



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101708223 A
(43) 申请公布日 2010. 05. 19

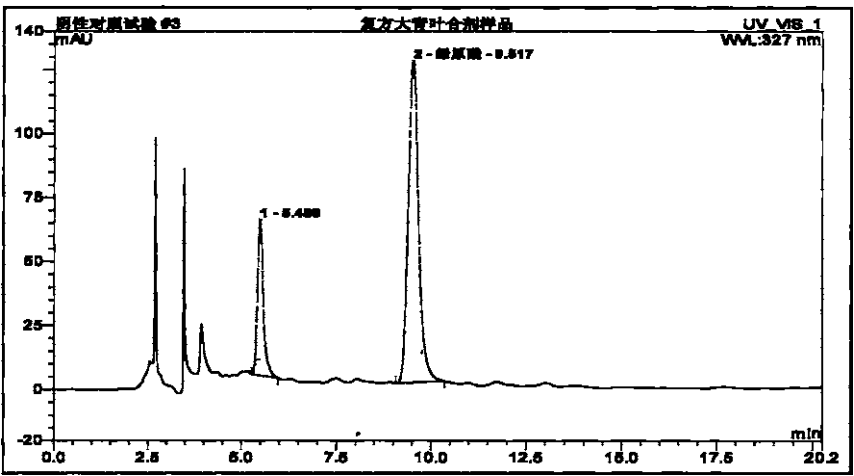
(21) 申请号 200910230003. 3
(22) 申请日 2009. 11. 04
(71) 申请人 山东鲁泰环中制药有限公司
地址 255049 山东省淄博市高新技术开发区
兰雁大道 17 号
(72) 发明人 郭桂秋 车蕾 翟勇 陈树恩
李钦刚 肖金金 寇丽丽 王丽庆
王中成
(74) 专利代理机构 青岛发思特专利商标代理有
限公司 37212
代理人 蔡绍强
(51) Int. Cl.
A61K 36/708(2006. 01)
A61P 11/00(2006. 01)

A61P 31/16(2006. 01)
A61P 31/14(2006. 01)
A61P 31/20(2006. 01)
G01N 30/02(2006. 01)
G01N 30/90(2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 30 页 附图 7 页

(54) 发明名称
中药复方大青叶制剂的制备方法、质量控制
方法和应用
(57) 摘要

本发明涉及复方大青叶制剂的制备和质量控
制方法。制备方法包括主药配制和制备相应制剂
两步,其主药配制中主药重量组分配比是,大青叶
360 ~ 440 份,山银花或金银花 180 ~ 220g份,
羌活 90 ~ 110 份,拳参 90 ~ 110 份,大黄 90 ~
110 份;以上诸味药材,加常规量水煎煮两次,每
次 1h;合并煎煮液,滤过,滤液浓缩至 60℃时相对
密度 1. 08 ~ 1. 32;加乙醇使含醇量达 50 ~ 60%,
静置,滤过,滤液回收乙醇并浓缩至 60℃时相对
密度 1. 17 ~ 1. 43 的清膏,备用;按药品规范备相
应制剂。质量控制方法是内容物的鉴别和含有成
分的含量测定;含大青叶的鉴别;山银花或金银
花的鉴别;大黄的鉴别;羌活的鉴别;大黄中大黄
素与大黄酚总含量的测定和绿原酸的含量测定;
它们在制备治疗感冒、流感、腮腺炎、急性病毒性
肝炎药物制剂中的应用。



1. 一种中药复方大青叶制剂的制备方法,包括主药配制和制备相应制剂两步,其特征是:

(1) 主药配制

主药重量组分配比是,大青叶 360 ~ 440 份,山银花或金银花 180 ~ 220g 份,羌活 90 ~ 110 份,拳参 90 ~ 110 份,大黄 90 ~ 110 份;

以上诸味药材,加常规量水煎煮两次,每次 1h;合并煎煮液,滤过,滤液浓缩至 60℃时相对密度 1.08 ~ 1.32;加乙醇使含醇量达 50 ~ 60%,静置,滤过,滤液回收乙醇并浓缩至 60℃时相对密度 1.17 ~ 1.43 的清膏,备用;

(2) 制备相应制剂

①制备口服液

向上步清膏加 2 ~ 3 倍水,搅匀,冷藏 $\geq 12\text{h}$,滤过,滤液加热煮沸 0.5h,待温度降至 60℃时,加入防腐剂,冷藏 $\geq 12\text{h}$,滤过;添加矫味剂,搅匀,制得药物原液,备用;

添加剂的重量配比是:主药总量:防腐剂:矫味剂 = 1 : 0.003 ~ 0.004 : 0.14 ~ 0.16;

矫味剂中,蔗糖:非营养性或低热值矫味剂 = 1 : 0.04 ~ 0.05,

非营养性或低热值矫味剂从木糖醇,赤藓糖醇,甘草酸,甜蜜素或甜菊苷中选择;

配量蔗糖加水煮沸制成糖浆,再加入非营养性或低热值矫味剂使溶解,与药物原液合并,搅匀;加水至总体积 1000 份,按药品规格灌装,灭菌,即得;

②制备颗粒剂

上步清膏 $\leq 100^\circ\text{C}$ 干燥并制成细粉,按制药常规加适宜药用辅料,混匀并制成颗粒,上述配量可制得颗粒 1000 份,按药品规格包装,密封,即得;

③制备片剂

上步清膏 $\leq 100^\circ\text{C}$ 干燥并制成细粉,按制药常规加适宜药用辅料,混匀并制成颗粒,压片,包糖衣或薄膜衣,上述配量可制得片剂 1000 片,按药品规格包装,密封,即得;

④制备胶囊剂

上步清膏 $\leq 100^\circ\text{C}$ 干燥并制成细粉,按制药常规加适宜药用辅料,混匀并制成颗粒,填充于空胶囊内,上述配量可制得胶囊剂 1000 粒,按药品规格包装,密封,即得;

⑤制备丸剂

上步清膏 $\leq 100^\circ\text{C}$ 干燥并制成细粉,添加适宜药用辅料,按制药常规加水或蜂蜜和水为黏合剂混匀并制成球形或类球形丸剂, $\leq 80^\circ\text{C}$ 干燥;包糖衣或薄膜衣,上述配量可制得丸剂 1000 粒,按药品规格包装,密封,即得。

2. 按照权利要求 1 所述的中药复方大青叶制剂的制备方法其特征是主药重量组分配比是,大青叶 380 ~ 420 份,山银花或金银花 190 ~ 210g 份,羌活 95 ~ 105 份,拳参 95 ~ 105 份,大黄 95 ~ 105 份。

3. 按照权利要求 1 所述的中药复方大青叶制剂的质量控制方法,其特征是所述的质量控制方法主要是内容物的鉴别和含有成分的含量测定:

A. 内容物的鉴别的步骤

(1) 大青叶的鉴别

取样量:口服液 10ml;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

口服液直接用于乙酸乙酯或三氯甲烷提取 ;其他剂型先用水 10ml 溶解后再同法操作 ;

取口服液 10ml,用乙酸乙酯或三氯甲烷提取 2 次,每次 10ml,合并乙酸乙酯或三氯甲烷提取液,用 1%氢氧化钠溶液洗涤 2 次,每次 10ml,乙酸乙酯或三氯甲烷液置水浴上蒸干,残渣加乙酸乙酯或三氯甲烷 1ml 使溶解,作为供试品溶液 ;另取靛玉红对照品,加乙酸乙酯或三氯甲烷制成每 1ml 含 0.05mg 的溶液,作为对照品溶液 ;

