

口炎清颗粒质量标准的改进

王秀芹, 吕渭升, 林彤

(广州市药品检验所, 广东 广州 510160)

摘要: 目的 改进口炎清颗粒(天冬、玄参、山银花等)的质量标准。方法 TLC法对天冬、玄参、山银花和甘草进行定性鉴别。HPLC法定量测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷、川续断皂苷乙含量。结果 TLC斑点清晰,专属性强。绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙均呈良好的线性关系($r > 0.9999$),平均加样回收率($n = 6$)95%~102%。结论 增加对山银花指标性成分灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量的测定,可完善口炎清颗粒的质量标准。

关键词: 口炎清颗粒; 天冬; 玄参; 山银花; 甘草; 绿原酸; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 川续断皂苷乙

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)07-1526-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.019

Improvement in the quality standard for Kouyanqing Granules

WANG Xiu-qin, LÜ Wei-sheng, LIN Tong

(Guangzhou Municipal Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

KEY WORDS: Kouyanqing Granules; *Asparagi Radix*; *Scrophulariae Radix*; *Lonicerae Japonicae Flos*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; chlorogenic acid; macranthoidin B; dipsacoside B

口炎清颗粒是由天冬、麦冬、玄参、山银花和甘草制成的纯中药制剂,具有清热解毒,散结消肿之功效,可治疗火毒引起的溃疡肿痛,临床上用于治疗阴虚火旺所致的口腔疾病^[1-3]。现代药理研究表明,口炎清颗粒具有抗菌、抗病毒、消炎、解热镇痛、增强机体免疫力的作用^[4],其现行的质量标准收载于《中国药典》2010年版一部,但只有甘草和山银花的薄层鉴别。为了更全面地体现该药品的质量,完善其质量执行标准,本实验新增加天冬和玄参的TLC鉴别方法,同时对原标准进行优化。《中国药典》2010版将口炎清颗粒处方项下“金银花”变更为“山银花”^[5],其作为抗菌消炎的主要药效成分^[6-7],目前只对其中绿原酸成分进行含量测定^[8]。参照文献[9-12]及《中国药典》2010版^[13],本实验增加了山银花特征性成分绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含量的同步测定,该方法科学、合理、重复性好,可更好控制口炎清颗粒质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 CAMAG TLC Visualizer 薄层色谱摄影仪; Waters e2695 高效液相色谱仪(配置2489紫外检测器、Empower 色谱工作站); Alltech 3300 蒸发光散射检测器; Mettler-Toledo XS204 电子天平。

1.2 试剂 麦冬、玄参、山银花及甘草药材,哈巴俄苷、绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙及川续断皂苷乙对照品,均由中国食品药品检定研究院提供,批号分别为121013-201009、121008-201007、121595-201202、120904-201117、111730-201106、110753-201314、111814-201101、111813-201202。口炎清颗粒(6批)及阴性样品由相关企业提供。乙腈为色谱纯(德国Merck公司);水为超纯水(自制);其他试剂均为分析纯。

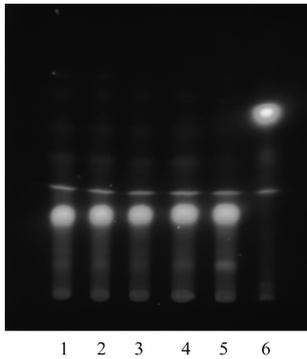
2 方法与结果

2.1 天冬的鉴别 取本品20g或6g(无蔗糖),加入甲醇100mL,超声30min,过滤,滤液蒸干,残渣用水溶解后再加盐酸5mL,置水浴锅中回流

收稿日期: 2015-11-04

作者简介: 王秀芹(1979—),女,硕士,副主任中药师,从事中药分析及质量标准研究。Tel: 13143546738, E-mail: yangxj9803@163.com

1 h, 过滤, 滤液再用石油醚 (60 ~ 90 °C) 萃取两次, 每次 30 mL, 合并萃取液, 蒸干, 残渣用 0.5 mL 甲醇溶解, 即得供试品溶液。取天冬 1 g, 加水 50 mL, 煎煮 30 min, 放冷, 过滤, 滤液加入同体积无水乙醇, 摇匀, 离心, 取上清液, 水浴蒸干, 同法制成对照药材溶液。取天冬阴性对照 20 g, 加甲醇 100 mL, 同法制成阴性溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板 (1% NaOH 浸渍) 上, 以石油醚 (60 ~ 90 °C) - 乙酸乙酯-甲酸 (5 : 1.5 : 0.2) 为展开剂展开, 挥干溶剂, 置紫外光灯 (365 nm) 下观察。结果, 供试品色谱与与对照药材色谱对应性好, 阴性无干扰, 见图 1。

