摇匀,加水至刻度,摇匀,在 272 nm 波长处测定吸收度,以芦丁含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 1.5X + 0.0032$ ($r = 0.9999$),结果表明芦丁在 0.134 ~ 0.670 mg 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取供试品溶液(批号 20131205) 2.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,用 60% 乙醇补足至 6 mL,加 10% AlCl₃ 1 mL,摇匀,加水至刻度,摇匀,在 272 nm 波长处重复测定吸光度 6 次,结果 RSD 0.3%,表明仪器良好精密性。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(批号

20131205) 2.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 用 60% 乙醇补足至 6 mL, 加 10% AlCl₃ 1 mL, 摇匀, 加水至刻度, 摇匀, 分别在 0, 10, 20, 30, 40, 60 min, 在 272 nm 测定吸光度, 结果 RSD 1.5%, 表明供试品溶液显色后在 60 min 内较为稳定。

2.2.6 重复性试验 精密吸取同一批号的样品(批号 20131205) 6 份, 每份 2.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 用 60% 乙醇补足至 6 mL, 加 10% AlCl₃ 1 mL, 摇匀, 加水至刻度, 摇匀, 在 272 nm 波长处测定吸光度, 代入标准曲线计算样品中总黄酮含量。结果样品总黄酮平均质量分数为 7.97 g·L⁻¹, RSD 1.8%。结果该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 50 mg, 加 60% 乙醇 50 mL 溶解。精密吸取 8 mL 加入到样品(批号 20131205, 总黄酮质量分数 7.97 g·L⁻¹) 1 mL 中, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定总黄酮含量, 结果芦丁平均回收率为 98.42%, RSD 1.2%, 结果表明本方法准确可靠。见表 1。

表 1 总黄酮加样回收率试验

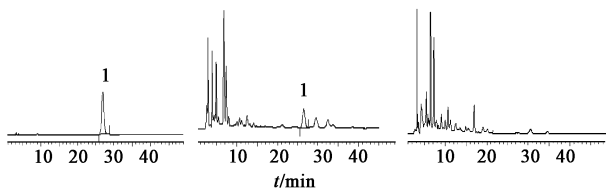
Table 1 Results of recovery test of total flavonoids

测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
7.95	99.38		
8.01	100.13		
7.90	98.75	98.42	1.2
7.83	97.88		
7.80	97.50		
7.75	96.88		

注: 样品中量均为 7.97 mg, 加入量均为 8.00 mg。

2.3 芦丁含量测定

2.3.1 色谱条件及系统适用性 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 乙酸(15:85), 流速 0.9 mL·min⁻¹, 检测波长 348 nm, 柱温 30 °C。进样量 10 μL。理论塔板数按芦丁峰计算, 不得低于 6 000。色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 缺芦丁阴性样品; 1. 芦丁

图 1 清热养胃合剂中芦丁 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Qingre Yangwei mixture

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品

适量加 60% 乙醇制成含芦丁 0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取本品 1 mL, 加 60% 乙醇稀释定容至 10 mL 量瓶中, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 即得。

2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取芦丁对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 以峰面积和进样量进行线性回归。回归方程、相关系数以及线性范围分别为 $Y = 2.250 \times 10^6 X - 71.52$ ($r = 0.9999$), 线性范围 0.400 ~ 4.000 μg, 结果表明芦丁对照品在上述范围内线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液 10 μL, 进行重复进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 结果芦丁对照品色谱峰的 RSD 为 0.7%。结果表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取 2.3.3 项下的供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 10 μL, 测定各峰面积, 计算芦丁含量, 其 RSD 为 0.9%。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 取同一批号(批号 20131205) 的样品, 按 2.3.3 项下的方法, 精密吸取 6 份, 制备供试品溶液, 平行测定, 结果芦丁平均质量分数为 1.52 g·L⁻¹, RSD 1.2%。表明此方法的重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品 6 份, 每份 0.5 mL, 分别加入 2.3.2 对照品溶液 4 mL, 按 2.3.3 项下的方法制备供试液, 精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 结果见表 2。