照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取供试品溶液 5 ~ 10 μ l,对照品溶液 5 μ l,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 5 : 4 : 1 的甲苯 - 乙酸乙酯 - 丙酮的混合液为展开剂,展开,取出,晾干 ;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的紫红色斑点 ;

(2) 山银花或金银花的鉴别

取样量 :口服液 10ml ;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂 ;

口服液直接用于按下述步骤进行 ;其他剂型先用水 10ml 溶解后,加盐酸调 PH 值,再同法操作 ;

取口服液 10ml,加盐酸 2 ~ 4 滴,使溶液 PH 值为 1 ~ 2,用乙酸乙酯或三氯甲烷提取 3 次,每次 20ml,合并乙酸乙酯或三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加水 10ml,分次溶解,用氨试液调 PH 值为 7.0 ~ 7.5,加于聚酰胺柱,湿法装柱,柱长 20cm,内径 15 ~ 20mm,用氨试液调 PH 值为 7.0 ~ 7.5 的水溶液 40ml 洗脱,洗脱液蒸干,残渣加甲醇 1ml 使溶解,必要时滤过,作为供试品溶液 ;另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液,作为对照品溶液 ;

照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取供试品溶液和对照品溶液各 1 ~ 2 μ l,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 1 : 4 的冰醋酸 - 水溶液或 20 : 6 : 0.8 三氯甲烷 - 甲醇 - 甲酸溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视,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 ;

或者取口服液 10ml,加于 30 ~ 60 目,内径 0.9cm 聚酰胺柱上,用水 50ml 洗脱,弃去洗脱液,再用 50%乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 2ml 使溶解,作为供试品溶液 ;另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液,作为对照品溶液 ;

照中国药典 2005 年版一部附录 VI B 薄层色谱法检验,吸取上述两种溶液各 0.5 ~ 1 μ l,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 20 : 6 : 0.8 的三氯甲烷 - 甲醇 - 甲酸为展开剂展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视 ;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 ;

(3) 大黄的鉴别

取样量 :口服液 10ml ;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂 ;

口服液直接用于按下述步骤进行 ;其他剂型先用水 10ml 溶解后,再加盐酸调 PH 值 ;

取口服液 10ml,加盐酸 1ml,置水浴中加热 30min,冷却后用乙醚提取 2 次,每次 20ml,合并乙醚提取液,挥干,残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解,作为供试品溶液 ;

另取大黄对照药材 0.5g,加甲醇 10ml,浸渍 1h,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10ml 使溶解,加盐酸 1ml,同法制成对照药材溶液 ;再取大黄素、大黄酚对照品,加乙酸乙酯制成每 1ml 各含 1mg 的混合溶液,作为对照品溶液 ;

照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取上述三种溶液各 5 μ l,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 15 : 5 : 1 的 30 ~ 60℃石油

醚-甲酸乙酯-甲酸的上层溶液为展开剂展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视;供试品色谱中,在与对照药材、对照品色谱相应的位置上,显相同的五个橙黄色荧光斑点;置氨气中熏,斑点变为红色;

(4) 羌活的鉴别

取样量:口服液 10ml;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

口服液直接用于按下述步骤进行;其他剂型先用水 10ml 溶解后,再用乙酸乙酯提取;

取口服液 10ml,用乙酸乙酯或 60~90℃石油醚提取 4 次,每次 10ml,合并乙酸乙酯或 60~90℃石油醚提取液,蒸干,残渣加乙醇 1ml 使溶解,作为供试品溶液;另取羌活对照药材 1g,加乙醇 30ml,浸渍 1h,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1ml 使溶解,作为对照药材溶液;

照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取供试品溶液和对照药材溶液各 5~8 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 10:2:3 的乙酸乙酯-甲醇-水的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;

或 2:1:1 的正己烷-苯-乙酸乙酯混合溶剂为展开剂;或 4:1 的正己烷-乙酸乙酯混合溶剂为展开剂;展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;

B. 对含有的成分按照中国药典 2005 年版一部附录 VID 高效液相色谱法进行含量测定的步骤

1、大黄中大黄素与大黄酚总含量的测定方法

(1) 色谱条件与系统适用性试验

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;85:15 的甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相;检测波长 254nm;理论板数按大黄素、大黄酚峰计算均不得低于 4000;

(2) 对照品溶液的制备

精密称取大黄素、大黄酚对照品适量,加流动相制成每 1ml 含大黄素 30 μg、含大黄酚 50 μg 的混合对照品溶液,备用;

(3) 供试品溶液的制备

精密吸取本品 5ml,加盐酸 1ml,氯仿 30ml,加热回流 30min,放冷,分取氯仿层,水层用氯仿强力振摇提取 3 次,每次 30ml,合并氯仿提取液,水浴蒸干,残渣加流动相使溶解,定容至 10ml 量瓶中,摇匀,滤过,备用;

(4) 测定法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μl,注入液相色谱仪,测定,即得;

本品每 1ml 含大黄以大黄素 ($C_{15}H_{10}O_5$) 与大黄酚 ($C_{15}H_{10}O_4$) 之和计,不得少于 0.1mg;

2、绿原酸的含量测定方法

(1) 色谱条件与系统适用性试验

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;15:85 的甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相;检测波长 324nm;理论板数按绿原酸峰计算,不得低于 3000;

(2) 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1ml 含 20 μg 的对照品溶液,10℃ 以下保存;

(3) 供试品溶液的制备

精密吸取本品 1ml, 置 50ml 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 备用;

(4) 测定法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

本品每 1ml 含绿原酸 ($C_{16}H_{18}O_9$) 不得少于 0.6mg。

4. 按照权利要求 1 或 2 所述的中药复方大青叶制剂的应用, 其特征是在制备治疗感冒、流感、腮腺炎、急性病毒性肝炎药物制剂中的应用。

中药复方大青叶制剂的制备方法、质量控制方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中药制剂的制备和质量控制方法,具体涉及复方大青叶制剂的制备和质量控制方法。

背景技术

[0002] 复方大青叶制剂是一种已经上市的中药复方制剂,具有疏风清热,解毒消肿,凉血利胆的作用。临床上主要用于感冒发热头痛,咽喉红肿,耳下肿痛,胁痛黄疸等症,以及流感、腮腺炎、急性病毒性肝炎见有上述症状者。但现有复方大青叶制剂标准落后,含蔗糖量高达 46%,质量控制指标较少,仅有靛玉红、绿原酸、大黄鉴别项,没有全面的含量测定的内容。即现有技术的质量控制方法不能有效控制复方大青叶制剂的质量,从而将影响产品的生产和保证质量。

发明内容

[0003] 本发明的目的,在于提供一种改进的复方大青叶制剂的制备方法和质量可控的质量控制方法。

[0004] 本发明的技术方案是:

[0005] 研制一种中药复方大青叶制剂的制备方法,包括主药配制和制备相应制剂两步,其特征是:

[0006] (1) 主药配制

[0007] 主药重量组分配比是,大青叶 360 ~ 440 份,山银花或金银花 180 ~ 220g 份,羌活 90 ~ 110 份,拳参 90 ~ 110 份,大黄 90 ~ 110 份;

[0008] 以上诸味药材,加常规量水煎煮两次,每次 1h;合并煎煮液,滤过,滤液浓缩至 60℃时相对密度 1.08 ~ 1.32;加乙醇使含醇量达 50 ~ 60%,静置,滤过,滤液回收乙醇并浓缩至 60℃时相对密度 1.17 ~ 1.43 的清膏,备用;