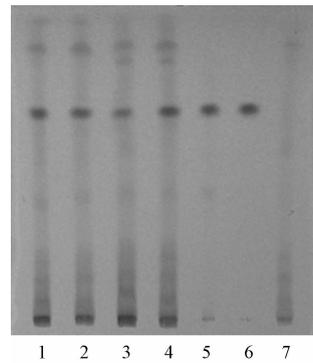


1~4. 样品 5. 天冬 6. 阴性样品
1-4. samples 5. *Asparagi Radix* 6. negative sample

图 1 天冬 TLC 色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of *Asparagi Radix*

2.2 玄参的鉴别 取本品 20 g 或 6 g (无蔗糖), 加甲醇溶液 100 mL, 超声 30 min, 过滤, 蒸干, 残渣加 3 mL 水溶解, 并转移至 C_{18} 固相萃取小柱 (300 mg/3 mL), 分别用水、30% 甲醇和甲醇 15 mL 洗脱, 收集甲醇部分, 水浴蒸干, 残渣用甲醇 1 mL 溶解, 即得供试品溶液。取玄参 1 g, 加水 50 mL, 煎煮 30 min, 放冷, 过滤, 滤液加同体积无水乙醇, 摇匀, 离心, 取上清液, 水浴蒸干, 残渣用水溶解后同法制成对照药材溶液。取哈巴俄苷 1 mg, 加甲醇 1 mL 溶解, 即得对照品溶液。取玄参阴性对照 20 g, 加甲醇 100 mL, 同法制成阴性溶液。吸取上述 4 种溶液各 6 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水 (12 : 4 : 1) 的下层溶液为展开剂展开, 取出, 挥干溶剂, 喷 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰。结果, 供试品色谱与对照药材及对照品色谱对应性好, 阴性无干扰, 见图 2。



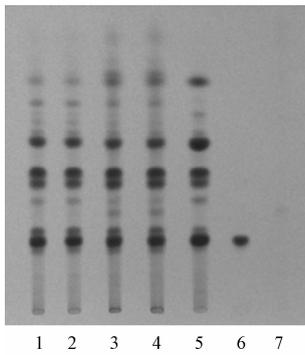
1~4. 样品 5. 玄参 6. 哈巴俄苷 7. 阴性样品
1-4. samples 5. *Scrophulariae Radix* 6. harpagoside
7. negative sample

图 2 玄参 TLC 色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of *Scrophulariae Radix*

2.3 山银花的鉴别 取本品 10 g 或 3 g (无蔗糖), 加甲醇溶液 30 mL, 超声 15 min, 滤过, 蒸干, 残渣用 20 mL 水和 2 mL 盐酸溶解, 乙酸乙酯萃取两次, 每次 20 mL, 合并萃取液, 水浴蒸干, 残渣加 1 mL 甲醇溶解, 即得供试品溶液。取山银花 1 g, 加水 50 mL, 煎煮 30 min, 放冷, 过滤, 滤液加同体积无水乙醇, 摇匀, 离心, 取上清液, 蒸干后残渣用 20 mL 水溶解, 同法制成对照药材溶液。取绿原酸 1 mg, 加 1 mL 甲醇溶解, 即得对照品溶液。取山银花阴性对照 10 g, 加甲醇 100 mL, 同法制成阴性溶液。吸取上述 4 种溶液各 2 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸丁酯-甲酸-水 (7 : 2.5 : 2.5) 10 °C 以下放置的上层溶液为展开剂展开, 取出, 挥干溶剂, 喷 2% 三氯化铁乙醇溶液显色。结果, 供试品色谱与对照药材及对照品色谱对应性好, 阴性无干扰, 见图 3。

2.4 甘草的鉴别 取本品 20 g 或 6 g (无蔗糖), 加甲醇 100 mL, 超声 30 min, 过滤, 蒸干, 加 15 mL 水溶解, 用水饱和正丁醇振摇萃取 2 次, 每次 20 mL, 合并萃取液, 洗涤两次, 每次 20 mL, 蒸干, 残渣加 2 mL 甲醇溶解, 过中性氧化铝柱 (100 ~ 200 目, 5 g, 内径约 1.5 cm), 依次用 20 mL 甲醇、30 mL 40% 甲醇洗脱, 收集 40% 甲醇部分, 水浴上蒸干, 残渣加甲醇 1 mL, 即得供试品溶液。取甘草 1 g, 加水 50 mL, 煎煮 30 min, 放冷, 滤过, 滤液加同体积无水乙醇, 摇匀, 离心, 取上清液, 水浴蒸干, 残渣加 15 mL 水溶解, 同法制成对照药材溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸丁酯-甲酸-水

