

• 研究报告 •

咳喘六味合剂质量标准提高研究

杨帆平¹, 李国文², 奚 燕³ (1. 上海中医药大学附属普陀医院药物临床试验机构办公室, 上海 200062; 2. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院药剂科, 上海 200082; 3. 上海中医药大学附属龙华医院药剂科, 上海 200032)

[摘要] 目的 完善龙华医院院内制剂咳喘六味合剂的质量控制标准。方法 应用 TLC 法对咳喘六味合剂中的黄芩、细辛进行定性鉴别;应用 HPLC 法对麻黄、黄芩进行含量测定。采用 Welch-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以乙腈-0.1%磷酸溶液(4:96)及甲醇-0.1%磷酸溶液(47:53)为流动相;检测波长分别为 206、278 nm;流速为 1.0 ml/min。结果 TLC 法显示与黄芩、细辛药材特征荧光斑点相符合的斑点,且阴性对照溶液无干扰。盐酸麻黄碱在 12.04~301.00 μg/ml 范围内线性关系良好($r=1.0000$),平均回收率为 101.7%,RSD 为 1.5%;盐酸伪麻黄碱在 7.98~199.40 μg/ml 范围内线性关系良好($r=1.0000$),平均回收率为 101.6%,RSD 为 2.4%。黄芩苷在 5.18~129.50 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.9999$),平均回收率为 101.0%,RSD 为 0.3%。结论 本实验建立的定性鉴别和含量测定方法简单可行,可以作为咳喘六味合剂的质量控制标准。

[关键词] 咳喘六味合剂;质量标准;薄层色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0055-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.013

Study on improvement of quality standard for Kechuan Liuwei oral liquid

YANG Fanping¹, LI Guowen², XI Yan³ (1. Office of Clinical Trial Institution, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2. Department of Pharmacy, Shanghai Integrative Medical Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China; 3. Department of Pharmacy, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective** To improve the quality control standard of the hospital preparation Kechuan Liuwei oral liquid in Longhua Hospital. **Methods** TLC was used for qualitative identification of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Asarum sieboldi* Mig in the Kechuan Liuwei oral liquid. Ephedrine and Baicalin content in ephedra and *Scutellaria* were determined by HPLC with Welch-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (4:96) and methanol-0.1% phosphoric acid solution (47:53) were used as mobile phase. The detection wavelengths were 206 nm and 278 nm respectively. The flow rate was 1.0 ml/min. **Results** The TLC spots of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *asarum* were clear without interference of the negative control. The linear range of Ephedrine hydrochloride was within 12.04-301.00 μg/ml ($r=0.9999$). The average recovery was 101.7% (RSD=1.5%). The linear range of Pseudoephedrine hydrochloride was within 7.98-199.40 μg/ml ($r=0.9999$). The average recovery was 101.6% (RSD=2.4%). The linear range of Baicalin was within 5.18-129.50 μg/ml ($r=0.9999$). The average recovery was 101.0% (RSD=0.3%). **Conclusion** The qualitative identification and the active ingredient assay method established in this experiment were simple and feasible. Those methods can be used as the quality control standard for Kechuan Liuwei oral liquid.

[Key words] Kechuan Liuwei oral liquid; quality standard; TLC

咳喘六味合剂是以中医药理论为指导,结合临

床实践,将麻黄、附子、黄芩、细辛、桃仁和虎耳草配制而成的院内制剂,该药温阳抗寒、化痰平喘,主要用于虚寒型或是寒邪较盛的咳喘治疗。哮喘属于中医“哮病”范畴,长期临床经验表明,中医药在治疗哮喘方面具有优势,本方较好地体现了祖国医学“治病求本”的思想^[1]。

咳喘六味合剂适用于肾阳虚哮喘患者,临床疗效显著^[2],但是其质量标准的制订时间较早,且仅针

[基金项目] 上海市浦东新区中医药专项课题项目(PDYNZJ2015-17)

[作者简介] 杨帆平,药师,研究方向:中药制剂质量标准研究, Tel: 13761614195, Email: answerquestion2010@yeah.net

[通讯作者] 奚 燕,副主任药师,研究方向:中药制剂质量标准研究, Tel: 18917763102, Email: xiyanyan363700@126.com

对麻黄一种药味进行了定性鉴别,对外观、pH 值等检查项缺少有效的含量测定方法。本实验增加了哮喘六味合剂中的黄芩、细辛的薄层色谱(TLC)鉴别方法,新建了麻黄、黄芩的含量测定方法,并进行了方法学验证,为提高和完善哮喘六味合剂的质量标准提供了可靠依据。