表 2 芦丁加样回收率试验

Table 2 Results of recovery test of rutin

测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1.546 7	98.34		
1.549 1	98.64		
1.539 5	97.44	98.91	1.2
1.546 9	98.36		
1.559 0	99.88		
1.566 3	100.79		

注: 样品中量均为 0.760 0 mg, 加入量均为 0.800 0。

2.4 样品含量测定 按含量测定方法, 对 10 批样品进行测定, 结果见表 3。

表 3 清热养胃合剂样品中总黄酮及芦丁的含量测定

批号	总黄酮	芦丁
20131204	7.86	1.50
20131205	7.97	1.52
20131206	8.21	1.55
20140101	7.90	1.52
20140102	8.05	1.50
20140201	8.10	1.54
20140202	8.15	1.56
20140203	7.95	1.52
20140204	7.98	1.50
20140205	8.08	1.53

3 讨论

3.1 新塔花鉴别考察 处方中新塔花药材主要成分为胡薄荷酮,实验中采用胡薄荷酮对照品和新塔花药材对样品进行了鉴别,采用硅胶 G 薄层板,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(37:3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛-硫酸乙醇溶液。结果供试品色谱中,在与对照药材及对照品色谱相应的位置上,没有相同颜色的斑点,分析原因,胡薄荷酮为挥发油类,由于样品提取方法为水煎煮,故无法检出胡薄荷酮。

3.2 总黄酮含量测定方法考察 处方中君药金莲花具有清热解毒、抗菌消炎的功效,用于治疗扁桃腺炎、咽炎、上呼吸道感染^[1]。其主要成分为黄酮类化合物,属于 5-羟基黄酮类,与芦丁的母核相类似,故以芦丁为对照品测定其总黄酮含量。中药中总黄酮的含量测定有 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 法^[3],差示分光光度法^[4], $\text{AlCl}_3\text{-NaAc-HAc}$ 法^[5] 和 AlCl_3 显色后比色法^[6] 等 4 种方法。本实验对样品采用上述 4 种方法分别测定了总黄酮的含量。结果 4 种方法测定结果分别为 25.20, 6.39, 7.44, 8.59 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。总黄酮测定

以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法常用,郭亚健等曾对这种方法的专属性进行了讨论,结果发现某些黄酮类物质(黄芩苷、黄芩素等)在 500 nm 处无最大吸收或吸收很弱,而某些非黄酮物质(绿原酸、咖啡酸)在 500 nm 波长处有最大吸收或较强吸收,而该处方中牛至药材恰恰含有咖啡酸,干扰了测定,使测定结果偏高。因此,使用该方法测定的结果专属性不强,有局限性,测定结果不准确。张进祥等^[6]采用 AlCl_3 显色后比色法对金莲花中总黄酮含量测定进行了详尽的考察,给本品含量测定提供了强有力的依据。研究表明,在 403~414 nm 供试品和对照品没有相接近的最大吸收峰,在此期间选择测定波长,使不同仪器之间产生较大的测量误差,直接导致测定结果偏低。而采用 AlCl_3 显色后的对照品和样品在 272 nm 左右均有最大吸收,且无干扰,因此最终选择 AlCl_3 显色后比色法测定样品中总黄酮含量。

[参考文献]

- [1] 宋冬梅,孙启时.阿尔泰金莲花化学成分的研究(1)[J].中国药物化学杂志,2004,14(4):233-235.
- [2] 吴和珍,方颖,刘焱文,等.牛至的质量分析研究[J].中国中医药信息杂志,2002,9(1):40-41.
- [3] 郭亚健,范莉,王晓强,等.关于 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定总黄酮方法的探讨[J].药物分析杂志,2002,22(2):97-99.
- [4] 康旭珍.差示分光光度法测定桑叶总黄酮含量[J].光谱实验室,2005,22(3):506-508.
- [5] 张丽,周亚球.不同产地贯叶金丝桃全草中总黄酮的含量测定[J].安徽中医学院学报,2007,26(5):44-45.
- [6] 张进祥,段吉平.紫外分光光度法测定金莲花中总黄酮的含量[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(10):36-37.

[责任编辑 顾雪竹]