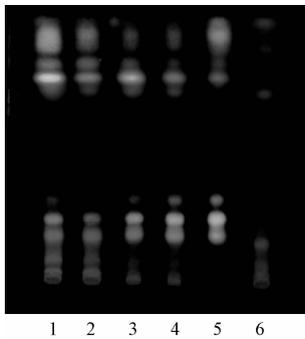


1~4. 样品 5. 山银花 6. 绿原酸 7. 阴性样品
1-4. samples 5. *Lonicerae Japonicae Flos* 6. chlorogenic acid
7. negative sample

图3 山银花 TLC 色谱图

Fig. 3 TLC chromatogram of *Lonicerae Japonicae Flos*

(7:2.5:2.5) 10℃以下放置的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 挥干溶剂, 喷10%硫酸乙醇溶液, 105℃下加热显色, 放冷后置紫外光灯(365 nm)下观察。结果, 供试品色谱与对照药材色谱对应性好, 阴性无干扰, 见图4。



1~4. 样品 5. 甘草 6. 阴性样品
1-4. samples 5. *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 6. negative sample

图4 甘草 TLC 色谱图

Fig. 4 TLC chromatogram of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

2.5 绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含有量测定

2.5.1 检测波长的选择 参考《中国药典》2010年版一部, 绿原酸采用330 nm检测波长, 灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙采用蒸发光散射检测器。

2.5.2 溶液的制备

2.5.2.1 对照品溶液 精密称取绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙及川续断皂苷乙适量, 加入50%甲醇溶液, 配制成每1 mL含绿原酸150 μg、灰毡毛忍冬皂苷乙250 μg、川续断皂苷乙40 μg的混合溶液, 即得。

2.5.2.2 供试品溶液 取本品装量差异下的颗粒, 混匀后研细, 精密称取5.0 g或1.5 g(无蔗糖), 置于锥形瓶中, 精密加入50 mL 50%甲醇溶液, 称定质量, 超声30 min, 放冷, 50%甲醇溶液补足减失质量, 摇匀, 0.45 μm微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.5.2.3 阴性溶液 取山银花阴性样品5.0 g, 精密加入50 mL 50%甲醇, 按“2.5.2.2”项下方法制备山银花阴性溶液。

2.5.3 色谱条件及系统适用性试验 Agilent Zorbax C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温35℃; 流动相乙腈(A)-0.4%醋酸(B), 按表1程序进行梯度洗脱; 体积流量1.0 mL/min; 绿原酸检测波长330 nm; 漂移管温度60℃; 载气体积流量2.3 L/min。理论塔板数以绿原酸峰计, 不得低于5 000, 色谱图见图5。

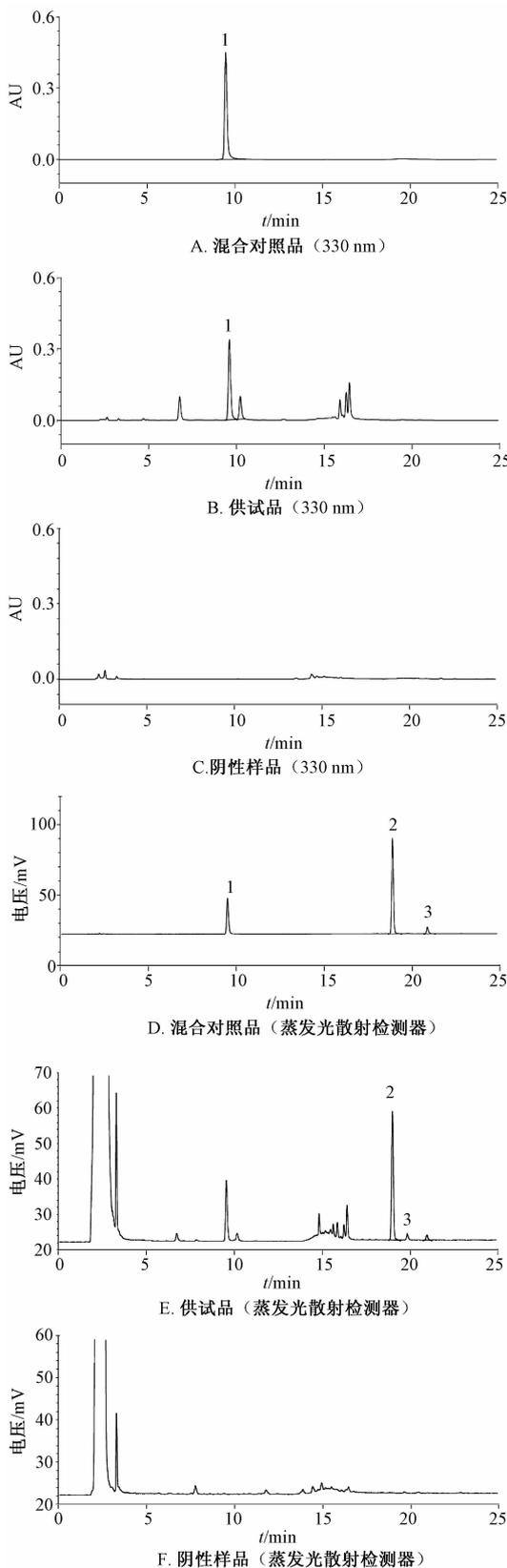
表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~10	8→15	92→85
10~12	15→29	85→71
12~18	29→33	71→67
18~25	33→40	67→60

