

引用本文:汪安,程桂林,蒲婧哲,等.小儿珍贝散质量标准提升研究[J].安徽医药,2022,26(6):1094-1098.DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.007.

◇ 药学研究 ◇



小儿珍贝散质量标准提升研究

汪安¹,程桂林¹,蒲婧哲²,陶冶²,王多梅²

作者单位:¹池州市质量监督检验研究院,安徽 池州 247100;

²安徽省食品药品检验研究院,安徽 合肥 230051

通信作者:蒲婧哲,女,副主任中药师,研究方向为中药质量评价,Email:pujingzhe@163.com

基金项目:安徽省自然科学基金项目(2108085MB63)

摘要: **目的** 从显微鉴别、薄层鉴别、含量测定3个方面,对小儿珍贝散标准进行完善与提高。**方法** 该研究起止时间为2020年1—10月。采用显微鉴别方法对珍珠、川贝母、沉香进行定性鉴别;采用薄层色谱法(TLC),对人工牛黄、沉香、川贝母进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC),以胆红素作为质控指标,进行含量测定。**结果** 薄层色谱法能有效地鉴别小儿珍贝散中的人工牛黄、沉香、川贝母,阴性无干扰;胆红素在0.004~0.160 μg范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=31\,476X-984.42$,平均加样回收率为102.78%,相对标准差(RSD)为1.2%,测定样品17批,含量测定平均值为0.548 4 mg/g。**结论** 新建立的质量控制方法增加了显微鉴别、薄层色谱及含量测定的质量控制研究,实验方法准确可靠,简便快捷,适用性良好,可用于该制剂的质量控制和评价。

关键词: 中草药; 质量控制; 胆红素; 小儿珍贝散; 色谱法,薄层; 色谱法,高压液相; 质量标准; 人工牛黄; 胆南星; 沉香

Improvement of quality standard of Xiaozhenbei powder

WANG An¹,CHENG Guilin¹,PU Jingzhe²,TAO Ye²,WANG Duomei²

Author Affiliations:¹Chizhou City Quality Supervision and Inspection Research Institute, Chizhou, Anhui 247100, China; ²Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei, Anhui 230051, China

Abstract: **Objective** To improve the standard of Xiaozhenbei powder from three aspects: microscopic identification, thin-layer identification, and content determination.**Methods** This study lasted from January 2020 to October 2020. Microscopic identification methods were used to qualitatively identify pearl, Fritillaria cirrhosa and Agarwood; thin layer chromatography (TLC) was used to qualitatively identify artificial bezoar, agarwood and Fritillaria cirrhosa; high performance liquid method (HPLC) was employed for content determination, with bilirubin as a quality control index.**Results** TLC could effectively identify the artificial bezoar, agarwood, and Fritillaria in Xiaozhenbei powder, negative without interference; bilirubin had a good linear relationship in the range of 0.004~0.160 μg, and the regression equation was $Y=31\,476X-984.42$. The average recovery was 102.78%, and the relative standard deviation (RSD) was 1.2%. The mean content of 17 batches of bilirubin was 0.548 4 mg/g.**Conclusions** The newly established quality standard has increased the quality control research of pearl, artificial bezoar, fritillaria cirrhosa and agarwood in the prescription. The experimental method is accurate and reliable, simple and fast, and has good applicability. It can be used for the quality control and quality evaluation of the preparation.

Key words: Drugs, Chinese herbal; Quality control; Bilirubin; Xiaozhenbei powder; Chromatography, thin layer; Chromatography, high pressure liquid; Quality standard; Artificial cow-bezoar; Cholanacin; Aloes

小儿珍贝散为儿童用药,处方由牛黄、珍珠、川贝母、天竺黄、沉香、胆南星、煅硼砂、冰片共计八味药材粉碎成细粉制得。具有清热、消炎、止咳、化痰之功效^[1-2]。其中,川贝母、沉香、人工牛黄、珍珠价格较高,市场上掺伪、以次充好现象较为常见。小儿珍贝散现行标准收载于《卫生部药品标准中药成方制剂第四册》,标准只有性状、理化鉴别和检查项,难以有效控制产品质量。2020年1—10月,本研

究通过采用显微鉴别、薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)建立了小儿珍贝散处方中珍珠、川贝母、沉香、人工牛黄四味药定性和定量鉴别方法。所建立的方法快速、准确、重复性好,从而为完善小儿珍贝散的质量标准提供了依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Olympus BX51显微镜,岛津高效液相色谱仪,配备SPD-20A紫外检测器;CAMAG ATS4自

