

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.05.019

消银颗粒质量标准研究*

江静怡, 史方超, 白玲玲, 苏 华, 陆 峯[△]

(中国人民解放军东部战区总医院药剂科, 江苏 南京 210002)

摘要:目的 建立消银颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中荆芥、丹参、地黄和草薢进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定其金银花、栀子、红花和当归中总绿原酸含量,色谱柱为 Lichrospher - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈 - 0.4% 磷酸水溶液(10:90, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 327 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 薄层色谱斑点清晰,阴性对照无干扰。绿原酸质量浓度在 0.003 28~0.029 49 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 1.000\ 0, n = 5$);精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3.0%($n = 5$);平均加样回收率为 99.13%,RSD 为 2.48%($n = 9$)。结论 该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于消银颗粒的质量控制。

关键词:消银颗粒;绿原酸;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

中图分类号:R932;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)05-0082-05

Quality Standard of Xiaoyin Granules

JIANG Jingyi, SHI Fangchao, BAI Lingling, SU Hua, LU Yin

(Department of Pharmaceutical Preparation, General Hospital of Eastern Theater Command of Chinese PLA, Nanjing, Jiangsu, China 210002)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Xiaoyin Granules. **Methods** Schizonepetae Herba, Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Rehmanniae Radix, Dioscoreae Hypoglaucae Rhizoma in Xiaoyin Granules were qualitatively identified by the thin-layer chromatography (TLC) method. The content of total chlorogenic acid of Lonicerae Japonicae Flos, Gardeniae Fructus, Carthami Flos and Angelicae Sinensis Radix in Xiaoyin Granules was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the chromatographic column was Lichrospher - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.4% phosphoric acid (10 : 90, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 327 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC spots were clear, and the negative control samples had no interference. The mass concentration of chlorogenic acid showed a good linear relationship with the peak area in the range of 0.003 28 - 0.029 49 mg/mL ($R^2 = 1.000\ 0, n = 5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0% ($n = 5$), the average recovery of chlorogenic acid was 99.13% with an RSD of 2.48% ($n = 9$). **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Xiaoyin Granules.

Key words: Xiaoyin Granules; chlorogenic acid; TLC; HPLC; quality standard

银屑病是一种慢性且极易复发的皮肤疾病^[1-2],由免疫、遗传、感染等多种因素综合引起,严重时会引起代谢性疾病、消化性疾病、心血管疾病、泌尿性疾病等,或使其疾病风险性升高。中医认为,其由长期邪热入侵、热入营血、气滞、津液不能润养皮肤所致。消银颗粒是我院特色制剂[总制字(2016)F501029],具有行气活血、清热解毒功效,用于治疗进展期银屑病^[3],主要成分为荆芥、草薢、丹参、金银花、栀子等。现代药效学研究表明,绿原酸具有抗氧化、抗糖尿病、抗病毒等作用^[4-7],是金银花、栀子、红花和当归的共有成分。但前期研究中检验方法较简单,且方法适应性不好。本研究中建立了主药荆芥、草薢、丹参、地黄等的薄层色谱(TLC)法鉴别,以及测定指标性成分总绿原酸含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),配有VWD检测器;UV-2100型紫外-分光光度计(岛津仪器上海有限公司);AE240型电子分析天平(Mettler Toledo精密仪器有限公司,精度为十万分之一);FA1204S型分析天平(上海市精密仪器有限公司,精度为万分之一);CF-6A型200克密封式摇摆型粉碎机(浙江省温岭市创立药材器械厂);薄层层析硅胶G(青岛海洋化工厂)。

1.2 试药

荆芥对照药材(批号为120911-201512),丹参素钠对照品(批号为110855-201412,纯度99.5%),地黄对照药材(批号为121180-201506),草薢对照药材(批

