

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.21.019

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)21-0080-05



肺热清解煮散质量标准研究*

赖岳晓¹, 刘佩沂¹, 郑雪青¹, 黄洁莹², 田素英^{2,3,△}, 梅全喜^{1,4,5}

(1. 广东省中山市黄圃人民医院, 广东 中山 528400; 2. 广东药科大学, 广东 广州 510006; 3. 广东省化妆品工程技术中心, 广东 中山 528458; 4. 广州中医药大学第七临床医学院, 广东 深圳 518100; 5. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510378)

摘要:目的 建立肺热清解煮散的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中桑白皮、野菊花和地龙进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定制剂中阿魏酸、桑皮苷 A、芦丁的含量, 色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 阿魏酸、桑皮苷 A、芦丁测定的流动相分别为乙腈-0.3% 磷酸水溶液(23:77, V/V)、乙腈-0.1% 磷酸水溶液(10:90, V/V)、乙腈-0.1% 磷酸水溶液(34:66, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 316 nm(阿魏酸)、238 nm(桑皮苷 A)、280 nm(芦丁), 进样量为 5 μL。结果 样品中桑白皮、野菊花、地龙的薄层色谱分离效果良好, 特征斑点显色清晰, 且阴性对照无干扰。阿魏酸、桑皮苷 A、芦丁的质量浓度分别在 0.032 0~0.320 0 mg/mL、0.008 3~0.050 0 mg/mL、0.052 0~0.310 0 mg/mL 范围内与峰面积积分值线性关系良好($r \geq 0.999 7$, $n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均低于 3.0% ($n=6$); 平均加样回收率分别为 99.39%, 99.52%, 99.63%, RSD 分别为 2.72%, 1.08%, 0.70% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、重复性好、结果准确, 可用于肺热清解煮散的质量控制。

关键词: 肺热清解煮散; 阿魏酸; 桑皮苷 A; 芦丁; 质量标准

Quality Standard of Feire Qingjie Zhusan

LAI Yue Xiao¹, LIU Pei Yi¹, ZHENG Xue Qing¹, HUANG Jie Ying², TIAN Su Ying^{2,3}, MEI Quan Xi^{1,4,5}

(1. Huangpu People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China 528400; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006; 3. Guangdong Cosmetics Engineering & Technology Research Center, Zhongshan, Guangdong, China 528458; 4. The Seventh School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, China 518100; 5. The Third Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510378)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Feire Qingjie Zhusan. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used to qualitatively identify Mori Cortex, Chrysanthemi Indici Flos and Pheretima in the preparation. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the contents of ferulic acid, melanoidin A, and rutin in the preparation. The chromatographic column was Hypersil ODS2 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.3% phosphoric acid aqueous solution (23:77, V/V) for ferulic acid, acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (10:90, V/V) for melanoidin A, and acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (34:66, V/V) for rutin, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, the detection wavelengths were 316 nm (ferulic acid), 238 nm (melanoidin A), and 280 nm (rutin), the injection volume was 5 μL. **Results** The TLC chromatograms of Mori Cortex,

* 基金项目: 广东省中山市第三批社会公益与基础研究专项(医疗卫生重大、重点项目)[2021B3017]; 广东省中山市中医药传承创新发展示范试点项目[20240319]。

第一作者: 赖岳晓, 男, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为医院制剂, (电子信箱)hpylyx@126.com。

△通信作者: 田素英, 女, 硕士, 副教授, 研究方向为中药开发应用, (电子信箱)zsqtsy@126.com。

- [20] 邢学锋, 李学应, 陈飞龙, 等. GC-MS 法分析阳春砂仁叶和果实的挥发油成分[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 667-669.
- [21] 刘梦楚, 邹晓红, 蓝伦礼, 等. 基于电子鼻及顶空-气质联用技术结合化学计量学区分不同产地的砂仁[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 35-42.
- [22] 黄艳, 李海龙, 谭银丰, 等. 海南砂仁超临界萃取物中化学成分 GC-MS 分析[J]. 海南医学, 2018, 29(11): 1554-1556.
- [23] 李婧琳, 王媚, 邵佳, 等. HS-GC-MS 分析不同影响因素对砂仁挥发油主要成分的影响[J]. 中国现代中药, 2018, 20(12): 1504-1508.
- [24] 华莲. 全二维气相色谱技术的概述及其在应用[J]. 天津药学, 2009, 21(4): 47-49.
- [25] 陈啸天, 肖雪, 钱沉鱼, 等. 全二维气相色谱-四级杆飞行时间质谱对不同产地砂仁挥发油成分的分析[J]. 中国调味品, 2021, 46(2): 142-148.
- [26] 邹晓红, 刘梦楚, 蓝伦礼, 等. HPLC 测定不同产地砂仁中原儿茶酸和香草酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 62-66.
- [27] 郑美娟, 王小平, 沈晓华, 等. 4 个不同产地砂仁中槲皮苷和异槲皮苷含量测定[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(2): 28-32.