动点样仪和TLC VISUALIZE薄层成像系统。Mettler ME204万分之一电子天平;KQ-100型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);Millipore Simplicity-185型超纯水仪(Millipore公司)。

1.2 试药 牛胆粉对照药材(中国食品药品检定研究院,批号121095-201203);沉香对照药材(中国食品药品检定研究院,批号121222-202104);川贝母对照药材(中国食品药品检定研究院,批号121757-201609);胆红素对照品(中国食品药品检定研究院,批号100077-201808,含量为98.9%);甲酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),乙腈(色谱纯,美国Honeywell公司)。试剂:乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),实验中所用水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

1.3 实验样品 中成药小儿珍贝散:企业A(批号K03002、K03001、B10016、B09013、B07011、B07010、B05009、B04007);企业B(批号190301、200301、200201、190401、190301、180703、180402、180401、180101);从亳州康美中药材市场购买牛黄、珍珠、川贝母、天竺黄、沉香、胆南星、煅硼砂、冰片药材各1批,经安徽省食品药品检验研究院张亚中博士鉴定均为正品。

2 方法与结果

2.1 珍珠、川贝母、天竺黄、沉香显微鉴别 珍珠和川贝母的显微特征参照《中国药典》2020年版该品种项下;沉香参照《中药粉末显微鉴别彩色图集》标准。根据各药味显微特征,增加小儿珍贝散显微鉴别为:取本品,置显微镜下观察:淀粉粒广卵形、贝壳形、肾形或椭圆形,直径约至60 μm ,脐点人字状、星状或点状,层纹明显(川贝母)。不规则碎块,半透明,具彩虹样光泽,有时可见细密波状纹理(珍珠)。具缘纹孔导管,纹孔密,内含淡黄色或黄棕色树脂状物(沉香)。

2.2 薄层色谱

2.2.1 人工牛黄^[3-6] 取样品粉末0.3 g,置10 mL量瓶中,加甲醇适量,超声处理5 min,加甲醇至刻度,摇匀,静置,取上清液,作为供试品溶液。取牛胆粉对照药材10 mg,加甲醇适量,超声处理使充分溶解,再加甲醇至10 mL,摇匀,静置,取上清液,作为对照药材溶液。根据处方组成,取除人工牛黄外的其余药味,按工艺要求制成缺人工牛黄的阴性制剂。按供试品溶液制备方法,制得缺人工牛黄阴性对照溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述供试品溶液和上述对照药材溶液各8 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-冰醋酸-水(7.5:10:0.3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%磷钼酸乙醇溶液,在

105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。薄层图谱见图1。

2.2.2 沉香^[7-8] 取本品粉末0.5 g,置具塞试管中,加乙酸乙酯溶液3 mL,超声处理60 min,滤过,取滤液作为供试品溶液。另取沉香对照药材0.5 g,同法制成对照药材溶液。取除沉香外的其余药味,按工艺要求制成缺沉香的阴性制剂。按供试品溶液制备方法,制得缺沉香阴性对照溶液。吸取上述三种溶液各10 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-乙醚(10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;再喷以2%香草醛硫酸溶液,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。薄层图谱见图2。

2.2.3 川贝母^[9-11] 取本品粉末约6 g,精密称定,至圆底烧瓶中,加浓氨试液5 mL浸润,放置1 h,精密加入二氯甲烷-甲醇(4:1)的混合溶液50 mL,混匀,置80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流2 h,放冷,滤过,蒸干,残渣加甲醇定容至2 mL,摇匀,滤过,即得。另取川贝母对照药材、川贝母药材、湖北贝母、平贝母、浙贝母、伊犁贝母药材,以及企业提供的川贝母原料药材各1 g,同法制成对照药材溶液。取除川贝母外的其余药味,按工艺要求制成缺川贝母的阴性制剂。按供试品溶液制备方法,制得缺川贝母阴性对照溶液。照薄层色谱法试验,吸取供试品溶液和对照药材溶液各10 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-二乙胺(12:10:1)为展开剂,二次展开,取出,晾干,依次喷以稀碘化铋钾试液和亚硝酸钠试液。供试品色谱中,在与川贝母对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。薄层图谱见图3。

2.3 胆红素HPLC含量测定^[12-14]

2.3.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-1%冰醋酸溶液(95:5)为流动相;检测波长为450 nm;柱温35 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量5 μL 。理论板数按胆红素峰计算分别应不低于3 000。对照品溶液、供试品溶液和缺人工牛黄阴性对照溶液色谱图见图4。