*基金项目:全军医疗机构制剂标准提高科研专项课题[14ZJZ08]。

第一作者:江静怡,女,硕士,药师,研究方向为中药制剂,(电话)025-80860166(电子信箱)393332661@qq.com。

[△]通信作者:陆峯,男,硕士,主管药师,研究方向为医院制剂,(电子信箱)876321707@qq.com。

号为121545-201002),绿原酸对照品(批号为110753-201716,纯度为99.3%),均购于中国食品药品检定研究院;消银颗粒(医院制剂,批号分别为190523,190608,190716,190815);金银花(批号为180906),栀子(批号为180516),均购于南京鹤龄药业有限公司;红花(安徽嘉佑中药饮片厂,批号为18010);当归(安徽信和中药有限公司,批号为170701);甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);磷酸(色谱纯,上海Aladdin公司);石油醚、丁酮、乙酸乙酯等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别^[8-12]

荆芥:取样品40 g,研细,加入石油醚(60~90℃)100 mL,振摇,放置过夜,滤过,挥干,用石油醚(60~90℃)溶解至1 mL,作为供试品溶液。取荆芥对照药材0.8 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。取除荆芥外的其余药材,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取上述3种溶液,吸取15,2,15 μL,点于同一薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇(8:2:0.2, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,105℃烘约5 min至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。结果见图1 A。

丹参:取样品40 g,研细,加100 mL乙醇,加热回流2 h,滤过,滤液置蒸发皿中蒸干,加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。取丹参素钠对照品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的对照品溶液。取除丹参外的其余药材,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取上述3种溶液各3,2,3 μL,点于同一G薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸(12:1:0.8, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液-乙醇(1:6, V/V)混合溶液,105℃烘约5 min至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。结果见图1 B。

地黄:取样品40 g,研细,加100 mL乙醇,加热回流2 h,滤液置蒸发皿中蒸干,加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。取地黄对照药材1 g,加乙醇50 mL,加甲醇1 mL使溶解,作为对照药材溶液。取除地黄外的其余药材,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取上述3种溶液3,5,3 μL,点于同一薄层板上,以正己烷-丙酮-乙酸乙酯-甲酸(10:3:1:0.3, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以1%香草醛乙醇溶液-3%高氯酸水溶液(1:1, V/V, 临用现配),105℃烘约5 min至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。结果见图1 C。

草薢:取样品10 g,研细,加乙醇50 mL,加热回流1 h,滤过,滤液加盐酸5 mL,加热回流2 h,冷却,用石油醚(60~90℃)振摇提取3次,每次30 mL,合并石油醚层,蒸干,加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取草薢对照药材1 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。取除草薢外的其余药材,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别吸取上述3种溶液20,5,20 μL,分别点于同一薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(7:3, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,105℃烘约5 min至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。结果见图1 D。

2.2 含量测定^[13-16]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Lichrospher-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸水溶液(10:90, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:327 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2.2 溶液制备

取绿原酸对照品13.20 mg,精密称定,加入流动相20 mL,制成对照品贮备液;精密吸取5 mL,置100 mL

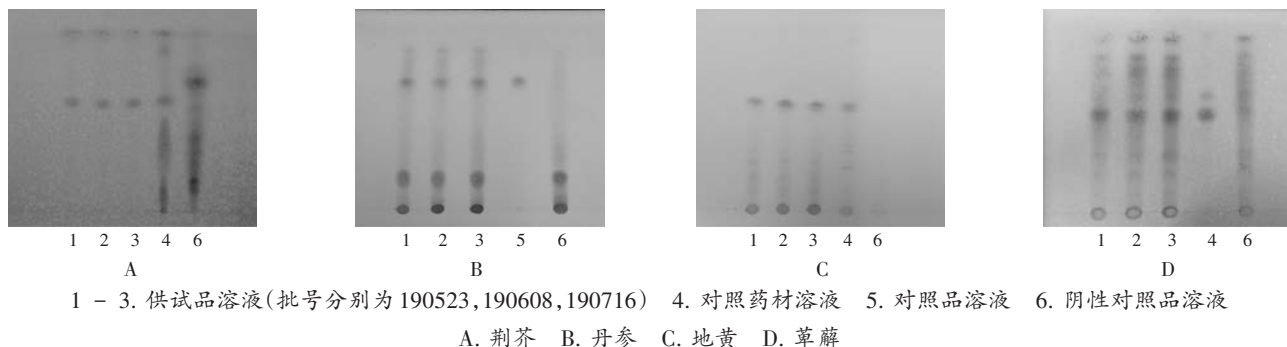


图1 薄层色谱图

1-3. Test solution (batch No.:190523,190608,190716) 4. Reference medicinal material solution 5. Reference solution 6. Negative reference solution
A. Schizonepetae Herba B. Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma C. Rehmanniae Radix D. Dioscoreae Hypoglaucae Rhizoma

