

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.23.018

小儿健脾丸质量标准研究

向春燕¹, 况刚², 盘思颖², 李月平^{1△}

(1. 重庆市黔江食品药品检验所, 重庆 409003; 2. 重庆第二师范学院, 重庆 400067)

摘要:目的 建立小儿健脾丸的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对小儿健脾丸中陈皮进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定甘草酸的含量,色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(35:65, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 250 nm,柱温为 25℃,进样量为 10 μL。结果 陈皮的 TLC 图谱斑点清晰,专属性强,且阴性对照无干扰。甘草酸铵进样量在 0.004 9~0.036 9 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=5$),精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$),平均加样回收率为 97.83%, RSD 为 0.94% ($n=6$);样品中甘草酸的平均含量为 0.386 7 mg/g。结论 该方法操作简便,结果准确,专属性强,稳定性和重复性均较好,可用于小儿健脾丸的质量控制。

关键词:小儿健脾丸;薄层色谱法;高效液相色谱法;陈皮;甘草酸;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)23-0062-04

Quality Standard of Xiao'er Jianpi Pills

XIANG Chunyan¹, KUANG Gang², PAN Siying², LI Yueping¹

(1. Qianjiang Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 409003; 2. Chongqing University of Education, Chongqing, China 400067)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Xiao'er Jianpi Pills. Methods Thin-layer chromatography (TLC) method was used for the qualitative identification of Citri Reticulatae Pericarpium in Xiao'er Jianpi Pills. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of glycyrrhizic acid in Xiao'er Jianpi Pills, the chromatographic column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid (35:65, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 10 μL. Results The TLC spots of Citri Reticulatae Pericarpium were clear and specific, and the negative control had no interference. The linear range of ammonium glycyrrhizinate was 0.004 9-0.036 9 μg ($r=0.999\ 9$, $n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$). The average recovery of ammonium glycyrrhizinate was 97.83% with the RSD of 0.94% ($n=6$). The average content of glycyrrhizic acid in the samples was 0.386 7 mg/g. Conclusion The method established in this study is simple, accurate, specific, stable and reproducible, which can be used for the quality control of Xiao'er Jianpi Pills.

Key words: Xiao'er Jianpi Pills; TLC; HPLC; Citri Reticulatae Pericarpium; glycyrrhizic acid; quality standard

小儿健脾丸具有健脾功效,临床广泛用于治疗脾胃虚弱引起的消化不良、体弱虚力等,全方由白术、茯苓、甘草、六神曲、南山楂、陈皮等 15 味中药材组方,方中白术、茯苓、南山楂均有健脾功效,莲子清热燥湿,陈皮理气健脾,六神曲健脾和胃、消食调中,甘草补脾益气、调和诸药^[1-2]。现行质量标准为《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十册)》(WS₃-B-3755-98),但仅收载药品性状项,茯苓、山药、甘草、南山楂、砂仁的显微鉴别项,丸剂的一般检查项,无含量测定项,质量标准的整体控制水平不全面。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对小儿健脾丸中的陈皮进行定性鉴别,并建立了测定方中甘草酸含量的高效液相色谱(HPLC)法,以进一步提高该药的质量控制水平。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Linomat 5 型薄层点样成像仪(瑞士 Camag 公司),

配有 CAMAG-Scanner3 型薄层扫描仪;HH-6 型电热恒温水浴锅(常州荣华仪器制造有限公司);JP-500C 型高速多功能粉碎机(永康市久品工贸有限公司);GZX-9076MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);MSA225S 型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司,精度为十万分之一);XPE204 型电子天平(梅特勒-托利多集团公司,精度为万分之一);Milli Direct-Q16 型(超)纯水机(美国密理博公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),配有在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、G4212B 型二极管阵列(DAD)检测器、色谱工作站;SB-800DT 型超声波提取器(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率为 800 W,频率为 40 kHz);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司,批号为 20180225)。

1.2 试剂

小儿健脾丸(T 公司,批号分别为 19010721,19010722,

第一作者:向春燕,女,大学本科,高级工程师,研究方向为药品质量标准,(电子信箱)1046041236@qq.com。

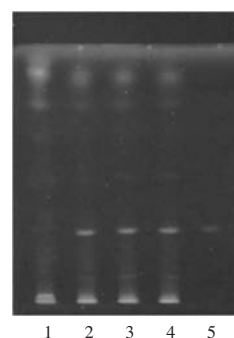
△通信作者:李月平,男,硕士,工程师,研究方向为药品检验及质量标准,(电子信箱)251696687@qq.com。

