

银翘伤风胶囊质量标准的研究

张晓燕, 杨秀平, 王建明*

(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 确定银翘伤风胶囊质量标准。方法: 通过薄层鉴别方法(TLC)对方剂中金银花、牛黄、芦根、甘草进行定性鉴别。运用高效液相色谱法(HPLC)对连翘中的连翘苷进行含量测定。结果: 薄层色谱斑点清晰, 阴性对照无干扰。含量测定连翘苷量在 0.199~0.991 μg 之间有良好的线性关系, 相关系数 $r = 0.9999$ 。回收率为 99.7%, $\text{RSD} = 0.48\%$ ($n = 5$)。结论: 所建立的方法可靠, 能准确地进行定性、定量检测, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 银翘伤风胶囊; 连翘苷; 薄层色谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)02-0006-04

Study on Quality Standards for Yinqiaoshangfeng Capsules

ZHANG Xiao-yan, YANG Xiu-ping, WANG Jian-ming*

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[收稿日期] 2006-07-03

[通讯作者] * 王建明, Tel&fax: (0451) 82196262; E-mail: wangjianming@hljucm.net

[**Abstract**] **Objective:** To establish the quality standard for Yinqiaoshangfeng capsules. **Methods:** Flos Lonicerae, Calculus Bovis, Rhizoma Phragmitis and Radix Glycyrrhizae were identified by TLC. Forsythin was determined by an HPLC method. **Results:** TLC spots clear and specific. A good linear relationship between peak area and concentration of forsythin was found at the range of 0.199~ 0.991 μg with a correlation coefficient of $r = 0.9999$. The average recovery of forsythin was 99.7% and RSD was 0.48% ($n = 5$). **Conclusion:** The method is reliable, accurate and specific. It can be used for the quality control of Yinqiaoshangfeng Capsules.

[**Key words**] Yinqiaoshangfeng Capsules; Forsythin; TLC; HPLC

银翘伤风胶囊系原国标药品,由金银花、连翘、牛蒡子、桔梗、芦根、薄荷、淡豆豉、甘草、淡竹叶、荆芥、牛黄共 11 味中药制成。具有辛凉解表,清凉解毒作用。用于外感风热,温病初起,发热恶寒,高热口渴,头痛目赤,咽喉肿痛。其原标准仅对方中金银花、牛黄进行定性鉴别,无定量指标。为了能有效控制制剂的质量,本文采用薄层层析法对该制剂中金银花、牛黄、芦根、甘草 4 味药材进行定性鉴别;并用高效液相色谱法测定连翘有效成分连翘苷含量^[1,2]。结果准确,重复性好,可用于该制剂的质量控制。

1 仪器和试剂

Waters 600E-2487 型高效液相色谱仪; Millennium³² 色谱工作站数据处理系统, (均为美国产); 电子天平(METTLER)。连翘苷对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号: 110821-200305; 金银花对照药材批号: 1060-200002; 牛黄对照药材批号: 121197-200101; 芦根对照药材批号: 1107-200001; 甘草对照药材批号: 0904-200007。银翘伤风胶囊为黑龙江省葵花药业生产(批号为: 20040601、20040602、20040603), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 金银花 TLC 鉴别 取本品内容物 1 g, 加甲醇 3 mL, 置水浴上温热 30 min, 取上清液, 作为供试品溶液。另取金银花对照药材 0.5 g, 加甲醇 3 mL, 置水浴上温热 30 min, 滤过至 2 mL, 作为对照药材溶液。按其质量标准中处方比例制备不含金银花的阴性样品, 照上述供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以醋酸丁酯-甲酸-水(7: 2.5: 2.5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。供试品色谱中, 在与金银花对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。阴性对照品

