

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006 - 4931(2023)14 - 0077 - 05
doi:10.3969/j.issn.1006 - 4931.2023.14.017



小儿参术健脾丸质量标准提升研究

姜旭¹, 赵跃东¹, 梁娟娟¹, 杨晓宁^{1△}, 董媛媛², 孙路萍², 朱平¹

(1. 北京振东光明药物研究院有限公司, 北京 100085; 2. 山西振东五和堂制药有限公司, 山西 长治 046108)
摘要:目的 提升小儿参术健脾丸的质量标准。方法 对制剂中茯苓、党参、山楂、白扁豆、甘草药材进行显微鉴别;采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的白术、陈皮、山楂、甘草药材进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中橙皮苷的含量,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(18:82, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 283 nm,柱温为 30 °C,进样量为 10 μL。结果 茯苓、党参、山楂、白扁豆、甘草药材显微特征明显。白术、陈皮、山楂、甘草药材的 TLC 图斑点清晰,分离度高,阴性对照无干扰。橙皮苷质量浓度在 4.898 4 ~ 48.984 2 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.999 9$);精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%;平均加样回收率为 99.69%,RSD 为 2.94%($n = 9$)。结论 建立的质量标准可用于小儿参术健脾丸的质量控制。

关键词: 小儿参术健脾丸;显微鉴别;薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定;质量标准

Improvement of Quality Standard for Xiaoer Shenzhu Jianpi Pills

JIANG Xu¹, ZHAO Yuedong¹, LIANG Juanjuan¹, YANG Xiaoning¹, DONG Yuanyuan², SUN Luping², ZHU Ping¹

(1. Beijing Zhendong Guangming Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Beijing, China 100085; 2. Shanxi Zhendong Wuhetang Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi, Shanxi, China 046108)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Xiaoer Shenzhu Jianpi Pills. **Methods** Poria, Codonopsis Radix, Crataegi Fructus, Lablab Semen Album and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in the preparation were identified by the microscopic identification method. Atractylodis Macrocephalae Rhizoma, Citri Reticulatae Pericarpium, Crataegi Fructus and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in the preparation were qualitatively identified by the thin - layer chromatography (TLC) method. The content of hesperidin in the preparation was determined by the high - performance liquid chromatography (HPLC) method. 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 aqueous solution (18:82, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 283 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The microscopic characteristics of Poria, Codonopsis Radix, Crataegi Fructus, Lablab Semen Album and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma were obvious. The TLC chromatograms of Atractylodis Macrocephalae Rhizoma, Citri Reticulatae Pericarpium, Crataegi Fructus and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma had clear spots and good separation, with no interference from the negative reference. The linear range of hesperidin was 4.898 4 - 48.984 2 μg/mL ($r = 0.999 9$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 3.0%. The average recovery rate of hesperidin was 99.69%, with an RSD of 2.94% ($n = 9$). **Conclusion** The established quality standard can be used for the quality control of Xiaoer Shenzhu Jianpi Pills.

Key words: Xiaoer Shenzhu Jianpi Pills; microscopic identification; TLC; HPLC; content determination; quality standard

小儿参术健脾丸现收录于《卫生部药品标准·中药 成方制剂(第5册)》(WS₃ - B - 0892 - 91),由党参、白

第一作者:姜旭,女,蒙古族,硕士,研究方向为中药工艺和质量,(电子信箱)929450396@qq.com。

[△]通信作者:杨晓宁,女,汉族,硕士,工程师,研究方向为中药新药和品种开发,(电子信箱)yangxiaoning@zajt.com。

245 - 249.

[9] 杨丽,冯锋,高源. 白英的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(14):1805 - 1808.

[10] 任燕,张德武,戴胜军. 白英的化学成分[J]. 中国天然药物,2009,7(3):203 - 205.

[11] 杨敬芝,郭贵明,周立新,等. 白英化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(1):42 - 43.

[12] 任燕,沈莉,戴胜军. 白英中的黄酮及酰胺类化合物[J]. 中国中药杂志,2009,34(6):721 - 723.

[13] 尹海龙,李健,李箬晟,等. 白英的化学成分研究[J]. 军事医学科学院院刊,2010,34(1):65 - 67.

[14] 齐伟,孙立新,赵海晓,等. RP - HPLC 法同时测定白英中绿原酸及咖啡酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(6):451 - 455.

[15] 林世和,易艳东,肖宏,等. 白英不同药用部位不同生长期薯蓣皂苷元含量分布规律的研究[J]. 中国药房,2012,23(27):2544 - 2545.