(收稿日期: 2023-10-31; 修回日期: 2024-05-13)

Chrysanthemi Indici Flos and Pheretima in the sample showed a good separation effect, clear characteristic spots, and no interference from the negative control. The linear ranges of ferulic acid, melanoidin A, and rutin were 0.032 0 – 0.320 0 mg / mL, 0.008 3 – 0.050 0 mg / mL, and 0.052 0 – 0.310 0 mg / mL ($r \geq 0.9997$, $n = 6$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 3.0% ($n = 6$). The average recoveries of ferulic acid, melanoidin A, and rutin were 99.39%, 99.52%, and 99.63%, with RSDs of 2.72%, 1.08%, and 0.70% ($n = 6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, has good repeatability, and accurate results, which can be used for quality control of Feire Qingjie Zhusan.

Key words: Feire Qingjie Zhusan; ferulic acid; melanoidin A; rutin; quality standard

中药煮散是将药物制成粉末,加水煎煮,其煎煮时间短,能有效避免传统汤剂煎煮不充分的缺点,提高药材使用率^[1],煎出的有效成分相对较高,适合工业化生产^[2]。肺热清解煮散是由经典名方桑白皮汤、泻白散传统方剂加工而成,清热宣肺,止咳平喘,主治肺热咳嗽,临床主要用于治疗急性支气管炎及肺部感染,疗效显著,前期研究中通过对肺热清解口服液的药理学作用进行探讨证明了其药效^[3]。为更好地控制肺热清解煮散的质量,本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法测定肺热清解煮散中有效成分阿魏酸^[4]、桑皮苷 A^[5-6]、芦丁^[7]的含量,采用薄层色谱(TLC)法^[8]对其中的桑白皮、野菊花、地龙^[9]进行定性鉴别,旨在提升其质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

U-3000型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);XPE105型电子天平(梅特勒托利多科技<中国>有限公司,精度为十万分之一);KQ5200DB型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为200 W,频率为40 kHz);DK-S28型电热恒温水浴锅(上海申贤恒温设备厂)。

1.2 试药

肺热清解煮散(自制,过6目筛,粒径为2.00~3.35 mm);阿魏酸对照品(批号为PCS0001,含量≥99.4%),桑皮苷 A对照品(批号为PCR0814,含量≥99.2%),芦丁对照品(批号为160412,含量≥99.2%),均购自成都植标化纯生物技术有限公司;地龙(参环毛蚓)对照药材(批号为120987-202109),桑白皮对照药材(批号为121124-202109),野菊花对照药材(批号为120995-2021707),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板、羧甲基纤维素钠(青岛海洋化工厂);甲醇、乙腈(色谱纯,广州化学试剂厂);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