2.5.4 线性关系考察 精密吸取绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙混合对照品溶液(质量浓度分别为155.912、255.349、41.918 μg/mL)1、2、5、10、15、20、25 μL, 依次注入色谱仪测定。以对照品进样量(μg)为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(A)绘制绿原酸标准曲线; 以对照品进样量(μg)的对数值为横坐标(logX), 峰面积的对数值为纵坐标(logA)绘制灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙标准曲线, 得线性方程 $A = 2\ 980\ 819.3X - 122\ 947.4 (r = 1)$ 、 $\log A = 1.630\log X + 3.339 (r = 0.999)$ 、 $\log A = 1.484\log X + 3.615\ 6 (r = 0.999)$ 。结果表明, 绿原酸在0.156~3.898 μg、灰毡毛忍冬皂苷乙在0.255 3~6.383 7 μg、川续断皂苷乙在0.041 9~1.048 0 μg范围内线性关系良好。

2.5.5 稳定性试验 取同一批样品, 按“2.5.2.2”项下方法制备供试品溶液, 于0、1、2、4、8、16、24 h注入色谱仪测定。结果, 绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙的峰面积RSD值分别为1.0%、2.1%、2.4%, 表明供试品溶液在24 h内基本稳定。



1. 绿原酸 2. 灰毡毛忍冬皂苷乙 3. 川续断皂苷乙
1. chlorogenic acid 2. macranthoidin B 3. dipsacoside B

图5 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms

2.5.6 重复性试验 精密称取同一批样品 5.0 g, 共 6 份, 按“2.5.2.2”项下方法制备供试品溶液。结果, 绿原酸 ($n = 6$) 平均含有量为 1.084 mg/g (RSD = 1.3%), 灰毡毛忍冬皂苷乙 ($n = 6$) 为 1.916 mg/g (RSD = 1.3%), 川续断皂苷乙 ($n = 6$) 为 0.155 6 mg/g (RSD = 2.7%), 表明该方法具有良好的重复性。

2.5.7 加样回收率试验 精密称取含有量已知 (绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙平均含有量为 1.084、1.916、0.156 mg/g) 的同一批样品 2.50 g, 共 6 份, 置于具塞锥形瓶中, 分别精密加入绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙混合对照品溶液 (含绿原酸 109.324 $\mu\text{g/mL}$ 、灰毡毛忍冬皂苷乙 188.837 $\mu\text{g/mL}$ 、川续断皂苷乙 16.580 $\mu\text{g/mL}$) 25 mL, 再分别精密加入 50% 甲醇 25 mL, 按“2.5.2.2”项下方法制备供试品溶液, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 ($n = 6$)
Tab. 2 Results of recovery tests ($n = 6$)