1 仪器和试剂

Sartorius BS110S 分析天平(万分之一级);Sartorius CP225D 分析天平(十万分之一级);硅胶 G 薄层预制板(青岛海洋化工厂);其余试剂均为分析纯;对照品:黄芩苷(批号:110715-201318),黄芩素(批号:111595-201607),汉黄芩素(批号:111514-201605),细辛脂素(批号:111889-201504),盐酸麻黄碱(批号:171241-201508),盐酸伪麻黄碱(批号:171237-201509),黄芩中药材(批号:120955-201309),细辛中药材(批号:121204-201405),以上对照品均由中国食品药品检定研究院提供。哮喘六味合剂供试品(批号:160918),龙华医院制剂室。

2 方法与结果

2.1 黄芩的薄层鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备

精密量取哮喘六味合剂 5 ml 置具塞锥形瓶中,加乙酸乙酯-甲醇(3:1)30 ml,超声处理 30 min,滤过,蒸干,残渣加甲醇 5 ml 使溶解,摇匀,作为供试品溶液。

2.1.2 对照药材溶液的制备

取黄芩对照药材 0.5 g,加乙酸乙酯-甲醇(3:1)30 ml,按“2.1.1”项下方法制成对照药材溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备

取黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品,加甲醇溶解,制成每 1 ml 含 1 mg 的对照品溶液。

2.1.4 阴性样品溶液的制备

取除黄芩药材外的其他五味药材按相同处方配比和工艺制备阴性样品,取 5 ml,再按“2.1.1”项下方法制得阴性样品溶液。

2.1.5 薄层条件和结果

按照 TLC 法^[3](《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502)实验,吸取供试品溶液、对照药材溶液、阴性样品溶液各 2 μ l 以及对照品溶液 1 μ l,分别点于同一聚酰胺薄膜板上,以甲苯-乙酸丁酯-甲醇-甲酸(10:3:1:2)为展开剂,预饱和 30 min,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下

检视。结果如图 1 所示,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;在与对照品色谱相应的位置上,显 3 个相同颜色的斑点,且阴性样品溶液对结果没有影响。说明本方法可用于鉴别哮喘六味合剂中的黄芩。

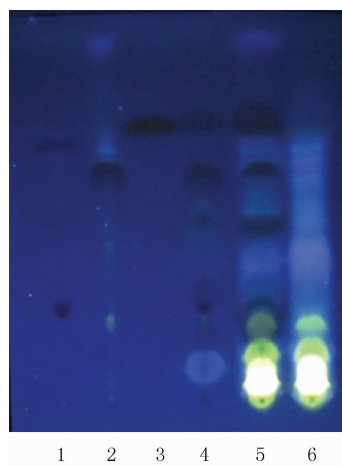


图 1 黄芩薄层鉴别图

1. 黄芩苷;2. 黄芩素;3. 汉黄芩素;
4. 黄芩对照药材;5. 供试品;6. 阴性样品

2.2 细辛的薄层鉴别^[4]

2.2.1 供试品溶液的制备

取哮喘六味合剂 10 ml,加甲醇 50 ml,加热回流 30 min,滤过,蒸干,残渣加水 30 ml 使溶解,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)振摇提取 2 次,每次 20 ml,合并石油醚液,挥干,残渣加乙酸乙酯 0.5 ml,使溶解,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.2 对照药材溶液的制备

取细辛对照药材 0.5 g,加甲醇 50 ml,按“2.2.1”项下方法制得对照药材溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备

称取细辛脂素对照品,加甲醇溶解制成每 1 ml 含 1 mg 的对照品溶液。

2.2.4 阴性样品溶液的制备

取除细辛药材外的其他五味药材,按相同处方配比和工艺制备阴性样品,取 10 ml,按“2.2.1”项下方法制得阴性样品溶液。

2.2.5 薄层条件和结果

按照 TLC 法^[3]实验,吸取上述溶液各 15 μ l,分别点于同一硅胶 G 板上,以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯(16:3:4)为展开剂,展开,取出,晾干,喷 5%香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果如图 2 所示,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,阴性样品溶液对结果无影响。说明本方法可用于鉴别哮喘六味合剂中的细辛。