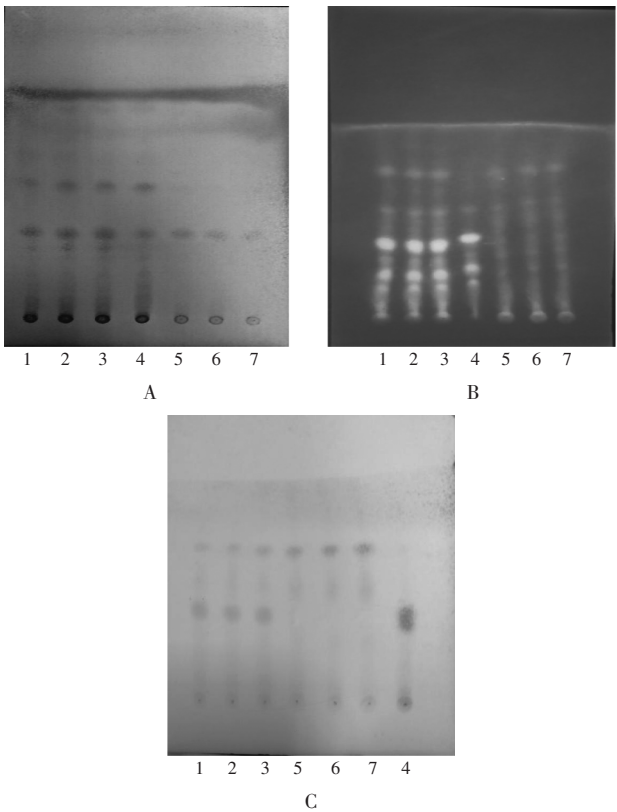
2.1 TLC鉴别

供试品水提液制备:取样品7.485 g,精密称定,置500 mL圆底烧瓶中,按料液比1:25(m/V)加蒸馏水煎煮2次,每次50 min,合并2次煎液,置500 mL容量瓶中,加蒸馏水定容,即得供试品水提液。

桑白皮:取供试品水提液100 mL,水浴蒸干,加二

氯甲烷15 mL,超声提取30 min,滤过,水浴蒸干,再加2 mL甲醇使溶解,即得供试品溶液^[10]。按该供试品溶液制备方法制备桑白皮对照药材溶液和缺桑白皮的阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法^[8]试验,取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(17:3, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,110 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果供试品溶液色谱中,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1A。

野菊花:取供试品水提液100 mL,水浴蒸干,加甲



1 - 3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5 - 7. 阴性对照品溶液
A. 桑白皮(日光) B. 野菊花(365 nm) C. 地龙(日光)

图1 薄层色谱图

1 - 3. Test solution 4. Reference medicinal materials solution
5 - 7. Negative reference solution
A. Mori Cortex (sunlight) B. Chrysanthemi Indici Flos (365 nm)
C. Pheretima (sunlight)

Fig. 1 TLC chromatograms

醇10 mL,超声30 min,滤过,取滤液,即得供试品溶液。按供试品溶液制备方法分别制备野菊花对照药材溶液和缺野菊花的阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法^[8]试验,取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以乙酸丁酯-甲酸-水(2:1:1, V/V/V)上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2%三氯化铝试液,热风加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,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1 B。

地龙:取供试品水提液100 mL,水浴蒸干,加二氯甲烷15 mL,超声30 min,滤过,水浴蒸干,加2 mL甲醇使溶解,即得供试品溶液。按供试品溶液制备方法分别制备地龙对照药材溶液和缺地龙的阴性对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法^[8]试验,取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液显色,110 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果供试品溶液色谱中,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1 C。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil ODS2 C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:阿魏酸为乙腈-0.3%磷酸水溶液(23:77, V/V),桑皮苷A为乙腈-0.1%磷酸水溶液(10:90,

V/V),芦丁为乙腈-0.1%磷酸水溶液(34:66, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:阿魏酸为316 nm^[4],桑皮苷A为238 nm,芦丁为280 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ L。各待测成分的对照品溶液和供试品溶液在此色谱条件的色谱图见图2。可见,供试品溶液中各成分在与其对照品溶液相应位置有吸收峰,各色谱峰分离度均大于1.5,阿魏酸、桑皮苷A、芦丁的理论板数分别不低于5 000,8 000,5 000。

2.2.2 溶液制备

精密量取2.1项下供试品水提取液5 mL,置10 mL容量瓶中,超声30 min,静置2 h,0.22 μ m微孔滤膜滤过,滤液以色谱甲醇定容,摇匀,即得阿魏酸、桑皮苷A的供试品溶液;滤液以去离子水定容,即得芦丁的供试品溶液。分别取阿魏酸对照品16.000 mg、桑皮苷A对照品5.200 mg、芦丁对照品25.800 mg,精密称定,分别置50 mL容量瓶中,加色谱甲醇适量,超声溶解,以色谱甲醇定容,摇匀,即得阿魏酸、桑皮苷A、芦丁质量浓度分别为0.320,0.104,0.516 mg/mL的对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取2.2.2项下阿魏酸对照品溶液1.0,2.0,4.0,8.0,10.0 mL,桑皮苷A对照品溶液0.8,1.6,3.2,4.0,4.8 mL,芦丁对照品溶液1.0,2.0,3.0,4.0,6.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,以色谱甲醇定容,摇匀,即得质量浓度分别为0.032,0.064,0.128,0.256,0.320 mg/mL的阿魏酸系列对照品溶液,0.008,0.017,0.033,0.042,0.050 mg/mL的桑皮苷A系