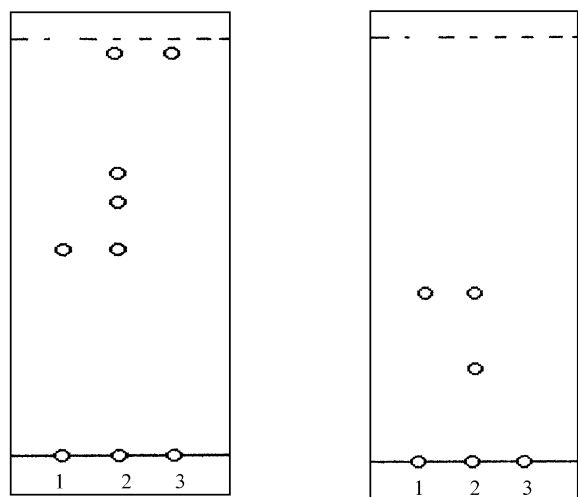
无此斑点。见图 1。

2.2 牛黄 TLC 鉴别 取 2.1 项下的供试品溶液, 取胆酸、猪去氧胆酸对照品, 分别加乙醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按其质量标准中处方比例制备不含牛黄的阴性样品, 照上述供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以异辛烷-乙酸乙酯-冰醋酸(15: 7: 5) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与胆酸、猪去氧胆酸对照品色谱相应的位置上, 日光下显相同的暗黄色斑点, 紫外光灯(365 nm) 下, 显相同的黄绿色荧光。阴性对照品无此斑点。见图 1。

2.3 芦根 TLC 鉴别 取本品内容物 2 g, 加三氯甲烷 10 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取芦根对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。按其质量标准中处方比例制备不含芦根的阴性样品, 照上述供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各 10 μL , 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(30~ 60 $^{\circ}\text{C}$)-醋酸乙酯-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, 显相同黄绿色的荧光斑点。阴性对照品无此斑点。见图 1。

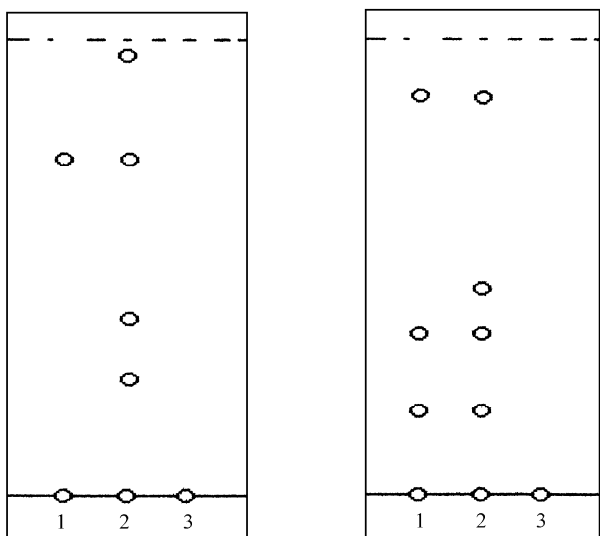
2.4 甘草 TLC 鉴别 取本品内容物 2 g, 加乙醚 40 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 药渣加甲醇 30 mL, 加热回流 1 h 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 40 mL 使溶解, 用正丁醇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 用水洗涤 3 次, 蒸干, 残渣加甲醇 5 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取甘草对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。按其质量标准中处方比例制备不含甘草的阴性样品, 照上述供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各 10 μL , 分别点于同一用 1%

氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上, 以醋酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15: 1: 1: 2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 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位置上, 显相同颜色的橙黄色荧光斑点。阴性对照品无此斑点。见图 1。



1: 金银花对照药材溶液; 2: 银翘伤风胶囊; 3: 阴性对照溶液

1: 牛黄对照药材溶液; 2: 银翘伤风胶囊; 3: 阴性对照溶液



1: 芦根对照药材溶液; 2: 银翘伤风胶囊; 3: 阴性对照溶液

1: 甘草对照药材溶液; 2: 银翘伤风胶囊; 3: 阴性对照溶液

图 1 银翘伤风胶囊薄层色谱图

3 银翘伤风胶囊中连翘苷的含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶。流动相: 乙腈-水-冰醋酸(22: 78: 0.1), 柱温 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 理论塔板数按连翘苷峰面积计算不低于 3 000。