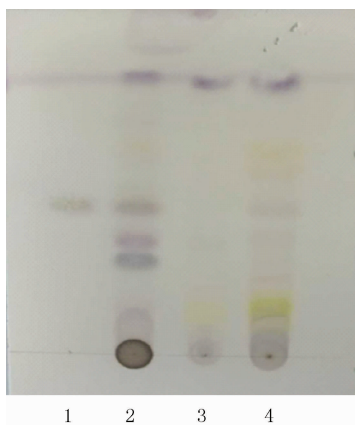


图2 细辛薄层鉴别图

1. 细辛脂素; 2. 对照药材; 3. 阴性样品; 4. 供试品

2.3 麻黄的含量测定^[5]

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;乙腈-0.1%磷酸溶液(4:96)为流动相;检测波长206 nm;流速1.0 ml/min。理论板数按盐酸麻黄碱峰计算,应不低于7 000。

2.3.2 对照品溶液的制备

取盐酸麻黄碱对照品15 mg,精密称定置于

50 ml量瓶中,甲醇使之溶解,定容至刻度,摇匀;另精密称定盐酸伪麻黄碱对照品25 mg,以同法制成溶液;分别精密量取上述溶液5、2 ml,置同一25 ml量瓶中,流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(4:96),稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备

精密量取咳喘六味合剂2 ml,置分液漏斗中,加水10 ml及浓氨试液1 ml,摇匀,乙醚液振摇提取3次,每次30 ml,合并乙醚液,加5%盐酸甲醇溶液5 ml,摇匀,40℃回收溶剂至干,残渣加上上述流动相溶解,并转移至25 ml量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 阴性样品溶液的制备

取按处方去除麻黄制得的阴性样品2 ml,按“2.3.3”项下方法制得阴性样品溶液。

2.3.5 专属性试验

精密吸取上述对照品、供试品、阴性样品溶液各10 μl,分别注入液相色谱仪,进行测定。结果表明,在本实验选用的色谱条件下,供试品与对照品溶液在相同保留时间出峰,阴性样品溶液对盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的测定无干扰(图3)。

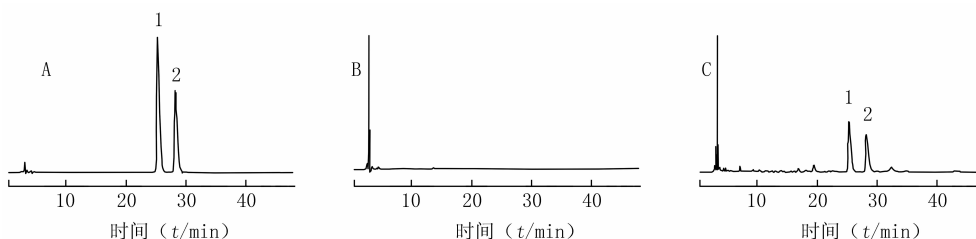


图3 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱 HPLC 图

A. 对照品; B. 阴性样品; C. 供试品; 1. 盐酸麻黄碱; 2. 盐酸伪麻黄碱

2.3.6 线性关系考察

分别精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品15.05、9.97 mg,置同一50 ml量瓶中,加上上述流动相溶解,稀释至刻度,摇匀。分别精密量取上述混合溶液2、5、10、25 ml,分别置50 ml量瓶中,加上上述流动相稀释至刻度,摇匀。精密吸取制得的溶液及母液各10 μl,注入液相色谱仪,测定。以对照品浓度为横坐标,以峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。结果显示,盐酸麻黄碱在12.04~301.00 μg/ml范围内呈现良好的线性关系,回归方程为 $Y=23.5198X-10.4008$,相关系数 $r=1.0000$;盐酸伪麻黄碱在7.98~199.40 μg/ml范围内呈现出良好的线性关系,回归方程为 $Y=23.9864X-8.2847$, $r=1.0000$ 。

2.3.7 稳定性试验

制备供试品溶液,分别在6个时间点(0、2、4、8、12、24 h)测定峰面积,每次精密吸取10 μl进样。结果得到盐酸麻黄碱在6个时间点的峰面积积分值RSD为0.2%,盐酸伪麻黄碱的RSD为1.3%,说明咳喘六味合剂在24 h内稳定。

2.3.8 重复性试验

制备6份供试品溶液,分别进样10 μl,测定含量,结果盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的平均含量分别为0.84 mg/ml和0.62 mg/ml,RSD分别为0.11%和0.92%,结果表明本方法重复性较好。