[0009] (2) 制备相应制剂

[0010] ①制备口服液

[0011] 向上步清膏加 2 ~ 3 倍水,搅匀,冷藏 $\geq 12\text{h}$,滤过,滤液加热煮沸 0.5h,待温度降至 60℃时,加入防腐剂,冷藏 $\geq 12\text{h}$,滤过;添加矫味剂,搅匀,制得药物原液,备用;

[0012] 添加剂的重量配比是:主药总量:防腐剂:矫味剂 = 1 : 0.003 ~ 0.004 : 0.14 ~ 0.16;

[0013] 矫味剂中,蔗糖:非营养性或低热值矫味剂 = 1 : 0.04 ~ 0.05,

[0014] 非营养性或低热值矫味剂从木糖醇,赤藓糖醇,甘草酸,甜蜜素或甜菊苷中选择;

[0015] 配量蔗糖加水煮沸制成糖浆,再加入非营养性或低热值矫味剂使溶解,与药物原液合并,搅匀;加水至总体积 1000 份,按药品规格灌装,灭菌,即得;

[0016] ②制备颗粒剂

[0017] 上步清膏 $\leq 100^\circ\text{C}$ 干燥并制成细粉,按制药常规加适宜药用辅料,混匀并制成颗

粒,上述配量可制得颗粒 1000 份,按药品规格包装,密封,即得;

[0018] ③制备片剂

[0019] 上步清膏 $\leq 100^{\circ}\text{C}$ 干燥并制成细粉,按制药常规加适宜药用辅料,混匀并制成颗粒,压片,包糖衣或薄膜衣,上述配量可制得片剂1000片,按药品规格包装,密封,即得;

[0020] ④制备胶囊剂

[0021] 上步清膏并制成细粉,按制药常规加适宜药用辅料,混匀并制成颗粒,填充于空胶囊内,上述配量可制得胶囊剂 1000 粒,按药品规格包装,密封,即得;

[0022] ⑤制备丸剂

[0023] 上步清膏 $\leq 100^{\circ}\text{C}$ 干燥并制成细粉,添加适宜药用辅料,按制药常规加水或蜂蜜和水为黏合剂混匀并制成球形或类球形丸剂, $\leq 80^{\circ}\text{C}$ 干燥;包糖衣或薄膜衣,上述配量可制得丸剂 1000 粒,按药品规格包装,密封,即得。

[0024] 上述的中药复方大青叶制剂的制备方法,其特征是主药重量组分配比是,大青叶 380 ~ 420 份,山银花或金银花 190 ~ 210g 份,羌活 95 ~ 105 份,拳参 95 ~ 105 份,大黄 95 ~ 105 份。

[0025] 上述的中药复方大青叶制剂的质量控制方法,其特征是所述的质量控制方法主要是内容物的鉴别和含有成分的含量测定:

[0026] A. 内容物的鉴别的步骤

[0027] (1) 大青叶的鉴别

[0028] 取样量:口服液 10ml;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

[0029] 口服液直接用于乙酸乙酯或三氯甲烷提取;其他剂型先用水 10ml 溶解后再同法操作;

[0030] 取口服液 10ml,用乙酸乙酯或三氯甲烷提取2次,每次 10ml,合并乙酸乙酯或三氯甲烷提取液,用 1%氢氧化钠溶液洗涤 2 次,每次 10ml,乙酸乙酯或三氯甲烷液置水浴上蒸干,残渣加乙酸乙酯或三氯甲烷 1ml 使溶解,作为供试品溶液;另取靛玉红对照品,加乙酸乙酯或三氯甲烷制成每 1ml 含 0.05mg 的溶液,作为对照品溶液;

[0031] 照中国药典 2005年版一部附录 VIB薄层色谱法检验,吸取供试品溶液 5 ~ 10 μl ,对照品溶液 5 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 5 : 4 : 1 的甲苯-乙酸乙酯-丙酮的混合液为展开剂,展开,取出,晾干;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的紫红色斑点;

[0032] (2) 山银花或金银花的鉴别

[0033] 取样量:口服液 10ml;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

[0034] 口服液直接用于按下述步骤进行;其他剂型先用水 10ml 溶解后,加盐酸调 PH 值,再同法操作;

[0035] 取口服液 10ml,加盐酸 2 ~ 4 滴,使溶液 PH 值为 1 ~ 2,用乙酸乙酯或三氯甲烷提取 3 次,每次 20ml,合并乙酸乙酯或三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加水 10ml,分次溶解,用氨试液调 PH 值为 7.0 ~ 7.5,加于聚酰胺柱,湿法装柱,柱长 20cm,内径 15 ~ 20mm,用氨试液调 PH 值为 7.0 ~ 7.5 的水溶液 40ml 洗脱,洗脱液蒸干,残渣加甲醇 1ml 使溶解,必要时滤过,作为供试品溶液;另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液,作为对照品溶液;

[0036] 照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取供试品溶液和对照品溶液各 $1 \sim 2 \mu\text{l}$,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 $1 : 4$ 的冰醋酸-水溶液或 $20 : 6 : 0.8$ 三氯甲烷-甲醇-甲酸溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视,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;

[0037] 或者取口服液 10ml ,加于 $30 \sim 60$ 目,内径 0.9cm 聚酰胺柱上,用水 50ml 洗脱,弃去洗脱液,再用 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 2ml 使溶解,作为供试品溶液;另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液,作为对照品溶液;

[0038] 照中国药典 2005 年版一部附录 VI B 薄层色谱法检验,吸取上述两种溶液各 $0.5 \sim 1 \mu\text{l}$,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 $20 : 6 : 0.8$ 的三氯甲烷-甲醇-甲酸为展开剂展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视;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;

[0039] (3) 大黄的鉴别

[0040] 取样量:口服液 10ml ;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

[0041] 口服液直接用于按下述步骤进行;其他剂型先用水 10ml 溶解后,再加盐酸调 PH 值;

[0042] 取口服液 10ml ,加盐酸 1ml ,置水浴中加热 30min ,冷却后用乙醚提取 2 次,每次 20ml ,合并乙醚提取液挥干,残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解,作为供试品溶液;

[0043] 另取大黄对照药材 0.5g ,加甲醇 10ml ,浸渍 1h ,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10ml 使溶解,加盐酸 1ml ,同法制成对照药材溶液;再取大黄素、大黄酚对照品,加乙酸乙酯制成每 1ml 各含 1mg 的混合溶液,作为对照品溶液;

[0044] 照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取上述三种溶液各 $5 \mu\text{l}$,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 $15 : 5 : 1$ 的 $30 \sim 60^\circ\text{C}$ 石油醚-甲酸乙酯-甲酸的上层溶液为展开剂展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视;供试品色谱中,在与对照药材、对照品色谱相应的位置上,显相同的五个橙黄色荧光斑点;置氨气中熏,斑点变为红色;

[0045] (4) 羌活的鉴别

[0046] 取样量:口服液 10ml ;或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

[0047] 口服液直接用于按下述步骤进行;其他剂型先用水 10ml 溶解后,再用乙酸乙酯提取;

[0048] 取口服液 10ml ,用乙酸乙酯或 $60 \sim 90^\circ\text{C}$ 石油醚提取 4 次,每次 10ml ,合并乙酸乙酯或 $60 \sim 90^\circ\text{C}$ 石油醚提取液,蒸干,残渣加乙醇 1ml 使溶解,作为供试品溶液;另取羌活对照药材 1g ,加乙醇 30ml ,浸渍 1h ,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1ml 使溶解,作为对照药材溶液;