(收稿日期:2022 - 08 - 29;修回日期:2023 - 01 - 13)

术、山楂、陈皮等13味中药材组方,具有开胃、健脾、止泻功效,用于小儿脾胃虚弱、消化不良、面黄肌瘦、精神不振的治疗。现有质量标准中仅有其性状和显微鉴别,且缺乏药味归属的说明,质量可控性差。为响应国家药品监督管理局提高儿童药质量的要求,本研究中对制剂中单味药材进行了显微鉴别,完成药味确认与归属,建立了部分药味的薄层色谱鉴别(TLC)法,增加了橙皮苷定量测定的高效液相色谱(HPLC)法,进而提升小儿参术健脾丸的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

U3000型液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DM750型电子显微镜(德国 Leica 公司);TLC Visualizer 型薄层色谱数码成像系统(瑞士 Camag 公司);KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ME-204型电子分析天平(梅特勒-托利多国际贸易 <上海> 有限公司)。

1.2 试剂

小儿参术健脾丸(山西振东五和堂制药有限公司,批号分别为 20200809, 20200914, 20200915);橙皮苷对照品(批号为 110721-202019, 含量 95.3%),白术对照药材(批号为 120925-202013),陈皮对照药材(批号为 120969-202011),山楂对照药材(批号为 121138-201206),甘草对照药材(批号为 120904-202021),均购自中国食品药品检定研究院;茯苓(安徽家和中药科技股份有限公司,批号为 Y2010018);党参(山西振东道

地药材开发有限公司,批号为 Y2010015);山楂(阳城县益农土地流转农民专业合作社,批号为 Y2006003-6);(土炒)白扁豆(安徽美誉中药饮片有限公司,批号 Y2006018-1);(麸炒)六神曲(安徽守信中药科技有限公司,批号为 Y2009004);(蜜炙)甘草(河北智嘉药业有限公司,批号为 Y2007036);硅胶 G 薄层板(烟台新诚硅胶材料有限公司)、聚酰胺薄层板(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),规格均为 10 cm × 10 cm;甲醇、乙醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

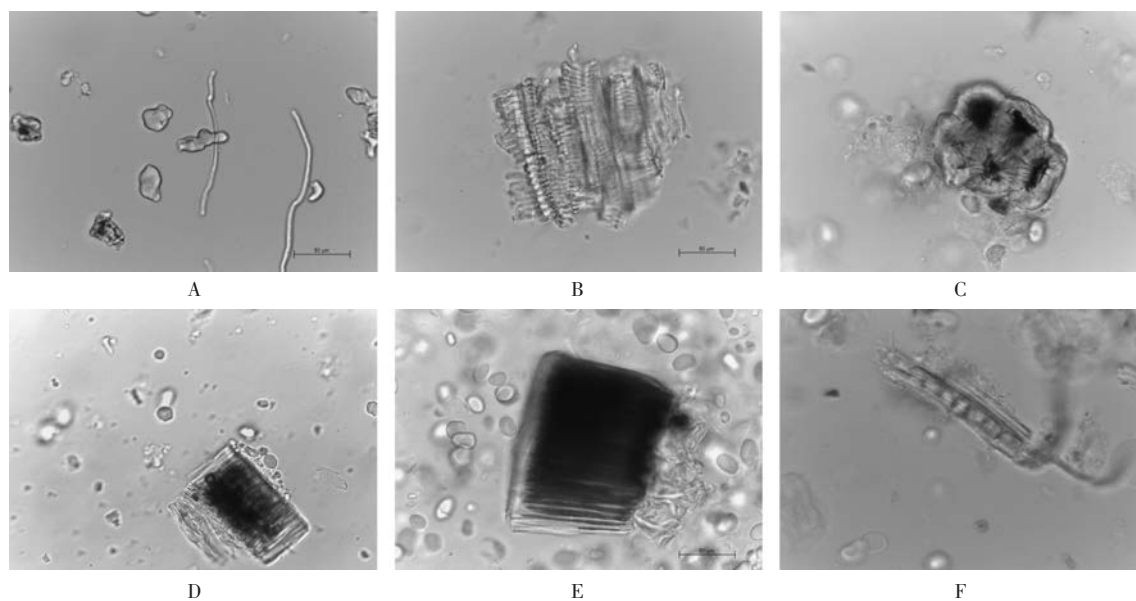
2 方法与结果

2.1 显微鉴别

取样品适量,用温水溶解,去除红糖和蜂蜜,取干燥后药渣,置显微镜下观察,并与对照药材粉末显微特征进行比对。不规则分枝状团块无色,遇水合氯醛液溶化;茯苓菌丝无色或淡棕色,直径为 4~6 μm;党参联结乳管直径为 12~15 μm,含细小颗粒状物;山楂果皮石细胞单个散在或少数成群,淡紫红色、红色或黄棕色,类圆形或多角形;白扁豆种皮栅状细胞长 80~150 μm;甘草纤维束周围薄壁细胞含草酸钙方晶,形成晶纤维。详见图 1。