Fig.1 TLC chromatograms

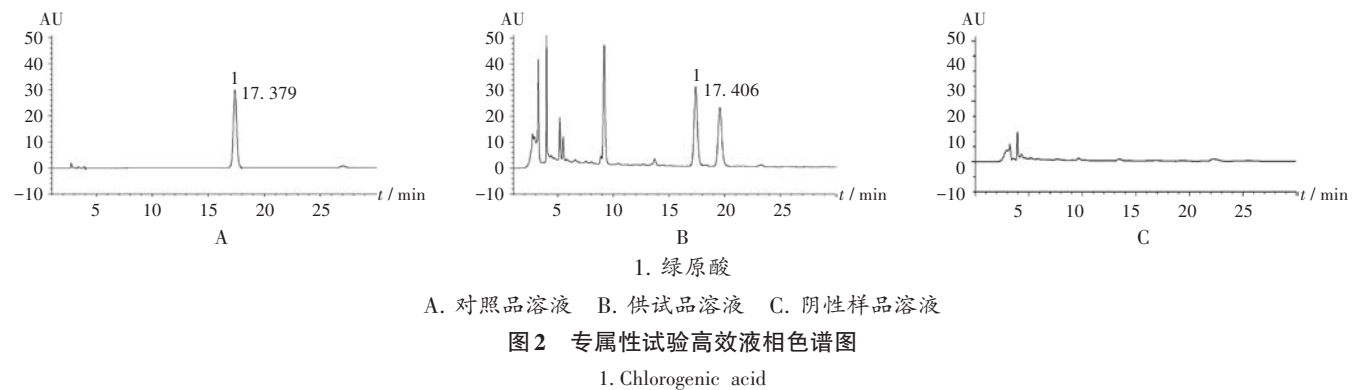


Fig.2 HPLC chromatograms of the specific test
A. Reference solution B. Test solution C. Negative sample solution

容量瓶中,加流动相稀释成每1 mL含0.033 mg的对照品溶液。取样品1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,加25 mL 50% 甲醇溶液,称定质量,30 ℃超声(功率为200 W,频率为40 kHz)1 h,冷却,称定质量,用50% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,双层滤纸滤过,即得供试品溶液。按处方工艺分别制备不含金银花、栀子、红花、当归的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.2.2项下3种溶液各10 μL,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果阴性对照品溶液色谱中,在绿原酸吸收峰处均无峰出现,表明除去4种药材后对绿原酸的测定无干扰。色谱图见图2。

线性关系考察:分别精密吸取2.2.2项下绿原酸对照品溶液1,3,5,7,9 mL,置10 mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,按2.2.1项下色谱条件进样以对照品质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 27\,955X - 0.599\,3$, $R^2 = 1.000\,0$ ($n = 5$)。结果表明绿原酸质量浓度在0.003 28 ~ 0.029 49 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:吸取2.2.2项下绿原酸对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样5次,记录峰面积。结果绿原酸峰面积的RSD为0.13% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为190523),按供试品溶液制备方法制备溶液,在常温下分别于0,1,2,4,8 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0.41% ($n = 5$),表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为190523)5份,按供试品溶液依法制备,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果绿原酸的平均含量为0.386 mg/g, RSD为2.15% ($n = 5$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为

190523)0.5 g,精密称定,共9份,分别置锥形瓶中,按低、中、高浓度分别精密加入2.2.2项下绿原酸对照品溶液4.0,5.5,7.0 mL,依法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