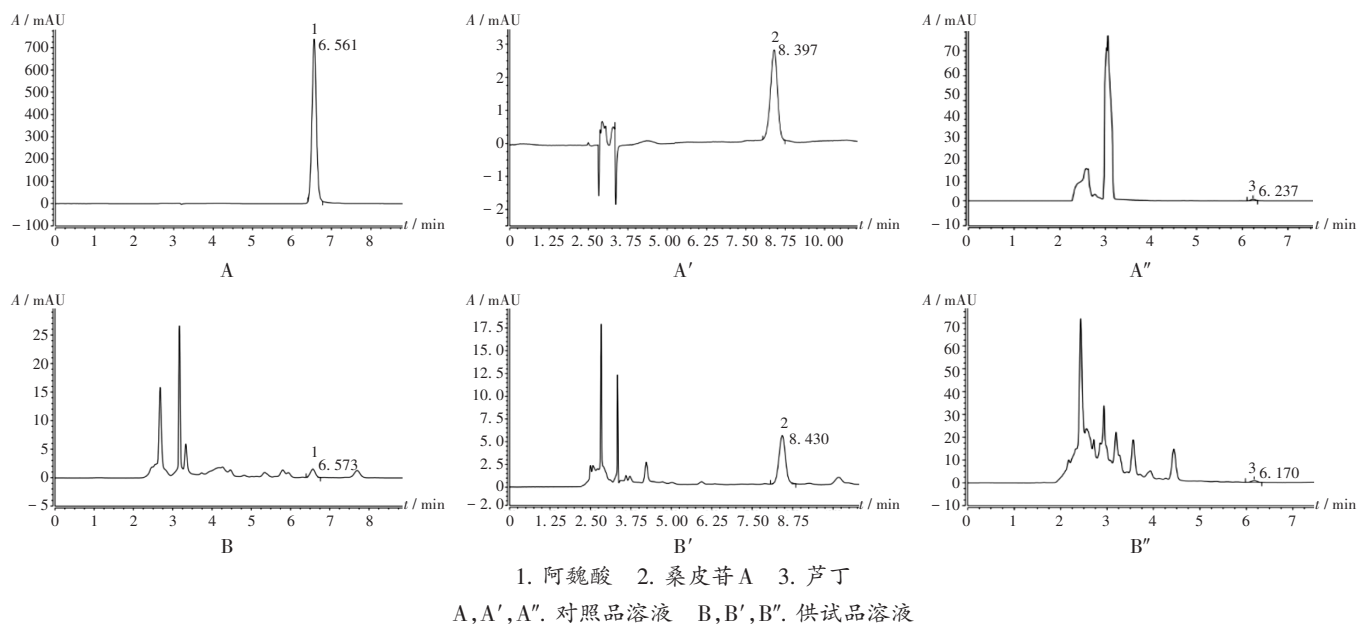


图2 高效液相色谱图

1. Ferulic acid 2. Melanoside A 3. Rutin
A, A', A''. Reference solution B, B', B''. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

列对照品溶液,0.052,0.103,0.155,0.206,0.310 mg/mL 的芦丁系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,以质量浓度(X ,mg/mL)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归^[11]。结果见表 1,表明各成分在各自质量浓度范围内与峰面积积分值线性关系良好。

表 1 方法学考察结果

Tab. 1 Linear regression equations

成分	回归方程	r	线性范围 (mg/mL)	精密度/稳定性/重复性试验 峰面积的 RSD(% , $n=6$)
阿魏酸	$Y=0.3723X+0.0286$	0.9998	0.0320~0.3200	0.60/1.71/2.47
桑皮苷 A	$Y=0.0828X+0.0395$	0.9997	0.0083~0.0500	1.04/1.51/2.31
芦丁	$Y=0.3549X-0.0047$	0.9997	0.0520~0.3100	0.60/2.85/2.20