2.2 TLC 鉴别

白术:取样品 10 丸,剪碎,加乙醚 50 mL,回流提取 1 h,滤过,药渣备用,滤液浓缩蒸干,加 0.5 mL 乙酸乙酯溶解,即得供试品溶液。取白术对照药材 0.5 g,精密称定,加乙醚 20 mL,超声(功率 500 W、频率 40 kHz,下同)处理 15 min,滤过,滤液浓缩蒸干,加 1 mL 乙酸乙酯

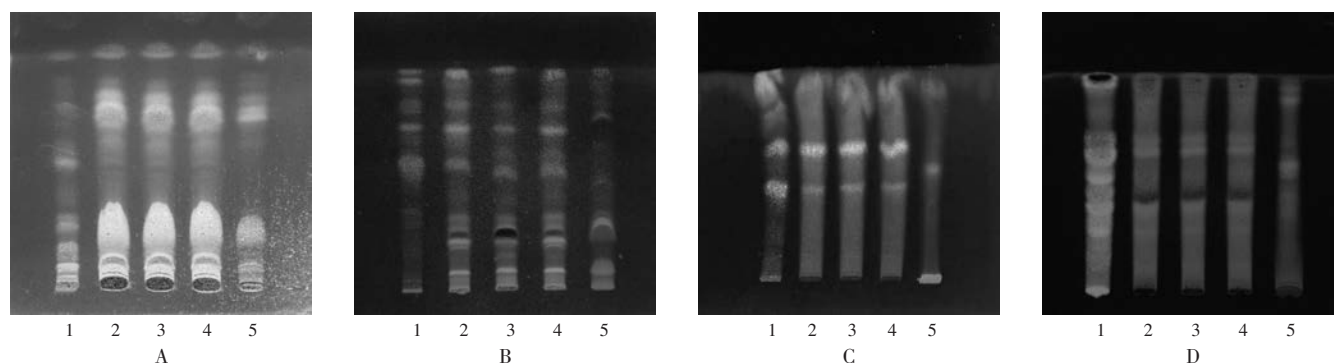


A. 菌丝 B. 联结乳管 C. 果皮石细胞 D-E. 种皮栅状细胞(六神曲、白扁豆) F. 晶纤维

图1 显微特征图

A. Hypha B. Connecting lacteal duct C. Stone cell of pericarp D-E. Grid cell of seed coat (Massa Medicata Fermentata and Lablab Semen Album) F. Crystal fiber

Fig. 1 Microscopic identification



1. 对照药材溶液 2-4. 供试品溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 白术 B. 山楂 C. 陈皮 D. 甘草

图2 薄层色谱图

1. Reference solution of medicinal materials 2-4. Test solution 5. Negative reference solution

A. *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* B. *Crataegi Fructus* C. *Citri Reticulatae Pericarpium* D. *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

Fig. 2 TLC chromatograms

溶解,即得对照药材溶液^[1]。按小儿参术健脾丸处方和工艺制备缺白术的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述溶液各10 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$) - 乙酸乙酯(10:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视^[2]。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。详见图2 A。

山楂:取山楂对照药材0.5 g,精密称定,加乙酸乙酯10 mL,超声处理15 min,滤过,滤液浓缩至1 mL,即得对照药材溶液。按小儿参术健脾丸处方和工艺制备缺山楂的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述溶液及白术鉴别项下供试品溶液各5 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷 - 三氯甲烷 - 乙酸乙酯 - 甲酸(20:5:8:0.1, $V/V/V/V$)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视^[2-3]。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,且阴性对照无干扰。详见图2 B。

陈皮:取白术鉴别项下备用药渣,加甲醇50 mL,超声提取30 min,滤过,滤液回收溶剂至干,残渣加水20 mL使溶解,通过D101型大孔吸附树脂(内径为1.5 cm,柱高为20 cm),依次用水、30%乙醇、50%乙醇各100 mL洗脱,收集30%乙醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,即得供试品溶液。收集50%乙醇洗脱液,备用。取陈皮对照药材0.5 g,精密称定,加甲醇15 mL,超声提取30 min,滤过,滤液回收溶剂至干,残渣加甲醇1 mL