[0049] 照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取供试品溶液和对照药材溶液各 $5 \sim 8 \mu\text{l}$,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 $10 : 2 : 3$ 的乙酸乙酯-甲醇-水的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点;

[0050] 或 $2 : 1 : 1$ 的正己烷-苯-乙酸乙酯混合溶剂为展开剂;或 $4 : 1$ 的正己烷-乙酸乙酯混合溶剂为展开剂;展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视,供试品色谱中,在

与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;

[0051] B. 对含有的成分按照中国药典 2005 年版一部附录 VID 高效液相色谱法进行含量测定的步骤

[0052] 1、大黄中大黄素与大黄酚总含量的测定方法

[0053] (1) 色谱条件与系统适用性试验

[0054] 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;85 : 15 的甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相;检测波长 254nm;理论板数按大黄素、大黄酚峰计算均不得低于4000;

[0055] (2) 对照品溶液的制备

[0056] 精密称取大黄素、大黄酚对照品适量,加流动相制成每 1ml 含大黄素 30 μg、含大黄酚 50 μg 的混合对照品溶液,备用;

[0057] (3) 供试品溶液的制备

[0058] 精密吸取本品 5ml,加盐酸 1ml,氯仿 30ml,加热回流 30min,放冷,分取氯仿层,水层用氯仿强力振摇提取 3 次,每次 30ml,合并氯仿提取液,水浴蒸干,残渣加流动相使溶解,定容至 10ml 量瓶中,摇匀,滤过,备用;

[0059] (4) 测定法

[0060] 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μl,注入液相色谱仪,测定,即得;

[0061] 本品每 1ml 含大黄以大黄素 ($C_{15}H_{10}O_5$) 与 大黄酚 ($C_{15}H_{10}O_4$) 之和计,不得少于 0.1mg;

[0062] 2、绿原酸的含量测定方法

[0063] (1) 色谱条件与系统适用性试验

[0064] 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;15 : 85 的甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相;检测波长 324nm;理论板数按绿原酸峰计算,不得低于 3000;

[0065] (2) 对照品溶液的制备

[0066] 精密称取绿原酸对照品适量,加 50% 甲醇制成每 1ml 含 20 μg 的对照品溶液,10℃ 以下保存;

[0067] (3) 供试品溶液的制备

[0068] 精密吸取本品 1ml,置 50ml 棕色量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,备用;

[0069] (4) 测定法

[0070] 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μl,注入液相色谱仪,测定,即得。

[0071] 本品每 1ml 含绿原酸 ($C_{16}H_{18}O_9$) 不得少于 0.6mg。

[0072] 4. 按照权利要求 1 或 2 所述的中药复方大青叶制剂的应用,其特征是在制备治疗感冒、流感、腮腺炎、急性病毒性肝炎药物制剂中的应用。

[0073] 为有效控制产品质量,我们建立了新的复方大青叶制剂的质量控制方法,该方法首先降低了制剂的含糖量,并采用薄层色谱法对其中的成分进行鉴别,采用高效液相色谱法对其中的成分进行含量测定。

[0074] 截止目前,尚未发现对该产品质量标准进行全面研究的报道,仅有个别研究者对其中的绿原酸或大黄作过单独研究。

[0075] 本发明的优点是:

[0076] 1. 制法中减少蔗糖含量,由 46%减少到 15%,既节约资源,降低生产成本,又符合

现代人健康生活要求。

[0077] 2. 该质量控制方法全面,精密度、灵敏度、稳定性均好,而且方法更简捷,能保证产品质量稳定可控。

[0078] 3. 功能主治与用法、用量等同现有技术,便于推广应用。

[0079] 以上复方大青叶配方组成是按重量配比的,大规模生产可以以公斤为单位,或以吨为单位。

[0080] 以上组成可制成药物制剂 1000 剂,所述 1000 剂指,制成的成品药物制剂,如制成液体制剂 1000ml,胶囊制剂或丸剂 1000 粒,片剂 1000 片,颗粒剂 1000g 等,

附图说明

[0081] 图 1 是实施例 1 的大黄素对照品面积归一化高效液相图谱;

[0082] 图 2 是实施例 1 的大黄酚对照品面积归一化高效液相图谱;

[0083] 图 3 是实施例 1 的大黄素标准曲线;

[0084] 图 4 是实施例 1 的大黄酚标准曲线;

[0085] 图 5 是实施例 1 的阴性对照试验 - 大黄素、大黄酚对照品高效液相色谱图;

[0086] 图 6 是实施例 1 的阴性对照试验 - 阴性样品全程高效液相色谱图;

[0087] 图 7 是实施例 1 的阴性对照试验 - 大黄药材全程高效液相色谱图;

[0088] 图 8 是实施例 1 的阴性对照试验 - 样品全程高效液相色谱图;

[0089] 图 9 是实施例 1 的阴性对照试验 - 绿原酸对照品高效液相色谱图;

[0090] 图 10 是实施例 1 的阴性对照试验 - 阴性样品高效液相色谱图;

[0091] 图 11 是实施例 1 的阴性对照试验 - 样品高效液相色谱图;

[0092] 图 12 是实施例 1 绿原酸对照品标准曲线。

具体实施方式

[0093] 以下结合附图和实例对本发明进一步阐述。

[0094] 图 1 中,对照品:大黄素对照品购自中国药品生物制品检定所,包装 20mg,批号:110756-200110)。面积归一化法测定,本品纯度为 100%。

[0095] 图 2 中,对照品:大黄酚对照品购自中国药品生物制品检定所,包装 20mg,批号:110796-200110)。面积归一化法测定,本品纯度为 100%。

[0096] 图 3、图 4 分别为大黄素、大黄酚的标准曲线。纵坐标为峰面积横坐标为进样量,结果显示大黄素在 $0.340\mu\text{g} \sim 1.700\mu\text{g}$ 范围内,大黄酚在 $0.380\mu\text{g} \sim 1.900\mu\text{g}$ 范围内,峰面积值与进样量有良好的线性关系。

[0097] 图 5 是阴性对照试验 - 大黄素、大黄酚对照品高效液相色谱图;

[0098] 图 6 是除去大黄药材的阴性样品全程高效液相色谱图

[0099] 图 7 是大黄药材全程高效液相色谱图;

[0100] 图 8 是样品全程高效液相色谱图;

[0101] 图 9 是绿原酸对照品高效液相色谱图;

[0102] 图 10 是不含山银花的阴性样品高效液相色谱图;

[0103] 图 11 是样品高效液相色谱图;

[0104] 图 12 是绿原酸的标准曲线。纵坐标为峰面积,横坐标为进样量,结果显示绿原酸在 $0.20\mu\text{g} \sim 0.80\mu\text{g}$ 范围内,峰面积值与进样量有良好的线性关系。

[0105] 实施例 1

[0106] (1) 主药配制

[0107] 主药配比:大青叶 360g,山银花 180g,羌活 100g,拳参 90g,大黄 100g。

[0108] 以上诸味药材,加常规量水煎煮两次,每次 1h;合并煎煮液,滤过,滤液浓缩至 60°C 时相对密度 $1.08 \sim 1.32$;加乙醇使含醇量达 $50 \sim 60\%$,静置,滤过,滤液回收乙醇并浓缩至 60°C 时相对密度 $1.17 \sim 1.43$ 的清膏,备用;

