

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)03-0092-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.03.020



中草药漱口颗粒质量标准研究*

林娟¹, 许文², 李玲慧¹, 李丹¹, 潘鸿贞^{1△}

(1. 福建省福州市中医院, 福建 福州 350001; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

摘要:目的 建立中草药漱口颗粒的质量标准。方法 采用薄层色谱法对方中骨碎补、蒲公英、紫花地丁、甘草进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定制剂中秦皮乙素的含量, 色谱柱为 Welch Ultimate XB C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液(10:90, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 344 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 骨碎补、蒲公英、紫花地丁、甘草的薄层色谱斑点清晰, 分离度好, 且阴性对照无干扰。秦皮乙素质量浓度在 9.2~64.4 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 0.9997, n = 7$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均低于 4.0%; 平均加样回收率为 104.65%, RSD 为 4.60% ($n = 6$)。3 批样品中秦皮乙素的含量分别为 0.907, 0.851, 0.817 mg/g ($n = 3$)。结论 所建立的方法操作简便、重复性好, 可用于中草药漱口颗粒的质量控制。

关键词: 中草药漱口颗粒; 秦皮乙素; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

Quality Standard of Chinese Herbal Gargle Granules

LIN Juan¹, XU Wen², LI Linghui¹, LI Dan¹, PAN Hongzhen¹

(1. Fuzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350001; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350122)

Abstract: Objective To establish the quality standard for Chinese Herbal Gargle Granules. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) was used to qualitatively identify the ingredients in the prescription, including Drynariae Rhizoma, Taraxaci Herba, ViOLE Herba, and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of quercetin in the preparation, the chromatographic column was Welch Ultimate XB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution (10:90, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 344 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC identification spots of Drynariae Rhizoma, Taraxaci Herba, ViOLE Herba, and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma were clear, with good separation, and the negative control had no interference. The linear range of quercetin was 9.2-64.4 μg/mL ($R^2 = 0.9997, n = 7$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 4.0%. The average recovery rate of quercetin was 104.65% with an RSD of 4.60% ($n = 6$). The content of quercetin in three batches of samples were 0.907, 0.851, 0.817 mg/g ($n = 3$), respectively. **Conclusion** The established method is simple and reproducible, which can be used for quality control of Chinese Herbal Gargle Granules.

Key words: Chinese Herbal Gargle Granules; quercetin; TLC; HPLC; quality standard

中草药漱口颗粒为福建省福州市中医院拟开发的中药复方制剂, 由石膏、地骨皮、骨碎补、紫花地丁、蒲公英、蟾蜍菊、白茅根、白术、苍术、黄芪、甘草 11 味中药材组方, 具有清热泻火、凉血解毒、消肿止痛、健脾益肾功效, 适用于治疗口腔疾病, 尤其是口腔溃疡、牙周炎、牙龈炎, 能显著降低口腔溃疡的复发率^[1]。颗粒剂型可解决传统汤剂存在的煎煮麻烦、携带不便、药效物质不稳定、不宜久储等缺点。前期研究中, 确定了中草药漱口颗粒的制备工艺^[2]。为进一步开展质量标准研究, 本

研究中采用薄层色谱(TLC)法对中草药漱口颗粒中的骨碎补、蒲公英、紫花地丁、甘草进行定性鉴别, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定紫花地丁主要成分秦皮乙素的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AR224CN 型电子天平(美国 Ohaus 公司, 精度为万分之一); KQ-500DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 500 W, 频率为 40 kHz); 1260 型

* 基金项目: 国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作建设项目[国中医药人教函[2022]76号]; 福建省卫生健康委员会 2022 年省级临床重点专科建设项目[闽卫医政函[2022]884号]; 福建省福州市科技计划项目[2021-S-147]; 福建省福州市卫生健康委员会卫生健康系统科技创新平台项目[2021-S-wp3]。

第一作者: 林娟, 女, 大学本科, 副主任中药师, 研究方向为中药炮制、中药鉴别、膏方与药膳制作, (电子信箱)756404190@qq.com。

△通信作者: 潘鸿贞, 女, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为中药炮制、中药饮片鉴别、中药膏方与药膳的开发, (电子信箱)fzphz@163.com。

高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有二极管阵列检测器(DAD);PALL Casada 型一体化超纯水机(美国 Pall 公司)。