3.2 线性范围及标准曲线制备 取连翘苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含连翘苷 0.099

mg 的对照品溶液, 摇匀, 即得。分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按上述色谱条件进行测定, 分别注入液相色谱仪, 得回归方程为: $Y = 4.89 \times 10^5 X - 6.78 \times 10^3$ ($r = 0.9999$), 结果表明连翘苷在 0.199~ 0.991 μg 之间有良好的线性关系。

3.3 供试品溶液的制备^[3] 取本品 20 粒, 倾出内容物, 研匀, 取约 2 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加甲醇 50 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 加甲醇补足重量, 滤过, 取续滤液 25 mL, 蒸至近干, 加中性氧化铝 1 g 拌匀, 加置中性氧化铝柱(100~ 120 目, 9 g, 内径 1~ 1.5 cm) 上, 用 70% 乙醇 120 mL 洗脱, 收集洗脱液, 浓缩至干, 残渣用 50% 甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3.4 阴性对照试验 按处方比例, 不加连翘药材, 依法制得阴性样品, 再按供试品处理方式制备阴性供试液, 测定, 在连翘苷峰位处无吸收。阴性对照溶液不干扰样品中连翘苷的测定, 结果见图 2~ 4。

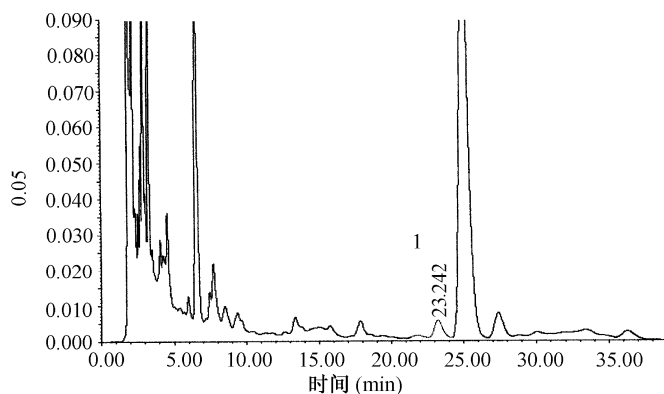


图 2 银翘伤风胶囊色谱图

1: 连翘苷色谱峰

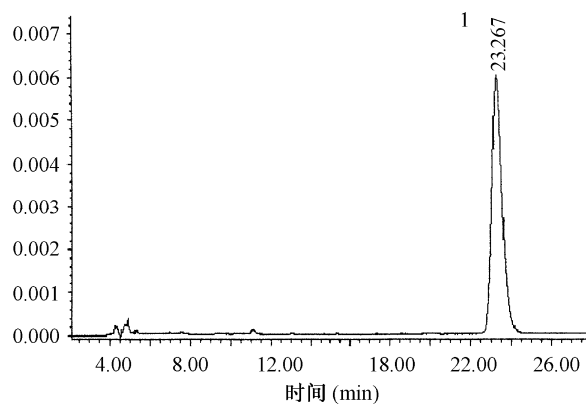


图 3 连翘苷对照品色谱图

1: 连翘苷色谱峰

3.5 精密度试验 分别精密吸取同一批对照品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 连翘苷对照品 5 次峰面积