[0109] (2) 制备口服液

[0110] 向上步清膏加 $2 \sim 3$ 倍水,搅匀,冷藏 $\geq 12\text{h}$,滤过,滤液加热煮沸 0.5h ,待温度降至 60°C 时,加入防腐剂,冷藏 $\geq 12\text{h}$,滤过;添加矫味剂及糖浆,搅匀,制得药物原液,备用;

[0111] 添加剂的重量配比是:主药总量:防腐剂:甜味剂 = $1 : 0.003 \sim 0.004 : 0.14 \sim 0.16$;

[0112] 甜味剂中,蔗糖:非营养性或低热值矫味剂 = $1 : 0.04 \sim 0.05$,

[0113] 非营养性或低热值矫味剂从木糖醇,赤藓糖醇,甘草酸,甜蜜素或甜菊苷中选择;

[0114] 配量蔗糖加水煮沸制成糖浆,再加入非营养性或低热值矫味剂使溶解,与药物原液合并,搅匀;加水至总体积 1000 份,按药品规格灌装,灭菌,即得;

[0115] (3) 内容物的鉴别和含有成分的含量测定:

[0116] A1. 内容物的鉴别的步骤

[0117] (1) 大青叶的鉴别

[0118] 取口服液 10ml,用乙酸乙酯或三氯甲烷提取 2 次,每次 10ml,合并乙酸乙酯或三氯甲烷提取液,用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次,每次 10ml,乙酸乙酯或三氯甲烷液置水浴上蒸干,残渣加乙酸乙酯或三氯甲烷 1ml 使溶解,作为供试品溶液;另取靛玉红对照品,加乙酸乙酯或三氯甲烷制成每 1ml 含 0.05mg 的溶液,作为对照品溶液;

[0119] 照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取供试品溶液 $5 \sim 10\mu\text{l}$,对照品溶液 $5\mu\text{l}$,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 $5 : 4 : 1$ 的甲苯-乙酸乙酯-丙酮的混合液为展开剂,展开,取出,晾干;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的紫红色斑点;

[0120] (2) 山银花的鉴别

[0121] 取口服液 10ml,加盐酸 $2 \sim 4$ 滴,使溶液 PH 值为 $1 \sim 2$,用乙酸乙酯或三氯甲烷提取 3 次,每次 20ml,合并乙酸乙酯或三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加水 10ml,分次溶解,用氨试液调 PH 值为 $7.0 \sim 7.5$,加于聚酰胺柱,湿法装柱,柱长 20cm,内径 $15 \sim 20\text{mm}$,用氨试液调 PH 值为 $7.0 \sim 7.5$ 的水溶液 40ml 洗脱,洗脱液蒸干,残渣加甲醇 1ml 使溶解,必要时滤过,作为供试品溶液;另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液,作为对照品溶液;

[0122] 照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验,吸取供试品溶液和对照品溶液各 $1 \sim 2\mu\text{l}$,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以 $1 : 4$ 的冰醋酸-水溶液或 $20 : 6 : 0.8$ 三氯甲烷-甲醇-甲酸溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视,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;

[0123] 或者取本品 10ml, 加于聚酰胺柱 (30 ~ 60 目, 3g, 内径 0.9cm) 上, 用水 50ml 洗脱, 弃去洗脱液, 再用 50% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇 2ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取绿原酸对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 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) 检验, 吸取上述两种溶液各 0.5 ~ 1 μ l, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以三氯甲烷 - 甲醇 - 甲酸 (20 : 6 : 0.8) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365nm) 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。

[0124] (3) 大黄的鉴别

[0125] 取样量: 口服液 10ml; 或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

[0126] 口服液直接用于按下述步骤进行; 其他剂型先用水 10ml 溶解后, 再加盐酸调 PH 值。

[0127] 取口服液 10ml, 加盐酸 1ml, 置水浴中加热 30min, 冷却后用乙醚提取 2 次, 每次 20ml, 合并乙醚提取液, 挥干, 残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解, 作为供试品溶液;

[0128] 另取大黄对照药材 0.5g, 加甲醇 10ml, 浸渍 1h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10ml 使溶解, 加盐酸 1ml, 同法制成对照药材溶液; 再取大黄素、大黄酚对照品, 加乙酸乙酯制成每 1ml 各含 1mg 的混合溶液, 作为对照品溶液;

[0129] 照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验, 吸取上述三种溶液各 5 μ l, 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 15 : 5 : 1 的 30 ~ 60℃ 石油醚 - 甲酸乙酯 - 甲酸的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置 365nm 紫外光灯下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材、对照品色谱相应的位置上, 显相同的五个橙黄色荧光斑点; 置氨气中熏, 斑点变为红色;

[0130] (4) 羌活的鉴别

[0131] 取样量: 口服液 10ml; 或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

[0132] 口服液直接用于按下述步骤进行; 其他剂型先用水 10ml 溶解后, 再用乙酸乙酯提取。

[0133] 取口服液 10ml, 用乙酸乙酯或 60 ~ 90℃ 石油醚提取 4 次, 每次 10ml, 合并乙酸乙酯或 60 ~ 90℃ 石油醚提取液, 蒸干, 残渣加乙醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液; 另取羌活对照药材 1g, 加乙醇 30ml, 浸渍 1h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1ml 使溶解, 作为对照药材溶液;

[0134] 照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 薄层色谱法检验, 吸取供试品溶液和对照药材溶液各 5 ~ 8 μ l, 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 10 : 2 : 3 的乙酸乙酯 - 甲醇 - 水的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置 365nm 紫外光灯下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点;

[0135] 或用 2 : 1 : 1 的正己烷 - 苯 - 乙酸乙酯混合溶剂为展开剂; 或用 4 : 1 的正己烷 - 乙酸乙酯混合溶剂为展开剂; 展开, 取出, 晾干, 置 365nm 紫外光灯下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点;

[0136] 或 A2. 内容物鉴别步骤的筛选

[0137] (1) 大青叶的鉴别

[0138] 方法 1

[0139] 供试品溶液的制备取口服液 10ml, 用乙酸乙酯提取 2 次, 每次 10ml, 合并乙酸乙酯提取液, 用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次, 每次 10ml, 乙酸乙酯液置水浴上蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解, 作为供试品溶液;

[0140] 对照品溶液的制备取靛玉红对照品, 加乙酸乙酯制成每 1ml 含 0.05mg 的溶液, 作为对照品溶液。

[0141] 阴性溶液的制备将处方中的大青叶除去, 其他四味按实施例 1 中的制法项进行制备阴性对照样品; 然后照供试品溶液的制备方法同法制备。

[0142] 展开剂: 甲苯 - 乙酸乙酯 - 丙酮 (5 : 4 : 1)

[0143] 显色与检视不需要显色剂, 晾干日光下检视。

[0144] 结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的紫红色斑点, 阴性对照无干扰。

[0145] 方法 2

[0146] 供试品溶液的制备取口服液 10ml, 用三氯甲烷提取 2 次, 每次 10ml, 合并三氯甲烷提取液, 用 1% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次, 每次 10ml, 三氯甲烷液置水浴上蒸干, 残渣加三氯甲烷 1ml 使溶解, 作为供试品溶液;