19010723);橙皮苷对照品(批号为110721-201617,含量为96.1%),甘草酸铵对照品(批号为110731-201619,含量为93.0%),均购自中国食品药品检定研究院;人参(宜宾仁和中中药饮片有限责任公司,批号为190801);白术(四川皓博药业有限公司,批号为201202);茯苓(成都仁济宏药业有限公司,批号为200201);甘草(重庆三立堂中药制药有限公司,批号为210601);陈皮(四川云毫堂药业有限公司,批号为180301);法半夏(重庆泰尔森制药有限公司,批号为200101-07);白扁豆(重庆百味珍药业有限公司,批号为200101);山药(湖南省松龄堂中药饮片有限公司,批号为200201);莲子(四川云毫堂药业有限公司,批号为190701);南山楂(梧州市毫海药业有限公司,批号为E081a1301010);六神曲(麸炒,四川辅正药业有限公司,批号为151019);炒麦芽(安徽敬道生物科技有限公司,批号为171102);玉竹(北京同仁堂<安国>有限责任公司,批号为200401);桔梗(江西和硕药业有限公司,批号为190801);砂仁(四川和顺康药业有限公司,批号为171102);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 陈皮 TLC 鉴别

取橙皮苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为0.5mg/mL的对照品溶液。取样品1g,精密称定,剪碎,加甲醇50mL,超声处理(功率为800W,频率为40kHz)45min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,作为供试品溶液。按小儿健脾丸处方和工艺制备缺陈皮的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取2μL供试品溶液和阴性对照品溶液、10μL对照品溶液,点于0.1%NaOH硅胶G板上。按2020年版《中国药典(四部)》0502项下薄层色谱法试验,以乙酸乙酯-甲醇-水溶液(100:17:10,V/V/V)为展开剂,展开13cm,取出,晾干,喷以5%AlCl₃试液,加热5min,置紫外光灯(365nm)下检视。结果供试品溶液色谱图



1. 阴性对照品溶液 2-4. 供试品溶液 5. 橙皮苷对照品溶液

图1 薄层色谱图

1. Negative reference solution 2-4. Test solution 5. Hesperidin reference solution

Fig. 1 TLC chromatograms

中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。色谱图见图1。

2.2 甘草酸含量测定

2.2.1 色谱条件^[3]

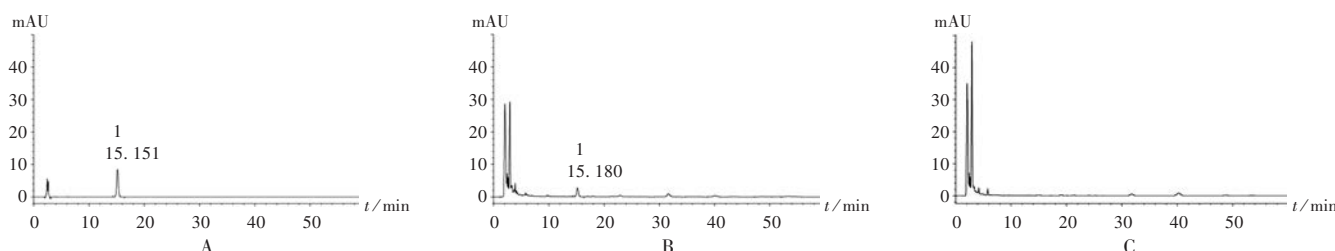
色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm),流动相:乙腈-0.2%磷酸水溶液(35:65,V/V);流速:1.0mL/min;检测波长:250nm;柱温:25℃;进样量:10μL。

2.2.2 溶液制备

取甘草酸铵对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为0.05mg/mL的对照品溶液。取样品1g,剪碎,精密称定,加甲醇25mL,超声处理(功率为800W,频率为40kHz)45min,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方工艺制备缺甘草的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,结果供试品溶液色谱图中,在与甘草酸铵对照品溶液色谱相同保留时间处有色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图2。