分别由两人各自配制相同浓度的供试品溶液6份,通过不同的仪器和试剂,计算12个含量数据的相对标准差。结果得到盐酸麻黄碱含量的RSD为

0.21%, 盐酸伪麻黄碱含量的 RSD 为 1.1%, 表明试验符合要求。

2.3.9 回收率试验

分别精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品 18.32、15.07 mg, 置同一 50 ml 量瓶中, 用上述流动相溶解, 稀释至刻度, 混匀, 备用; 精密量取哮喘六味合剂 1 ml, 共 9 份, 置分液漏斗中, 分别加入上述配制好的对照品溶液 0.8、1.0、1.2 ml, 平行 3 份, 分别加水 10 ml 及浓氨试液 1 ml, 摇匀, 乙醚液振摇提取 3 次, 每次 30 ml, 合并乙醚液, 加 5% 盐酸甲醇溶液 5 ml, 混匀, 40 °C 回收溶剂至干, 残渣加流动相溶解, 转移至 25 ml 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 即得; 计算回收率得到, 盐酸麻黄碱平均回收率为 101.7%, RSD 为 1.5%; 盐酸伪麻黄碱平均回收率为 101.6%, RSD 为 2.4%, 结果表明本方法准确度高, 回收率较好。

2.4 黄芩的含量测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (47 : 53) 为流动相; 检测波长

278 nm; 流速 1.0 ml/min。理论板数按黄芩苷峰计算, 应不低于 5 000。

2.4.2 对照品溶液的制备

取黄芩苷对照品 15 mg, 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备

精密量取哮喘六味合剂 5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 2 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4.4 阴性样品溶液的制备

取按处方去除黄芩制得的阴性样品 5 ml, 按“2.4.3”项下方法制得阴性样品溶液。

2.4.5 专属性试验

精密吸取上述对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μ l, 分别注入液相色谱仪, 进行测定。结果表明, 在本实验选用的色谱条件下, 供试品与对照品溶液在相同保留时间出峰, 阴性样品溶液对黄芩苷的测定无影响 (图 4)。

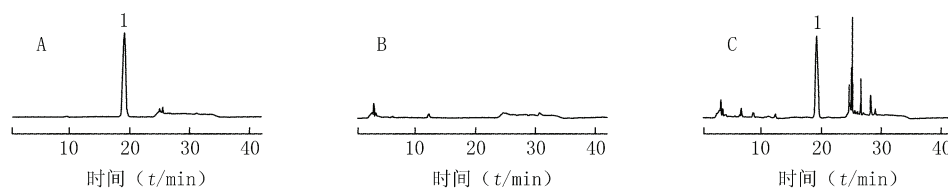


图 4 黄芩苷 HPLC 图

A. 对照品; B. 阴性样品; C. 供试品; 1. 黄芩苷

2.4.6 线性关系考察

精密称取黄芩苷对照品 13.88 mg, 置 50 ml 量瓶中, 甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀。分别精密量取 1、2、3、5、6、10 ml, 分别置 50 ml 量瓶中, 用流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液 (47 : 53) 稀释至刻度, 摇匀。以上溶液及母液各精密吸取 10 μ l, 分别注入液相色谱仪, 测定。以黄芩苷对照品浓度为横坐标, 以峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。结果显示黄芩苷在 5.18~129.50 μ g/ml 范围内呈现良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 39.015 1X - 15.643 9$, $r = 0.999 9$ 。

2.4.7 稳定性试验

制备供试品溶液, 分别在 7 个时间点 (0、2、4、8、12、18、24 h) 测定峰面积, 每次精密吸取 10 μ l 进样。结果得到 7 个时间点测定的峰面积积分值 RSD 为 0.4%, 表明哮喘六味合剂在 24 h 内稳定性良好。

2.4.8 重复性试验

制备 6 份供试品溶液, 分别进样 10 μ l。通过计算得到, 黄芩苷的平均含量为 9.0 mg/ml, RSD 为 1.0%, 结果表明本方法的重复性良好。

分别由两人各自配制相同浓度的供试品溶液 6 份, 通过不同的仪器和试剂, 计算 12 个含量数据的相对标准差。结果得到样品含量的 RSD 为 1.3%, 表明试验符合要求。

2.4.9 回收率试验

精密量取哮喘六味合剂 2.5 ml, 共 9 份, 分别置于 50 ml 量瓶中, 以 3 份为一组, 每组分别加入黄芩苷对照品约 18、22.5、27 mg, 甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。计算平均回收率为 101.0%, RSD 为 0.3%, 结果表明本方法准确度高。

(下转第 85 页)