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
绿原酸	2.519 5	2.731 1	2.733 1	5.366 5	96.43	97.7 (1.5)
	2.507 9	2.718 6	2.733 1	5.432 3	99.29	
	2.537 1	2.750 2	2.733 1	5.363 2	95.61	
	2.563 8	2.779 2	2.733 1	5.489 0	99.15	
	2.539 0	2.752 3	2.733 1	5.435 6	98.18	
	2.515 0	2.726 3	2.733 1	5.389 7	97.45	
灰毡毛忍 冬皂苷乙	2.519 5	4.827 4	4.720 9	9.647 4	102.10	99.0 (2.7)
	2.507 9	4.805 1	4.720 9	9.445 6	98.30	
	2.537 1	4.861 1	4.720 9	9.656 6	101.58	
	2.563 8	4.912 2	4.720 9	9.458 1	96.29	
	2.539 0	4.864 7	4.720 9	9.573 8	99.75	
	2.515 0	4.818 7	4.720 9	9.336 7	95.70	
川续断 皂苷乙	2.519 5	0.392 0	0.414 5	0.806 1	99.90	100.7 (2.6)
	2.507 9	0.390 2	0.414 5	0.811 9	101.74	
	2.537 1	0.394 8	0.414 5	0.794 3	96.38	
	2.563 8	0.398 9	0.414 5	0.831 8	104.44	
	2.539 0	0.395 1	0.414 5	0.812 5	100.70	
	2.515 0	0.391 3	0.414 5	0.810 8	101.21	

2.5.8 样品含有量测定 取 6 批样品, 按“2.5.2.2”项下方法制备供试品溶液, 计算绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含有量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 山银花、甘草薄层鉴别方法修订 《中国药典》一部 2010 年版采用甲醇直接提取, 展开后置紫外光灯 (365 nm) 下进行检视, 但斑点模糊不清, 与山银花阴性图谱比较, 供试品色谱中只与山

表 3 含有量测定结果 (mg/袋)

Tab. 3 Results of content determination (mg/bag)

批号	绿原酸	灰毡毛忍冬	川续断皂	灰毡毛忍冬皂苷乙 +	
		皂苷乙	苷乙	川续断皂苷乙	
C3A001	11.7	20.0	1.5	21.5	
B3A001	10.7	18.9	1.5	20.4	
D3A003	10.9	19.6	1.6	21.2	
130411	10.1	19.9	2.4	22.3	
130306	11.1	20.8	2.5	23.3	
130304	10.9	20.1	2.5	22.6	

银花在绿原酸一个斑点处一致。甘草 TLC 色谱图与阴性色谱图比较, 供试品色谱与甘草只有一个斑点一致, 而且比较扩散。因此, 本研究将原标准方法进行修订, 改进山银花和甘草的提取方法, 去除杂质, 降低背景颜色, 结合显色剂以增强斑点的可辨识度。结果, 改善后薄层色谱图的斑点比较集中, 供试品与对照药材色谱斑点的对应性好, 甘草阴性对照无对应斑点。

3.2 增加灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙含有量测定的意义 《中国药典》2010 版只测定山银花中绿原酸的含有量, 从药材成分角度上难以区分金银花与山银花。而绿原酸为很多药材的共有成分, 故只对这一个成分进行检测时专属性差, 难以辨别制剂在生产过程中投料的真实性。因此, 很有必要增加对山银花指标性成分灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙^[14-15]的含有量测定, 以更全面控制口炎清颗粒的质量。

参考文献:

[1] 曾宪涛. 他克莫司软膏加口炎清颗粒治疗糜烂型 OLP 的疗效评价[J]. 临床口腔医学杂志, 2011, 27(7): 432-433.

[2] 王雅敏, 陶 岚. 口炎清颗粒治疗轻型复发性阿弗它溃疡的临床疗效[J]. 上海医学, 2015, 38(1): 898-899.

[3] 高维诺, 韩 燕, 辛越红. 口炎清治疗创伤性口腔溃疡临床观察[J]. 河南中医, 2014, 34(5): 970-971.

[5] 李忠思, 张小娜, 梁 永, 等. 口炎清药效学研究[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(4): 216-217.

[6] 王 芳, 高 松. 金银花、山银花药理学研究现状[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(4): 237-239.

[7] 王志萍, 邓家刚, 王 勤, 等. 山银花研究的最新进展[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(4): 59-61.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 465.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 334.

[10] 赵留存, 叶世芸, 杨 春, 等. UPLC-PDA-ELSD 测定贵州山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 64-66.

[11] 张子建, 孙冬晓, 王 婧, 等. LC-MS/MS 法同时测定口炎清颗粒中 8 种成分[J]. 中成药, 2013, 35(3): 952-954.

[12] 张 燕, 何 兵, 杨世艳, 等. HPLC 同时测定口炎清颗粒中 7 个有机酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 108-111.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 28

[14] 吴飞燕, 冯宋岗, 曾建国. 金银花和山银花的鉴别与归属研究[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1150-1156.

[15] 邹冬兰, 陈伟兰, 曹宝华. 金银花及山银花的鉴别[J]. 实用中医药杂志, 2009, 25(11): 773.