1. 甘草酸铵

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. ammonium glycyrrhizinate

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

线性关系考察:分别吸取2.2.2项下对照品溶液2,3,5,10,15 mL,置20 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以甘草酸铵对照品溶液进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 7\,640.2X + 0.243\,5$ ($r = 0.999\,9, n = 5$)。结果表明,甘草酸铵进样量在0.004 9~0.036 9 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限及定量限确定:精密吸取甘草酸铵对照品溶液(质量浓度为0.153 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)10 μL ,按2.2.1项下色谱条件进样测定。以信噪比(S/N)为3:1时的含量为检测限,以 S/N 为10时的含量为定量限,结果甘草酸铵的检测限和定量限分别为1.39 ng和4.64 ng。

精密度试验:精密吸取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为1.09%,表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为19010721)样品6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果的 RSD 为0.70% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为19010721)样品,依法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,2,4,6,12,24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为0.47% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为19010721)6份,精密称定,置锥形瓶中,精密量取对照品溶液(质量浓度为0.024 6 mg/mL)1 mL,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

表1 甘草酸铵加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test of ammonium glycyrrhizinate ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.075 5	0.415 5	0.024 6	0.439 7	98.37	97.83	0.94
1.059 3	0.409 2	0.024 6	0.433 5	98.78		
1.057 9	0.408 7	0.024 6	0.432 4	96.34		
1.072 2	0.414 2	0.024 6	0.438 1	97.15		
1.090 2	0.421 1	0.024 6	0.445 3	98.37		
1.081 5	0.417 8	0.024 6	0.441 9	97.97		

2.2.4 样品中甘草酸含量测定

取3批(批号分别为19010721,19010722,19010723)样品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并计算样品中甘草酸的含量(甘草酸含量 = 甘草酸铵含量/1.020 7)。结果样品中甘草酸的含量分别为0.386 3,0.386 5,

0.387 3 mg/g ,平均含量为0.386 7 mg/g 。

3 讨论

3.1 TLC 条件选择

参考2020年版《中国药典(一部)》和文献[4-16],考察了7个常见的且展开效果较好的展开系统,即乙酸乙酯-甲醇-水,甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水的上层溶液,三氯甲烷-甲醇-水在10℃以下过夜的下层溶液,乙酸乙酯-甲醇-水,醋酸乙酯-甲醇-水-浓氨溶液,乙酸乙酯-甲醇-水,醋酸乙酯-丁酮-甲酸-水,甲酸乙酯-甲醇-水,结果以乙酸乙酯-甲醇-水为展开剂时的效果最好。考察了2种展开方法:1)使用乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:13, $V/V/V$)展开,甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(20:10:1:1, $V/V/V/V$)上层溶液进行二次展开;2)乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:10, $V/V/V$)。结果一次展开时图谱更清晰,影响因素较少。考察了自制硅胶G板、市售硅胶G板和自制碱板,结果比移值均在0.2~0.8之间,展开效果较好。故TLC条件确定为于乙酸乙酯-甲醇-水溶液中一次展开,点样于0.1% NaOH 硅胶G板上。

3.2 甘草提取方法选择

考察了水浴加热回流提取和超声提取2种方法,分别精密加入30%,50%,70%,95%甲醇溶液各50 mL,回流提取和超声提取30,45,60 min。在水浴加热回流提取法中,提取率随回流时间、乙醇和甲醇浓度的增加而增加,95%甲醇回流30 min时提取效果最佳;在超声提取法中,提取率随甲醇浓度、超声时间的增加而增加,95%甲醇超声45 min时提取效果最佳。考虑回流提取比超声提取复杂,最终以95%甲醇超声提取45 min为提取方法。

3.3 HPLC 条件选择

考察了流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液的3种比例(37:63,35:65,36:64, V/V),结果目标峰均能较好分离,但流动相比比例为35:65(V/V)的分离度更好,且峰形对称,符合系统适用性试验要求。考察了不同色谱柱温度(20,25,30℃)及不同品牌色谱柱(Waters RP-C₁₈柱、Insert Sustain C₁₈柱、Agilent Zorbax C₁₈柱,规格均为250 mm×4.6 mm,5 μm)对含量测定结果的影响,结果色谱柱温度和品牌不影响含量测定结果,故最终确定2.2.1项下色谱条件。

3.4 方法评价

该方法操作简便,结果准确,专属性强,稳定性和重复性均较好,可用于小儿健脾丸的质量控制。

参考文献

- [1] 李翼,李想,曹明明,等.甘草药理作用及药对配伍比例研究进展[J].上海中医药杂志,2019,53(7):83-87.