- [3] 王晓勇, 骆守真, 崔春丽. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗急性脑梗死临床研究[J]. 河北中医, 2017, 39(9):1328-1331.
- [4] 李海龙, 尹晓新. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗急性缺血性脑卒中的临床观察[J]. 现代医院, 2017, 17(2):239-240.
- [5] 骆继业, 谢永鹏, 陈晓兵, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗老年急性脑梗死疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(58):16-18.
- [6] 王敏, 蔡胜男, 李迪, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对急性脑梗死患者神经功能的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 19(7):29-31.
- [7] 邱斌, 肖展翅. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗急性脑梗死的临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(8):1033-1035.
- [8] 高聚, 姜华, 肖展翅, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗急性脑梗死的临床疗效观察[J]. 实用心脑血管病杂志, 2015, 23(4):133-134.
- [9] 肖展翅, 倪小红, 李钢, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对脑梗死恢复期患者血液流变学的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(16):1828-1830.
- [10] 赵宾江, 王振中, 凌娅, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期(痰瘀阻络证)Ⅲ期临床试验[D]. 中草药, 2013, 44(24):3525-3530.
- [11] 华玉凡. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗缺血性卒中恢复期(痰瘀阻络证)的临床研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2015.
- [12] 张雯, 宋俊科, 何国荣, 等. 银杏二萜内酯对缺血/再灌注大鼠脑组织中神经递质的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(12):1648-1656.
- [13] WANG X, JIANG C M, WAN H Y, et al. Neuroprotection against permanent focal cerebral ischemia by ginkgolides A and B is associated with obstruction of the mitochondrial apoptotic pathway *via* inhibition of c-Jun N-terminal kinase in rats[J]. J Neurosci Res, 2014, 92(2):232-242.
- [14] GU J H, GE J B, LI M, et al. Inhibition of NF-kappaB activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Eur J Pharmac Sci, 2012, 47(4):652-660.
- [15] MA S, YIN H, CHEN L, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats[J]. J Nat Med, 2012, 66(1):25-31.
- [收稿日期] 2018-06-15 [修回日期] 2018-09-04
[本文编辑] 李睿曼

(上接第58页)

3 讨论

咳喘六味合剂中的附子是一味常用的温里药, 生药材使用前需经炮制减毒, 其含有的主要成分可为单酯型和双酯型生物碱。笔者尝试用 HPLC 法对其进行定量测定, 但阴性样品干扰较大, 不能准确控制其含量, 后续将对此开展研究。虎耳草属于民族医药, 未被《中国药典》收录, 只收录于贵州省地方药材标准。现有研究已发现其乙醇提取物中含有多元酚、黄酮、有机酸等^[6]多种成分, 但由于研究时间较短, 需要进一步探索其活性部位的活性成分。

展开剂的选择对 TLC 中待鉴别成分的分离效果至关重要。对咳喘六味合剂中的桃仁, 笔者曾尝试以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10) 5~10℃放置 12 h 的下层溶液为展开剂进行 TLC 研究, 但无论是日光还是荧光下, 都未能在与对照药材色谱相应位置上显示相同颜色斑点。而在对细辛的鉴别过程中, 笔者采取了两种不同的方法, 其中, 以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(3:1)为展开剂的方法未能成功分离得到满意的结果。

对于麻黄中主要药效成分的含量测定, 《中国药典》(2015年版)标明的测定方法中, 色谱柱为乙醚

键合硅胶 C₁₈ 柱, 而本实验选用了常规的 C₁₈ 柱对其进行含量测定, 结果发现两者的分离度均大于 2.0, 理论塔板数超过 10 000, 比药典方法更加简便易行。

在黄芩苷含量测定的实验中, 对于流动相的选择, 首先参照《中国药典》(2015年版)中【黄芩】项下的含量测定方法, 然后根据系统适用性要求调整流动相比例, 当甲醇与 0.1% 磷酸的比例为 47:53 时, 色谱峰分离度较好, 理论塔板数高。

【参考文献】

- [1] 尹良胜. 吴银根教授中医药治疗哮喘经验[J]. 上海中医药杂志, 2006, 20(4):62-63.
- [2] 倪伟, 吴银根, 张惠勇, 等. 咳喘落治疗支气管哮喘寒哮证多中心临床研究[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(3):43-45.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部):2015年版[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:57.
- [4] 顾俊. 川芎茶调散的质量标准研究[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2014, 31(4):474-475.
- [5] 周斌, 刘可越, 刘海军, 等. RP-HPLC 法测定麻黄配方颗粒中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 天津药学, 2009, 21(4):9-11.
- [6] 先春, 龚小见, 赵超, 等. 虎耳草的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):124-126.

[收稿日期] 2018-07-02 [修回日期] 2018-09-10
[本文编辑] 李睿曼