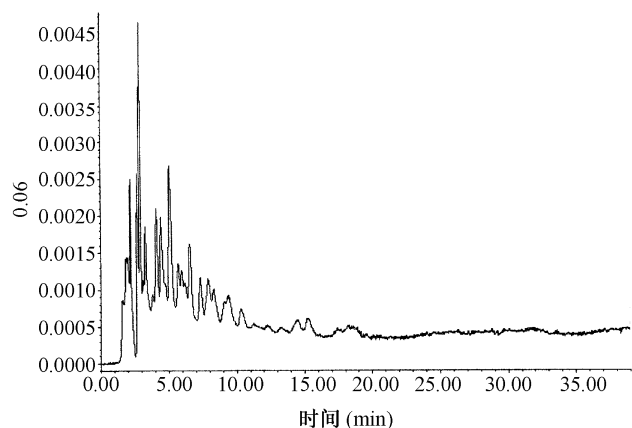


图 4 阴性液样品色谱图

积分值相对标准偏差为 1.0%，说明精密度较高。

3.6 稳定性试验 取供试品溶液，分别在 0, 2, 4, 8, 12 h，每次精密进样 5 μ L，样品测定数据相对标准偏差为 1.3% ($n=5$)，因此样品中所测成分在 12 h 内是稳定的。

3.7 重复性试验 分别精密称取同一批号(批号: 20040601) 银翘伤风胶囊各 5 份，精密称定重量，分别制备供试品溶液和测定，试验结果表明，本方法重复性较好，RSD 为 2.17%。

3.8 回收率试验 分别精密称取本品(批号: 20040601) 5 份，每份约 0.5 g，精密称定，分别加入连翘苷对照品 0.25 mg，混匀后，分别按含量测定项下制备供试品溶液及测定，结果见表 1。

表 1 连翘苷回收率测定数据表

供试品取样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)
0.498 6	0.222	0.250	0.469	98.8
0.500 1	0.221	0.250	0.470	99.6
0.502 0	0.222	0.250	0.472	100.0
0.501 4	0.222	0.249	0.470	99.6
0.499 7	0.221	0.248	0.470	100.4

5 份样品的连翘苷平均回收率为 99.7%，RSD=0.48%，表明回收率较高，方法可靠。

3.9 供试品测定 取本品 3 批，按供试品含量测定项下操作，结果见表 2。

表 2 供试品含量测定数据表

批号	连翘苷含量(%)	连翘苷平均含量(%)
20040601	0.444 2	0.443
	0.440 9	
20040602	0.444 4	0.443
	0.441 9	
20040603	0.448 7	0.450
	0.450 4	

4 讨论

银翘伤风胶囊是常用中成药，其方中主药连翘具有清热止呕，清利肝胆，除湿退黄等多种作用。连翘中的生物活性成分连翘苷具有较强的抗菌作用^[4]。为提高其质量标准，增加药品可控性，故以连翘苷作为指标成分，进行了含量测定，并且对该方进行了薄层鉴别研究。

金银花-连翘为方中起主要作用的药，因金银花中的有效成分绿原酸性质不稳定，故本实验采用高效液相色谱法测定本方连翘中有效成分连翘苷的含量。按参考文献的方法^[5,6]对连翘苷进行含量测定时效果一直不佳，基线分离不完全。故经多次试验将流动相调整为乙腈-水-冰醋酸 22: 78: 0.1。使用该流动相后完全可以达到基线分离，效果好，重现性高。

[参考文献]

- [1] 黄淑彰, 骆园, 黎小伟. HPLC 法测定银翘解毒片中绿原酸和连翘苷的含量[J]. 广西中医学院学报, 2004, 7(2): 58-60.
- [2] 廖朝峰, 胡志军, 谢红亮. HPLC 法测定双黄连胶囊中连翘酯苷 A 及连翘苷的含量[J]. 中国药师, 2005, 8(5): 385-386.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 117-118.
- [4] 刘东雷, 李会轻, 徐绥绪. 连翘属植物成分的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12(4): 301.
- [5] 展雪峰, 张翠萍, 王涛. HPLC 测定银翘解毒片中连翘苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1088-1089.
- [6] 王春芳, 张卫兵. HPLC 法测定抗病毒口服液中连翘苷的含量[J]. 中国药品标准, 2004, 5(3): 44-46.