1.2 试药

中草药漱口颗粒(福建中医药大学制剂实验室生产,批号分别为 20220401, 20220402, 20220403);骨碎补对照药材(批号为 121169 - 202105),柚皮苷对照品(批号为 110722 - 202116),菊苣酸对照品(批号为 111752 - 202105),秦皮乙素对照品(批号为 110741 - 202109,含量为 96.0%),甘草对照药材(批号为 120904 - 202021),甘草苷对照品(批号为 111610 - 201908),蒲公英对照药材(批号为 202004),紫花地丁对照药材(批号为 202106),均购于中国食品药品检定研究院;硅胶 G 薄层板,甲醇、甲酸、乙腈均为色谱纯,均购于 Merck 化工技术有限公司;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别^{[3]367,[4-5]}

骨碎补:取样品 5 g,加甲醇 30 mL,加热回流提取 1 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,即得供试品溶液。取骨碎补对照药材 1 g,同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取骨碎补以外的其他药材,按处方工艺制备阴性样品 5 g,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取柚皮苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 0.54 mg/mL 的对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(一部)》通则 0502 TLC 法试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液及阴性对照品溶液各 4 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,置展开剂甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸 - 水(1:12:2.5:3, V/V/V/V)中展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铝乙醇溶液,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性

对照无干扰。色谱图见图 1 A。

蒲公英:取样品 5 g,加甲醇 30 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,即得供试品溶液。取蒲公英对照药材 1 g,同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取蒲公英以外的其他药材,按处方工艺制备阴性样品 5 g,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取菊苣酸对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 0.44 mg/mL 的对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(一部)》通则 0502 TLC 法试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液及阴性对照品溶液各 5 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,置展开剂三氯甲烷 - 乙酸乙酯 - 甲酸 - 水(8:10:3:1, V/V/V/V)中展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铝乙醇溶液,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。色谱图见图 1 B。

紫花地丁:取样品 5 g,加甲醇 30 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,即得供试品溶液。取紫花地丁对照药材 1 g,同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取紫花地丁以外的其他药材,按处方工艺制备阴性样品 5 g,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取秦皮乙素对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 1.15 mg/mL 的对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(一部)》通则 0502 TLC 法试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液及阴性对照品溶液各 4 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,置展开剂甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸(5:3:1, V/V/V)的上层溶液展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。色谱图见图 1 C。

甘草:取样品 5 g,加水 20 mL 使溶解,用 10 mL 正丁

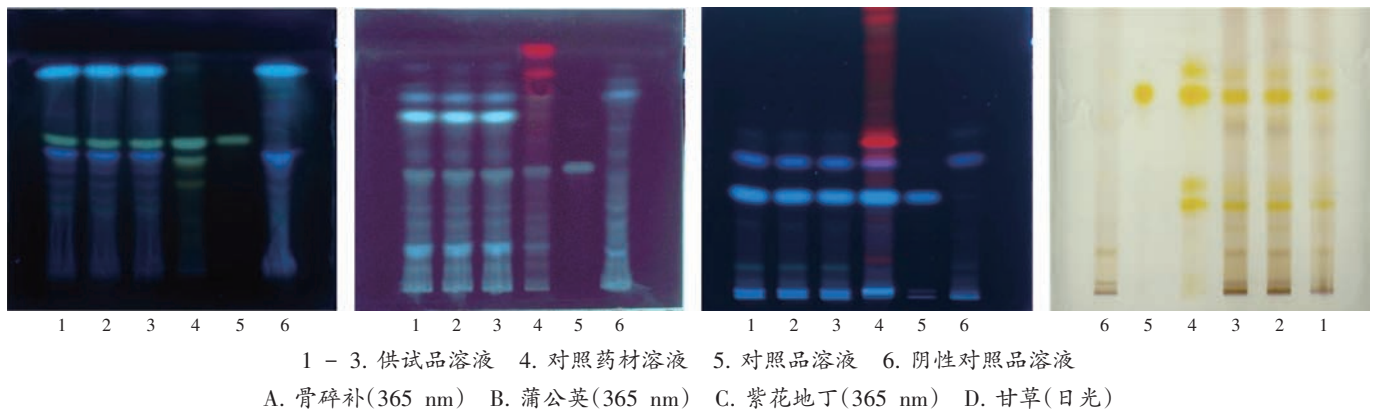


图1 薄层色谱图

1 - 3. Test solution 4. Reference medicinal solution 5. Reference solution 6. Negative reference solution

A. Drynariae Rhizoma(365 nm) B. Taraxaci Herba (365 nm) C. Viola Herba (365 nm) D. Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (sunlight)