使溶解,即得对照药材溶液。按小儿参术健脾丸处方和工艺制备缺陈皮的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述溶液各2 μL ,分别点于同一聚酰胺薄层板上,以三氯甲烷 - 丙酮 - 甲醇(5:1:1, $V/V/V$)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%三氯化铝乙醇溶液,热风吹干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[2]。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,且阴性对照无干扰。详见图2 C。

甘草:取陈皮鉴别项下备用50%乙醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。取甘草对照药材0.5 g,精密称定,加甲醇15 mL,加热回流30 min,滤过,滤液回收溶剂至干,残渣加甲醇1 mL使溶解,即得对照药材溶液。按小儿参术健脾丸处方和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。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述溶液各5 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯 - 甲酸 - 冰醋酸 - 水(15:1:1:2, $V/V/V/V$)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,在紫外光灯(365 nm)下检视^[2,4]。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,且阴性对照无干扰。详见图2 D。

2.3 橙皮苷含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB - C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.2% 磷酸水溶液(18:82, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 283 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

2.3.2 溶液制备

取橙皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每

1 mL含20 μg 的对照品溶液。取样品(剪碎,混匀)约1 g,精密称定,精密加入甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按小儿参术健脾丸处方及制备工艺制备缺陈皮的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

系统适用性试验与专属性试验:精密吸取2.3.2项下3种溶液各10 μL ,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液相应位置有色谱峰,理论板数按橙皮苷峰计应不低于2 000^[5-7],分离度均大于1.5,阴性对照无干扰。详见图3。

线性关系考察:取2.3.2项下对照品溶液适量,加甲醇制成质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,倍比稀释,制成不同质量浓度的系列对照品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,以橙皮苷峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.305X - 0.0144$ ($r = 0.9999$)。结果表明,橙皮苷质量浓度在4.8984~48.9842 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.3.2项下供试品溶液适量,按2.3.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果橙皮苷峰面积的RSD为0.23% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.3.2项下对照品溶液和供试品溶液各适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 8, 16, 24 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果橙皮苷峰面积的RSD分别为0.65%和0.48% ($n = 6$),表明对照品溶液和供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品适量,精密称定,共6份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算橙皮苷含量。结果的

RSD为1.25% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批已知含量的样品适量,精密称定,平行9份,加入一定质量浓度的对照品溶液,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1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 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(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
0.5014	601.68	293.333	902.630	102.60		
0.4997	599.64	293.333	894.691	100.59		
0.5031	603.72	293.333	911.541	104.94		
0.5008	600.96	587.810	1189.978	100.21		
0.5009	601.08	587.810	1190.707	100.31	99.69	2.94
0.5018	602.16	586.667	1181.796	98.80		
0.5017	602.04	881.720	1450.592	96.24		
0.5016	601.92	881.720	1447.189	95.87		
0.5022	600.24	881.720	1461.447	97.67		

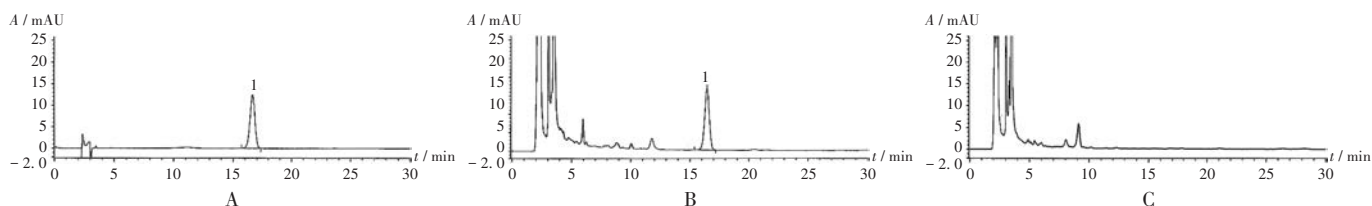
2.3.4 样品含量测定

取3批样品各适量,精密称定,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,结果3批样品中橙皮苷含量分别为1.20, 1.19, 1.20 mg/g。

3 讨论

显微鉴别法是中药原粉入药常用质量控制手段之一,本研究中通过鉴别小儿参术健脾丸的显微特征,对现有质量标准中的显微特征进行确认和归属,发现原有质量标准中栅状细胞结构不仅在白扁豆中存在,也在六神曲(含赤小豆粗粉)中存在,其显微结构专属性不强,有待讨论和确定。中药原粉入药的显微鉴别有助于避免含相同化学成分含量控制的中药材混用,保证药品的质量。

TLC法和HPLC法具有操作方便、检测速度快、灵敏度高特点,广泛应用于药物分析^[8-15]。优化上述2种方法的条件下,建立了小儿参术健脾丸中白术、陈皮、山



1. 橙皮苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Hesperidin

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

Fig.3 HPLC chromatograms