精密度试验:取阿魏酸、桑皮苷 A、芦丁对照品溶液(质量浓度分别为 0.256,0.042,0.052 mg/mL)各适量,按 2.2.1 项下各成分色谱条件进样测定 6 次,记录峰面积。结果见表 1,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取 2.2.2 项下供试品溶液及阿魏酸、桑皮苷 A 供试品溶液分别在室温下放置 0,4,8,12,16,24 h 及时精密量取芦丁供试品溶液分别在室温下放置 0,1,3,6,10,16 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表 1,表明阿魏酸和桑皮苷供试品溶液室温下放置 24 h 内稳定性良好,芦丁供试品溶液室温下放置 16 h 内稳定性良好。

重复性试验:取样品 6 份,精密称定,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。结果见表 1,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品 0.100 g(检测芦丁)、0.500 g(检测阿魏酸、桑皮苷 A),精密称定,各平行 6 份,分别加入适量对照品,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,记录峰面积,并计算回收率^[12]。结果见表 2。

2.2.4 样品含量测定

取 3 份样品,按 2.1 项下方法制备供试品水提液,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,并将峰面积乘以相应稀释倍数后代入回归方程计算含量。结果见表 3。

3 讨论

3.1 供试品水提液制备

因阿魏酸、桑皮苷 A 均溶于甲醇、乙醇、热水^[13-14],而芦丁溶于水,故用水煎煮提取,除去杂质后,再用甲醇超声 30 min 纯化。芦丁虽能溶于甲醇,但提取分离度不佳^[7]。故选用水提取样品中阿魏酸、桑皮苷 A、芦丁。

3.2 TLC 鉴别

桑白皮 TLC 鉴别采用聚酰胺薄层板点样,展开剂考察了醋酸^[15]、甲苯-乙酸乙酯-甲酸(8:5:0.5, $V/V/V$)、

表 2 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=6$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量mg	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
阿魏酸	0.4851	0.4809	0.9798	102.87	99.39	2.72
	0.4845	0.4810	0.9509	96.96		
	0.4855	0.4805	0.9553	97.77		
	0.4838	0.4818	0.9509	96.95		
	0.4838	0.4816	0.9777	102.55		
	0.4850	0.4806	0.9620	99.25		
桑皮苷 A	0.0141	0.0140	0.0281	100.00	99.52	1.08
	0.0141	0.0140	0.0281	100.00		
	0.0142	0.0140	0.0283	100.71		
	0.0139	0.0140	0.0279	100.00		
	0.0148	0.0140	0.0286	98.57		
	0.0139	0.0140	0.0276	97.86		
芦丁	11.1262	11.0940	22.2175	99.98	99.63	0.70
	11.1064	11.0940	22.0286	98.45		
	11.0084	11.0940	22.0015	99.09		
	11.1186	11.0940	22.2303	100.16		
	11.1324	11.0940	22.2365	100.09		
	11.0527	11.0940	22.1474	100.01		

表 3 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab. 3 Results of the content determination of ferulic acid, melanoside A, and rutin in samples (mg/g, $n=3$)

成分	1	2	3	$\bar{X}$
阿魏酸	0.98310	0.98760	0.96950	0.9807
桑皮苷 A	0.02859	0.02850	0.02826	0.02845
芦丁	113.72200	110.90590	108.0586	110.8955

石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(6:4, V/V),石油醚-甲苯-氯仿(2:1:2, $V/V/V$)^[5]等,但展开效果均不理想,且甲苯、氯仿不环保。最后展开剂选择环己烷-乙酸乙酯(17:3, V/V),点于 10 cm×20 cm 规格的硅胶 G 薄层板上,展开,晾干,均匀喷显色剂 10% 硫酸乙醇溶液,110℃显色。

地龙 TLC 鉴别中,参照 2020 年版《中国药典(一部)》^[16]展开剂选择甲苯-丙酮(9:1, V/V),各成分能展开,但阴性对照有干扰,在同一位置有相同颜色的斑点。最终展开剂选择石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-甲酸(15:5:1, $V/V/V$),展开效果良好,斑点圆整,分离度好。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、重复性好、结果准确,可用于肺热清解煮散的质量控制。

参考文献

- [1] 梅全喜,郑依玲,罗容,等. 中药煮散的古代应用与现代研究新进展[J]. 时珍国医国药,2023,34(9):2225-2228.
[2] 路立峰,闫方杰,胡高升. 中药煮散应用优势、质量控制、质