Fig. 1 TLC chromatograms

醇提取3次,合并3次正丁醇液,水洗3次,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,即得供试品溶液。取甘草对照药材1 g,同供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取甘草以外的其他药材,按处方工艺制备阴性样品5 g,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取甘草苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的甘草对照品溶液。按2020年版《中国药典(一部)》通则0502 TLC法试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液及阴性对照品溶液各5 μ L,点于同一硅胶G薄层板上,置展开剂乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:1, V/V/V/V)中展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的橙黄色斑点,且阴性对照无干扰。色谱图见图1D。

2.2 秦皮乙素含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Welch Ultimate XB C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:0.1%甲酸溶液-乙腈(90:10, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:344 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液制备

取样品0.8 g,精密称定,置50 mL锥形瓶中,用移液管精密加入25 mL甲醇,超声(功率为250 W,频率为40 kHz)处理20 min,0.45 μ m滤膜滤过,取续滤液,用甲醇补足减失的质量,摇匀,即得供试品溶液。取缺紫花地丁阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取秦皮乙素对照品4.6 mg,精密称定,置5 mL容量瓶中,加甲醇制成质量浓度为920 μ g/mL的对照品贮备液;取对照品贮备液适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为9.2, 18.4, 27.6, 36.8, 46.0, 52.2, 64.4 μ g/mL的系列对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验^[6]:精密吸取对照品溶液(质量浓

度为64.4 μ g/mL)、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μ L,按2.2.1项下色谱条件进样测定,色谱图见图2。秦皮乙素与其相邻色谱峰的分离度大于1.5,拖尾因子为0.94,理论板数按秦皮乙素峰计超过5 000。

线性关系考察:取2.2.2项下系列对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件依次进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(X, μ g/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 40.612X - 11.413$ ($R^2 = 0.9997, n = 7$)。结果表明,秦皮乙素质量浓度在9.2~64.4 μ g/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2.2项下对照品溶液(质量浓度为64.4 μ g/mL)适量,按2.2.1项下色谱条件于1 d内连续进样6次,或连续3 d重复进样测定,记录峰面积。结果秦皮乙素峰面积的日内精密度的RSD为0.11% ($n = 6$),日间精密度的RSD为0.02% ($n = 3$),表明仪器精密度良好。

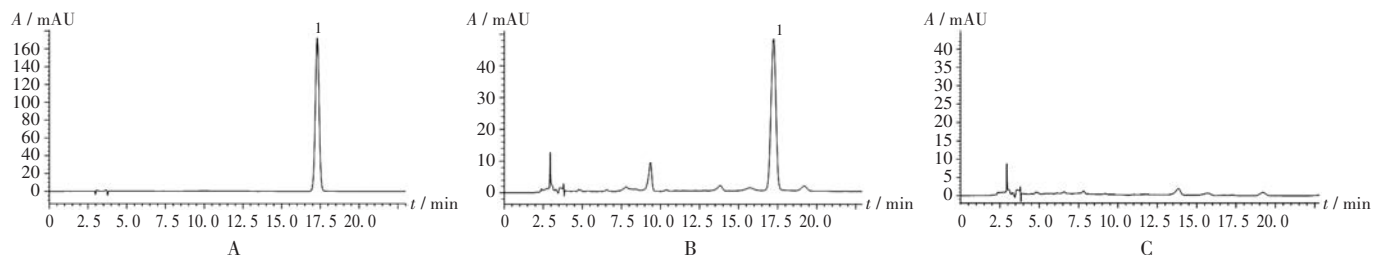
重复性试验:取样品(批号为20220403)6份,精密称定,依法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件分别进样测定,计算秦皮乙素含量。结果秦皮乙素平均含量为0.814 mg/g, RSD为1.69% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液,于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果峰面积的RSD为3.52% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(批号为20220403)0.40 g,精密称定,共6份,分别精密加入秦皮乙素对照品(相当于样品浓度的100.00%),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,并计算回收率。结果见表1。

2.2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为20220401, 20220402, 20220403)各3份,依法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件



1. 秦皮乙素

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. Quercetin

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

Fig. 2 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果(n=6)

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

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
0.4012	326.58	349.6	717.94	111.95	104.65	4.60
0.4030	328.04	349.6	689.59	103.42		
0.4036	328.53	349.6	675.26	99.18		
0.4008	326.25	349.6	687.05	103.20		
0.4005	326.01	349.6	680.09	101.28		
0.4023	327.47	349.6	708.04	108.86		

表2 3批样品中秦皮乙素含量测定结果(n=3)

Tab. 2 Results of content determination of quercetin in three batches of samples (n = 3)