表1 绿原酸加样回收试验结果($n = 9$)
Tab.1 Results of the recovery test($n = 9$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.525 0	0.202 7	0.131 2	0.335 5	101.22		
0.528 3	0.203 9	0.131 2	0.337 6	101.91		
0.521 5	0.201 3	0.131 2	0.336 1	102.78		
0.491 7	0.189 8	0.180 4	0.369 5	99.61		
0.497 5	0.192 0	0.180 4	0.368 7	97.95	99.13	2.48
0.461 8	0.178 3	0.180 4	0.350 1	95.23		
0.497 6	0.192 1	0.229 6	0.416 1	97.56		
0.470 7	0.181 7	0.229 6	0.404 8	97.17		
0.499 8	0.192 3	0.229 6	0.419 0	98.74		

2.2.4 样品含量测定

取4批消银颗粒,依法制备供试品溶液,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4批样品(批号分别为190608,190716,190815,190523)中总绿原酸的含量分别为每袋3.86,3.61,4.19,3.86 mg。

3 讨论

3.1 TLC 条件优化

荆芥为方中君药,具有祛风解毒功效。原质量标准未将其纳入,现增加该药味的TLC鉴别。丹参中的含量指标性成分较多且复杂,原标准中丹参的TLC阴性存在干扰^[17],对不同成分进行考察发现,以丹参素钠为指标性成分,更换展开剂和显色条件,结果减少了点样量,且主斑点清晰,重复性好,阴性对照无干扰。原标准中地黄的TLC对照药材斑点和供试品主斑点均不清晰,调整展开剂的比例和组成,改变对照药材的提取方法,结果减少了点样量,且主斑点清晰完整,阴性对照

无干扰。原标准方法显示草薢主斑点颜色较淡,分离不清晰,且阴性对照于相应位置产生斑点,更换方法后,主斑点清晰,阴性对照无干扰。

3.2 含量测定指标选择

考察制剂的指标性成分时,君药中荆芥挥发油成分薄荷酮的含量随煎煮时间的延长而明显减少,甚至完全消失^[18-20],即使提取挥发油制粒时喷入,其含量仍有不稳定性,作为质量标准的考察指标较困难,故改为定性鉴别研究。臣药丹参主要指标性成分为丹参酮类和丹酚酸B,但丹酚酸B对照品保存条件要求高,需冷冻干燥处理,同时预试验表明其阴性对照有干扰。丹参主要功效为活血祛瘀、通经止痛,而臣药金银花为清热解毒的良药,能增强免疫力、消炎解热,主治热毒血痢、痈疽疔毒,功效强于丹参。最终采用金银花中绿原酸为指标性成分,阴性试验结果表明栀子、红花和当归药材^[21-23]中也含有绿原酸,故选择总绿原酸的含量作为HPLC法的检验指标。

3.3 波长选择

分别将单味药材金银花、栀子、红花和当归按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液,按拟订色谱条件进样测定,并将对照品溶液和对照药材溶液进行全波长扫描。结果对照药材溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处出现相应色谱峰,结合全波长扫描图,发现波形图均与绿原酸对照品溶液色谱峰吻合,与文献^[14]结果一致。按拟订色谱条件进样测定,相应保留时间处的峰均为绿原酸峰,最大吸收波长为327 nm。

3.4 提取溶剂选择

以甲醇、50%甲醇、流动相分别溶解对照品,以绿原酸峰形为考察指标,发现50%甲醇和流动相溶解的对照峰峰形较好。50%甲醇的提取率高,且操作简便,故以50%甲醇为提取溶剂。以流动相为溶剂溶解对照品溶剂峰的影响较小,故选择流动相溶解对照品。

3.5 提取条件选择

以样品含量为考察指标,分别进行超声和加热回流(30 min和60 min),结果样品含量在超声60 min时最高,提取效率最好。考察超声处理30,60,90 min时样品含量变化,超声60 min时样品基本提取完全;考察提取溶剂用量为10,25,50 mL,溶剂用量为25 mL和50 mL时能提取完全。综合考虑,最终选择50%甲醇25 mL,超声提取60 min。