[0147] 对照品溶液的制备取靛玉红对照品, 加三氯甲烷制成每 1ml 含 0.05mg 的溶液, 作为对照品溶液。

[0148] 其他操作同方法 1

[0149] 结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的紫红色斑点, 阴性对照无干扰。

[0150] (2) 山银花或金银花的鉴别

[0151] 方法 1

[0152] 供试品溶液的制备取口服液 10ml, 加盐酸 2 ~ 4 滴, 使溶液 PH 值为 1-2, 用乙酸乙酯提取 3 次, 每次 20ml, 合并乙酸乙酯液蒸干, 残渣加水 10ml, 分次溶解, 用氨试液调 PH 值为 7.0 ~ 7.5, 加于聚酰胺柱 (湿法装柱, 柱长 20cm, 内径 15-20mm) 上, 用以氨试液调 PH 值为 7.0 ~ 7.5 的水溶液 40ml 洗脱, 洗脱液蒸干, 残渣加甲醇 1ml 使溶解 (必要时滤过), 作为供试品溶液。

[0153] 对照品溶液的制备取绿原酸对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。

[0154] 阴性溶液的制备将处方中的山银花除去, 其他四味按实施例 1 中的制法项进行制备阴性对照样品; 然后照供试品溶液的制备方法同法制备。

[0155] 展开剂: 冰醋酸 - 水溶液 (1 : 4)

[0156] 显色与检视不需要显色剂, 晾干, 紫外灯 (365nm) 下检视; 放置 2 小时后观察, 效果更佳。

[0157] 结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

[0158] 方法 2

[0159] 供试品溶液的制备取口服液 10ml, 加盐酸 2 ~ 4 滴, 使溶液 PH 值为 1-2, 用三氯甲烷提取 3 次, 每次 20ml, 三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加水 10ml, 分次溶解, 用氨试液调 PH 值为

7.0 ~ 7.5, 加于聚酰胺柱 (湿法装柱, 柱长 20cm, 内径 15-20mm) 上, 用以氨试液调 PH 值为 7.0 ~ 7.5 的水溶液 40ml 洗脱, 洗脱液蒸干, 残渣加甲醇 1ml 使溶解 (必要时滤过), 作为供试品溶液。

[0160] 其他操作同方法 1.

[0161] 结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

[0162] 方法 3

[0163] 供试品溶液的制备取口服液 10ml, 加于聚酰胺柱 (30 ~ 60 目, 3g, 内径 0.9cm) 上, 用水 50ml 洗脱, 弃去洗脱液, 再用 50% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇 2ml 使溶解, 作为供试品溶液。

[0164] 对照品溶液的制备另取绿原酸对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 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 VI B) 试验, 吸取上述两种溶液各 0.5 ~ 1 μ l, 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以三氯甲烷 - 甲醇 - 甲酸 (20 : 6 : 0.8) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365nm) 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。

[0165] 展开剂: 三氯甲烷 - 甲醇 - 甲酸 (20 : 6 : 0.8)。

[0166] 其他操作同方法 1.

[0167] 结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

[0168] (3) 大黄的鉴别

[0169] 供试品溶液的制备取样量: 口服液 10ml; 或相应生药量的颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂;

[0170] 口服液直接用于按下述步骤进行; 其他剂型先用水 10ml 溶解后, 再加盐酸调 PH 值。

[0171] 取本品 10ml, 加盐酸 1ml, 置水浴中加热 30min 冷却后用乙醚提取 2 次, 每次 20ml, 合并乙醚液挥干, 残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。

[0172] 对照药材溶液的制备取大黄对照药材 0.5g, 加甲醇 10ml, 浸渍 1h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10ml 使溶解, 加盐酸 1ml, 同供试品溶液制备法制成对照药材溶液。

[0173] 对照品溶液的制备取大黄素对照品、大黄酚对照品, 加乙酸乙酯制成每 1ml 各含 1mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。

[0174] 阴性溶液的制备将处方中的大黄除去, 其他四味按质量标准中的制法项进行制备阴性对照样品; 然后照供试品溶液的制备方法同法制备。

[0175] 展开剂石油醚 (30 ~ 60°C) - 甲酸乙酯 - 甲酸 (15 : 5 : 1) 的上层溶液

[0176] 显色与检视不需要显色剂, 晾干, 紫外灯 (365nm) 下检视; 置氨气中熏后日光下检视。

[0177] 结果供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的五个橙黄色荧光斑, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的橙黄色荧光斑点; 置氨气中熏, 斑点变为红色。阴性对照无干扰。

[0178] (4) 羌活的鉴别

[0179] 方法 1

[0180] 供试品溶液的制备取本品 10ml, 用乙酸乙酯提取 4 次, 每次 10ml, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加乙醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。

[0181] 对照药材溶液的制备取羌活对照药材 1g, 加乙醇 30ml, 浸渍 1 小时, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1ml 使溶解, 作为对照药材溶液。

[0182] 阴性溶液的制备将处方中的羌活除去, 其他四味按质量标准中的制法项进行制备阴性对照样品; 然后照供试品溶液的制备方法同法制备。

[0183] 展开剂乙酸乙酯-甲醇-水 (10 : 2 : 3) 的上层溶液。

[0184] 显色与检视不需要显色剂, 晾干, 紫外灯 (365nm) 下检视。

[0185] 结果供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同的荧光斑点。阴性对照无干扰。

[0186] 方法 2

[0187] 供试品溶液的制备取本品 10ml, 用 60 ~ 90℃ 石油醚提取 4 次, 每次 10ml, 合并 60 ~ 90℃ 石油醚液, 蒸干, 残渣加乙醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。

[0188] 其他操作同方法 1。

[0189] 结果供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上显相同的荧光斑点。阴性对照无干扰。

[0190] B1. 对含有的成分进行含量测定的步骤

[0191] 1、大黄中大黄素与大黄酚总含量的测定

[0192] (1) 仪器与试药

[0193] 仪器: 美国戴安高效液相色谱仪, CREATE 科瑞 Venus-C₁₈-5μ 色谱柱 P680 泵 UVD170 紫外检测器 CHROMELEON 数据处理软件 Startorius BP211D 电子分析天平 d = 0.01mg

[0194] 试剂: 甲醇为色谱纯水为重蒸水其余试剂均为分析纯

[0195] 对照品: 大黄素对照品购自中国药品生物制品检定所, 包装 20mg, 批号 110756 ~ 200110;

[0196] (2) 测定方法

[0197] 照高效液相色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VID) 测定。

[0198] 色谱条件与系统适用性试验用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (85 : 15) 为流动相; 检测波长 254nm。理论板数按大黄素、大黄酚峰计算均应不得低于 4000。

[0199] 对照品溶液的制备精密称取大黄素、大黄酚对照品适量, 加流动相制成每 1ml 含大黄素 30μg、含大黄酚 50μg 的混合对照品溶液。

[0200] 供试品溶液的制备精密吸取本品 5ml, 加盐酸 1ml, 氯仿 30ml, 加热回流 30min, 放冷, 分取氯仿层, 水层用氯仿强力振摇提取 3 次, 每次 30ml, 合并氯仿液, 水浴蒸干, 残渣加流动相使溶解, 定容至 10ml 量瓶中, 摇匀, 滤过, 即得。

[0201] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20μl, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

[0202] 本品每 1ml 含大黄以大黄素 (C₁₅H₁₀O₅) 与大黄酚 (C₁₅H₁₀O₄) 之和计, 不得少于

0.1mg。

[0203] 2、绿原酸的含量测定：

[0204] (1) 仪器与试药

[0205] 仪器：美国戴安高效液相色谱仪，CREATE 科瑞 Venus-C₁₈-5 μ 色谱柱 P680 泵 UVD170 紫外检测器 CHROMELEO 数据处理软件 Startorius BP211D 电子分析天平 d = 0.01mg