批号	平均含量(mg/g)	RSD(%)
20220401	0.907	0.72
20220402	0.851	0.73
20220403	0.817	2.89

进样测定,按外标法以峰面积计算样品含量。结果见表2。

3 讨论

3.1 HPLC 定量指标选择

参考2020年版《中国药典(一部)》,根据方中各成分的指标性含量测定成分进行预试验,测定全方多成分的含量。经过筛选,君药石膏在2020年版《中国药典(一部)》中无指标性成分;臣药白茅根、虻蜚菊也无含量测定指标;臣药蒲公英指标性成分菊苷酸,骨碎补指标性成分柚皮苷的检测含量均低于万分之一。紫花地丁指标性成分秦皮乙素的检测含量为千分之一,适合作为含量测定指标^[7]。秦皮乙素是2020年版《中国药典(一部)》紫花地丁中的含量测定指标性成分,具有良好的抗肿瘤、抗炎及抗菌活性^[7-9]。秦皮乙素是中草药漱口颗粒中的重要活性成分,也是所有药味中含量最高的成分。故选择紫花地丁指标性成分秦皮乙素作为中草药漱口颗粒的含量测定指标,并进行方法学考察。

3.2 TLC 定性指标选择

TLC鉴别中,多以化学物质作对照。中药制剂药味多,成分较复杂,对照品药材为非专属性成分时,特征斑点判断有一定难度^[10-13]。故选择对照品、对照药材及缺药材的阴性对照品作参照。前期试验中,开展了骨碎补、地骨皮、蒲公英、紫花地丁和甘草5味药材的定性鉴别,发现骨碎补、蒲公英、紫花地丁和甘草4味药材的鉴别方法可行,且阴性对照无干扰;但臣药地骨皮以地骨皮对照药材^[3]¹²⁸,以及缺地骨皮的阴性对照样品作对照,存在阴性干扰,故不作为TLC测定指标。

3.3 检测波长选择

采用紫外-可见分光光度计测定200~400 nm波长范围内秦皮乙素的吸收光谱,发现于205,230,255,300,345 nm波长处均有吸收峰,以345 nm波长处吸收值最大。采用HPLC法验证对照品溶液和供试品溶液的色谱,发现于344 nm波长处均有最大吸收,且色谱图较一致。故选择344 nm波长作为秦皮乙素含量测定的检测波长^[14-15]。

3.4 方法评价

本研究中建立的定性定量方法操作简便,稳定性、重复性、准确度均符合要求,可用于中药漱口颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 王小娟,郭秀榕,郑大双. 中草药漱口水处理复发性口腔溃疡的疗效观察[J]. 福建医药杂志,2018,40(4):55-57.
- [2] 林娟,李玲慧,陈攀振,等. 中草药漱口颗粒的制备工艺研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2023,21(15):160-163.
- [3] 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.
- [4] 杨建新. 胃愈疡片的制备工艺及临床应用研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2022,20(4):61-63.
- [5] 蔡蕊,陈忠东,张寒娟,等. 补肺丸的质量标准研究[J]. 药物分析杂志,2019,39(11):2098-2105.
- [6] 陈攀振,郑文炜,曹瑞,等. HPLC法同时测定丹参配方颗粒中15个成分的含量[J]. 海峡药学,2022,34(6):16-21.
- [7] 韦玉燕. 紫花地丁药材质量评价方法研究进展[J]. 广州化工,2019,47(17):43-44.
- [8] 梁承远,张诗韵,毛跟年,等. 秦皮乙素及其衍生物的合成与药理学研究进展[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版),2015,33(2):126-133.
- [9] 成涛,王桂林,张秀容,等. 秦皮乙素调控miR-486-5p表达抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞炎症损伤的机制研究[J]. 实用临床医药杂志,2021,25(19):83-87.
- [10] 施敏,管敏. 上感合剂质量标准研究[J]. 中国药业,2019,28(3):42-45.
- [11] 杨仁耐,吴红燕,李慧媛,等. 柴萼宁肺颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2022,31(4):70-74.
- [12] 谢晓林,李娟,张德柱,等. 经典名方当归补血汤物质基准的质量标准研究[J]. 世界中医药,2023,18(11):1541-1546.
- [13] 王璐,黄鲁,汪玥,等. 抗敏颗粒质量标准提升研究[J]. 世界中医药,2020,15(16):2364-2368.
- [14] 林夏楠,林巧之. 紫花地丁中秦皮乙素含量测定研究[J]. 海峡药学,2008,20(9):60-62.
- [15] 钱正明,吴梦奇,谭国英,等. 高效液相色谱紫外等吸收波长法快速测定秦皮中秦皮甲素和秦皮乙素[J]. 色谱,2023,41(8):690-697.

(收稿日期:2023-03-08;修回日期:2023-11-23)