3.6 色谱条件选择

参考文献^[24-25],筛选流动相,以峰分离度、峰形、阴性干扰等为考察指标,考察了不同流动相体系(0.4%磷酸水溶液-甲醇、醋酸-甲醇、磷酸-乙腈、醋酸-乙腈),结果以0.4%磷酸水溶液-乙腈为流动相时,色谱峰峰形较好;考察了不同比例乙腈-0.4%

磷酸水溶液(13:87,12:88,10:90,V/V),结果乙腈-0.4%磷酸水溶液比例为10:90(V/V)时,出峰时间、分离度等条件均较好。

参考文献

- [1] 晋红中,吴超. 银屑病的共病:研究现状与前景[J]. 实用皮肤病学杂志,2020,13(4):193-197.
- [2] 杨小娟,孟祥慧. 银屑病的治疗进展[J]. 牡丹江医学院学报,2020,41(6):120-124.
- [3] 朱雨雨,宋承霖,孙洋. 银屑病发病机制及药物调控研究进展[J]. 药科学报,2020,55(7):1393-1400.
- [4] 翟阳,高樱,赵瀚年. 绿原酸药代动力学研究进展[J]. 中华中医药杂志,2020,35(10):5095-5099.
- [5] 王庆华,杜婷婷,张智慧,等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. 药科学报,2020,55(10):2273-2280.
- [6] 张浩超,郝宝燕,孙皓熠,等. 绿原酸研究进展[J]. 食品与药品,2017,19(3):222-226.
- [7] 庞美蓉,刘零怡,高汪磊,等. 绿原酸调节糖脂代谢的作用机制研究进展[J]. 中草药,2015,46(2):305-312.
- [8] 陈萍,李娜,薛佩芸,等. 春上枝头洗发水质量控制研究[J]. 中国药业,2017,26(9):5-9.
- [9] 张慧月,赵妹,赵雪梅. 祛湿止痒洗剂的定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志,2017,37(5):903-910.
- [10] 张颖,孙菲菲,杨佳宁,等. 地黄不同炮制品薄层色谱鉴别方法的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(15):142-149.
- [11] 林壮民,龙海珊,吴洁雯,等. 妇科养坤丸的质量标准研究[J]. 中药材,2018,41(8):1933-1936.
- [12] 贺婕,张爱荣,姜建芬. 复方黄葵颗粒的薄层鉴别研究[J]. 山西医科大学学报,2017,48(3):260-262.
- [13] 肖作为,谢梦洲,甘龙,等. 山银花、金银花中绿原酸和总黄酮含量及抗氧化活性测定[J]. 中草药,2019,50(1):210-216.
- [14] 曹晓琴,吴永娟,宁海伦,等. 不同提取方法对金银花中绿原酸成分提取效果的影响[J]. 江汉大学学报(自然科学版),2019,47(4):351-356.
- [15] 李沁,杨臣,游勇基. HPLC-DAD法同时测定小儿退热合剂中绿原酸、栀子苷、黄芩苷和丹皮酚的含量[J]. 药物分析杂志,2017,37(1):153-160.
- [16] 白娟,朱倩云,白华,等. 高效液相色谱法同时测定桑叶中绿原酸及4种黄酮类成分的含量[J]. 中药新药与临床药理,2020,31(4):469-472.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:76-77.
- [18] 王凤,温桃群,桑文涛,等. 荆芥挥发油化学成分及药理作用研究现状[J]. 中南药学,2017,15(3):312-318.
- [19] 朱梅芳,唐宇,郑琴,等. 不同提取方式对连翘、荆芥、薄荷挥发油成分及抗菌活性的影响[J]. 中草药,2018,49(12):2845-2854.
- [20] 黄晓巍,刘玥欣,刘轶蕾,等. 荆芥化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药学报,2017,37(8):817-819.
- [21] 史永平,孔浩天,李昊楠,等. 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药,2019,50(2):281-289.