[0206] 试剂：甲醇为色谱纯水为重蒸水其余试剂均为分析纯

[0207] 对照品：绿原酸购自中国药品生物制品检定所，包装 20mg 批号 110753~200413

[0208] (2) 测定方法

[0209] 照高效液相色谱法中国药典2005年版一部附录ID)测定。

[0210] 色谱条件与系统适用性试验用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；甲醇-0.4%磷酸溶液(15：85)为流动相；检测波长324nm。理论板数按绿原酸峰计算，应不得低于3000。

[0211] 对照品溶液的制备精密称取绿原酸对照品适量，加 50% 甲醇制成每 1ml 含 20 μ g 的对照品溶液(10℃以下保存)。

[0212] 供试品溶液的制备精密吸取本品 1ml，置 50ml 棕色量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

[0213] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μ l，注入液相色谱仪，测定，即得。

[0214] 本品每 1ml 含绿原酸(C₁₆H₁₈O₉)不得少于 0.6mg。

[0215] 本发明的方法是经过筛选得到的，筛选过程说明如下：

[0216] B2 大黄素与大黄酚总含量及绿原酸含量测定方法的筛选

[0217] (1) 仪器与试药

[0218] 仪器：美国戴安高效液相色谱仪，CREATE 科瑞 Venus-C₁₈-5 μ 色谱柱 P680 泵 UVD170 紫外检测器 CHROMELEO 数据处理软件 startorius BP211D 电子分析天平 d = 0.01mg

[0219] 试剂：甲醇为色谱纯水为重蒸水其余试剂均为分析纯。

[0220] 对照品：大黄素对照品（中国药品生物制品检定所，20mg，110756～200110）。归一化法测定，本品纯度为 100%。（参见附图 1）

[0221] 大黄酚对照品（中国药品生物制品检定所，20mg，110796～200412）。归一化法测定，本品纯度为 100%。（参见附图 2）

[0222] (2) 色谱条件的选择

[0223] 1) 检测波长的确定：根据《中国药典》2005 版一部 17 页大黄药材含量测定项下的规定，确定检测波长为：254nm。

[0224] 2) 流动相的选择：采用美国戴安高效液相色谱仪，P680 泵 UVD170 紫外检测器，流速 1ml/min。流动相曾试用以下几个系统：

[0225] 甲醇-0.1%磷酸溶液(85：15)

[0226] 结果：大黄素保留时间为 10.0min，大黄酚保留时间为 15.6min，对照品及样品峰形良好；

[0227] 甲醇-水 (92 : 8)

[0228] 结果 :大黄素保留时间为 4.4min, 大黄酚保留时间为 5.9min, 对照品及样品均出现拖尾, 峰形评价一般。

[0229] 通过以上试验结果可知:用甲醇-0.1%磷酸溶液 (85 : 15) 系统时对照品及样品峰形良好, 故选择流动相为:甲醇-0.1%磷酸溶液 (85 : 15)。

[0230] (3) 提取条件的选择

[0231] 1) 提取方法的选择:吸取 060302 批样品, 分别照以下方法进行提取:

[0232] 方法一:精密吸取本品 5ml, 加乙醇 50ml 回流提取 30min, 倾取乙醇液, 水浴蒸干, 残渣加水 10ml 使溶解, 加盐酸 1ml, 水浴温浸 (80℃) 30min, 放冷, 用乙醚萃取 3 次, 每次 30ml, 合并乙醚液, 水浴蒸干, 残渣加流动相使溶解定容至 10ml 量瓶中, 摇匀, 滤过, 即得。

[0233] 方法二:精密吸取本品 5ml, 加盐酸 1ml, 氯仿 30ml, 加热回流 30min, 放冷, 分取氯仿层, 水层用氯仿强力振摇提取 3 次, 每次 30ml, 合并氯仿液, 水浴蒸干, 残渣加流动相使溶解, 定容至 10ml 量瓶中, 摇匀, 滤过, 即得。

[0234] 方法三:精密吸取本品 5ml, 加盐酸 1ml, 用乙醚强力振摇提取 3 次, 每次 50ml, 合并乙醚液, 水浴蒸干, 残渣加流动相使溶解, 定容至 10ml 量瓶中, 摇匀, 滤过, 即得。

[0235] 分别吸取以上样品液各 20 μ l 注入液相色谱仪测其含量, 结果见下表:

[0236] 表-1 提取方法选择结果表

[0237]

提取方法	方法一	方法二	方法三
大黄素含量 (mg/10ml)	0.43	0.56	0.49
大黄酚含量 (mg/10ml)	0.78	0.97	0.69
总含量 (mg/10ml)	1.21	1.53	1.18

[0238] 结果表明:以方法二提取样品时总含量最高, 故选方法二为提取方法, 但对方法中各步骤仍需进一步细化与优选。

[0239] 2) 水解时间的选择:大黄中的活性成分主要为蒽醌类, 常以甙的形式存在, 甙类化合物易在酸性条件下加热可水解成甙元, 为考察大黄中甙类水解是否完全, 取 060301 批样品三份, 分别将水解时间定为 20min、30min、40min, 其余操作不变, 制备供试液。分别将供试液注入液相色谱仪测其含量, 结果下表。

[0240] 表-2 提取时间选择结果表

水解时间	20 min	30 min	40 min
[0241] 大黄素含量 (mg/10ml)	0.54	0.64	0.64
大黄酚含量 (mg/10ml)	1.03	1.09	1.10
总含量 (mg/10ml)	1.57	1.73	1.74

[0242] 结果表明:样品水解 30min 已水解完全, 有效成分在 30min 后无明显变化, 故将样品的水解时间定为 30min。

[0243] 3) 提取次数的选择:提取次数是影响提取效果的主要因素之一, 为最大程度的提取有效成分, 同时节约试剂, 本试验对提取次数进行了优选。取 060301 批样品三份, 分别将

水解放冷倾取氯仿后的水液提取 2 次,3 次,4 次,其余操作不变,制备供试液。分别将供试液注入液相色谱仪测其含量,结果下表。

[0244] 表 -3 提取次数选择结果表

[0245]	提取次数	2 次	3 次	4 次
	大黄素含量 (mg/10ml)	0.50	0.63	0.63
	大黄酚含量 (mg/10ml)	0.93	1.08	1.08
	总含量 (mg/10ml)	1.43	1.71	1.71

[0246] 结果表明 :样品提取 3 次时,有效成分已提取完全,故确定提取次数为三次。

[0247] (4) 线性范围考察 :取大黄素、大黄酚对照品适量,精密称定,加流动相制成每 1ml 含大黄素 85 μ g、大黄酚 95 μ g 的混合对照溶液,分别精密吸取 20 μ l、15 μ l、10 μ l、8 μ l、4 μ l 进样,测定其峰面积。结果见表 4、表 -5。

[0248] 表 -4 大黄素对照品测定结果

[0249]	进样体积(μl)	20	15	10	8	4
	进样量(μg)	1.700	1.275	0.850	0.680	0.340
	峰面积	86.228	64.376	41.771	34.203	17.356

表-5 大黄酚对照品测定结果

[0250]	进样体积(μl)	20	15	10	8	4
	进样量(μg)	1.900	1.425	0.950	0.760	0.380
	峰面积	138.133	102.173	69.763	54.514	28.308

[0251] 以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行回归,得标准曲线方程。得大黄素标准曲线方程为 : $Y = 50.797X - 0.4352$ ($r = 0.9998$), 大黄酚标准曲线方程为 : $Y = 72.116X + 0.4771$ ($r = 0.9998$) 以上结果表明大黄素在 0.340 μ g ~ 1.700 μ g 范围内,大黄酚在 0.380 μ g ~ 1.900 μ g 范围内,峰面积值与进样量有良好的线性关系参见附图-3、图 -4)。

[0252] (5) 阴性对照试验 :取不含大黄的阴性试制样品 5ml,同“供试品溶液制备”项下,同法处理后,制得阴性对照液,分别取对照品溶液、阴性对照液、大黄药材溶液、复方大青叶合剂供试品溶液各进 20 μ l,记录色谱图。

[0253] 结果表明 :在阴性对照图谱中大黄素、大黄酚峰无干扰。(参见图 -5、图 -6、图 -7、图 -8)

[0254] (6) 精密度试验 :吸取对照品溶液 (大黄素 22.8 μ g/ml、大黄酚 50.8 μ g/ml) 和 060302 批同一样品供试液分别重复进样 6 次,每次各 20 μ l,分别计算两者峰面积的 RSD,结果见表 -6、表 -7。

[0255] 表 -6 对照品精密度试验结果

[0256]

编号	大黄素峰面积	RSD%	大黄酚峰面积	RSD%
1	23.252	0.45	74.784	0.39
2	23.226		74.808	
3	23.488		75.316	
4	23.452		75.489	
5	23.396		75.302	
6	23.376		75.238	

[0257] 表 -7 供试品精密度试验结果

[0258]

编号	大黄素峰面积	RSD%	大黄酚峰面积	RSD%
1	28.937	0.63	71.444	0.41
2	28.859		71.451	
3	28.955		70.803	
4	29.188		71.602	
5	28.915		71.447	
6	28.617		71.555	

[0259] 结果表明 :对照品大黄素峰面积 RSD 为 0. 45％,大黄酚峰面积 RSD 为 0. 39％,供试品大黄素峰面积 RSD 为 0. 63％,大黄酚峰面积 RSD 为 0. 41％,对照品及供试品的精密度良好。

[0260] (7) 重现性试验 :取 060303 批的样品 5 份,分别按供试品制备项下制备、测定结果,总含量见表-8。

[0261] 表 -8 重现性试验结果

	编号	取样量 (ml)	总含量 (mg/10ml)	平均总含量 (mg/10ml)	RSD (%)
[0262]	1	5	1.75	1.74	0.70
	2	5	1.74		
	3	5	1.75		
	4	5	1.72		
	5	5	1.74		

[0263] 结果表明 :5 份供试品的平均含量为1. 74mg/10ml,RSD为 0. 70％,试验方法的重现性良好。

[0264] (8) 稳定试验 :取同一份供试品溶液,分别于0 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时,进样。结果见表-9、表 -10。

[0265] 表 -9 大黄素稳定性试验结果

[0266]

测定时间	大黄素峰面积	大黄素平均峰面积	RSD (%)
0 小时	32.148	31.902	1.16
2 小时	32.099		
4 小时	31.854		
6 小时	32.137		
8 小时	31.274		

[0267] 表 -10 大黄酚稳定性试验结果

[0268]

测定时间	大黄酚峰面积	大黄酚平均峰面积	RSD (%)
0 小时	79.732	79.915	0.23
2 小时	79.782		
4 小时	79.873		
6 小时	80.011		
8 小时	80.178		

[0269] 结果表明：供试品大黄素在 8 小时内 RSD 为 1.16%，大黄酚在 8 小时内 RSD 为 0.23%，供试品溶液在8 小时内稳定性良好。

[0270] (9) 回收率试验：(采用加样回收法)精密吸取 060301批（已知大黄素含量为 0.65mg/ml 大黄酚含量为0.110mg/ml 样品 2.5ml，共称取 5 份，分别加入相同的大黄素太 黄酚对照品，测定总含量，计算回收率。回收率=（总量-样品中量）/ 加入纯品量。结果 见表 -11、表 -12。

[0271] 表 -11 大黄素回收率试验结果

[0272]

样品中大黄素总量mg	加入大黄素量mg	测得量mg	回收率%	平均回收率 %
0.163	0.166	0.330	100.6	98.9
0.163	0.166	0.326	98.2	
0.163	0.166	0.323	96.4	

[0273]

0.163	0.166	0.330	100.6
0.163	0.166	0.327	98.8

[0274] 表 -12 大黄酚回收率试验结果

[0275]

样品中大黄酚总量mg	加入大黄酚量mg	测得量mg	回收率%	平均回收率 %
0.275	0.287	0.558	98.6	
0.275	0.287	0.558	98.6	
0.275	0.287	0.555	97.6	98.1
0.275	0.287	0.556	97.9	
0.275	0.287	0.556	97.9	

[0276] 结果表明：大黄素平均回收率为 98.9%，RSD 为 1.79%，大黄酚平均回收率为 8.1%，RSD 为 0.46%，加样回收率良好。

[0277] 2、绿原酸含量测定方法的筛选

[0278] (1) 仪器

[0279] 美国戴安高效液相色谱仪，CREATE 科瑞 Venus-C₁₈-5 μ 色谱柱 P680 泵 UVD170 紫外检测器 CHROMELEON 数据处理软件 startorius BP211D 电子分析天平 d = 0.01mg

[0280] (2) 试药

[0281] 甲醇（色谱纯），磷酸（分析纯），水（重蒸馏水）；其他试剂为分析纯。

[0282] 绿原酸对照品（中国药品生物制品检定所，20mg，10753-200212）。

[0283] (3) 色谱条件及基本参数流动相：甲醇-0.4%磷酸溶液（15：85）流速：1.000ml/min；柱温：室温；检测波长：324nm。进样量：20 μ l（定量环进样）；理论板数：3000～6000。

[0284] (4) 检测波长的选择根据《中国药典》2005 版一部 405～406 页“双黄连口服液”测定项下金银花的含量测定，确定检测波长为：324nm。

[0285] (5) 阴性对照试验按处方不取金银花，模拟生产工艺制备复方大青叶合剂空白对照品。依法测定，空白对照品色谱图中，在与绿原酸对照品色谱相应位置处未见有显著的干扰峰。参见附图-9、图-10、图-11。

[0286] (6) 供试品溶液的制备精密吸取060301批复方大青叶合剂样品1ml，分别用甲醇、50%甲醇和流动相稀释并定容至50ml，分别以微孔滤膜滤过，作为供试液，注入液相色谱仪测其含量，结果见表-13。

[0287] 表-13 提取溶剂选择结果表

提取溶剂	甲醇	50%甲醇	流动相
绿原酸含量 (mg/ml)	0.7155	0.7230	0.7212

[0289] 结果表明：三提取溶剂所得样品绿原酸含量相差不大，但 50%甲醇峰形较好，所以选择 50%甲醇为提取溶剂。

[0290] (7) 线性范围的规定取绿原酸对照品适量，精密称定，加 50%甲醇制成每 1ml 含 40 μ g 的溶液，分别精密吸取 20 μ l、15 μ l、10 μ l、8 μ l、5 μ l 进样，测定其峰面积。结果见表 14，附图-12。以峰面积 (y) 对进样量 (x) 进行回归，得标准曲线方程。y = 57.496x-0.0979 (r = 0.9999)。以上结果表明在 0.20 μ g～0.80 μ g 范围内，绿原酸峰面积值与进样量有良好的线性关系。

[0291] 表-14 绿原酸对照品测定结果

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/456134014015011003>