2.3.2 对照品溶液的制备 取胆红素对照品适量,精密称定,置50 mL棕色容量瓶中,加二氯甲烷溶解并稀释至刻度。精密量取1 mL,置10 mL棕色容量瓶中,用二氯甲烷稀释至刻度,摇匀,即得(每1毫升中含胆红素4 μg)。

2.3.3 供试品溶液的制备 取本品1.5 g,精密称

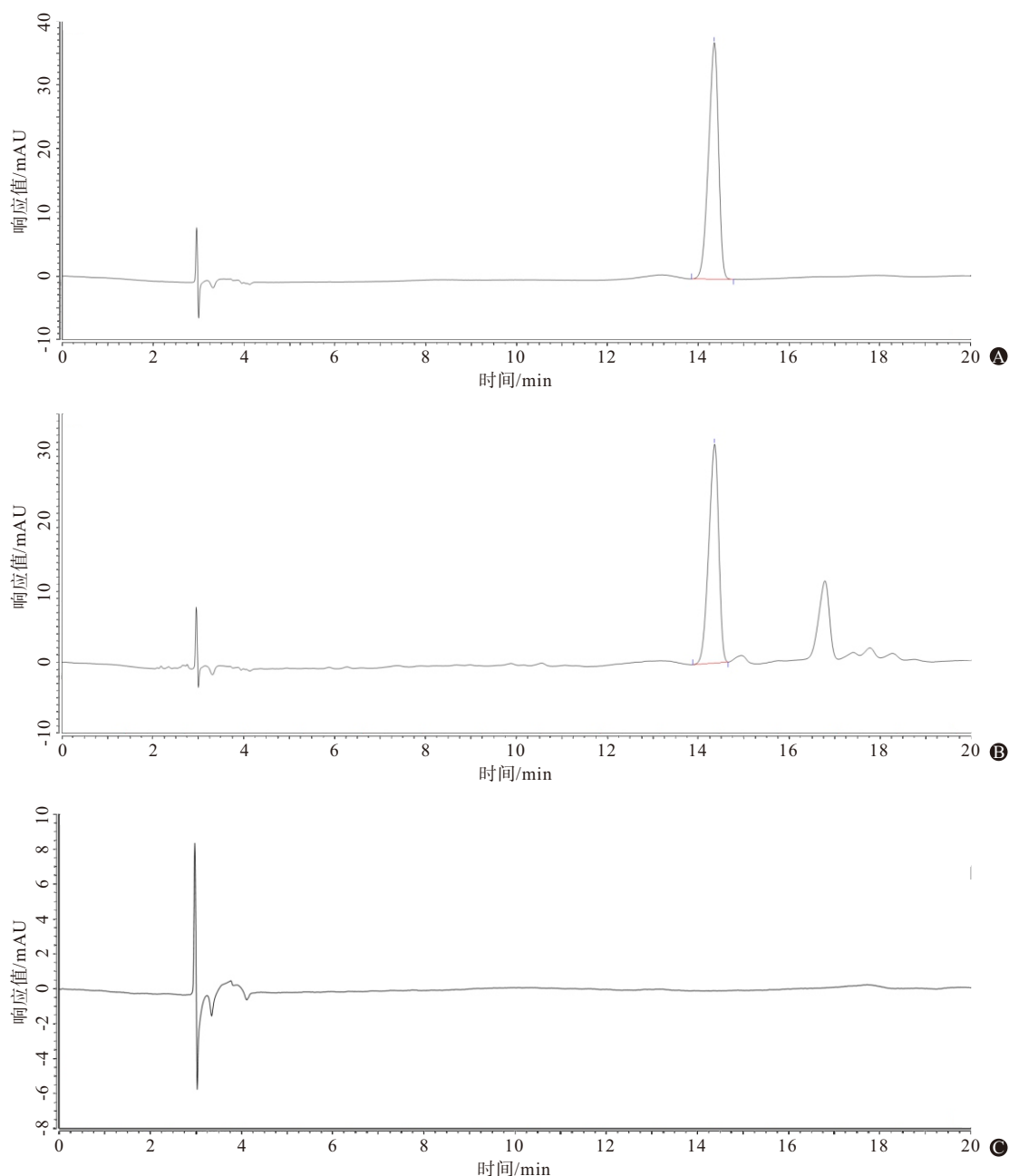


图4 胆红素色谱图(高效液相色谱法):A为对照品溶液;B为供试品溶液(企业A,批号B09013);C为缺人工牛黄阴性对照溶液

定,置100 mL棕色容量瓶中,加二氯甲烷80 mL,超声处理(功率180 W,频率50 kHz)40 min,用二氯甲烷定容至刻度,摇匀,滤过,去续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 按处方比例及工艺制备缺人工牛黄阴性样品,制备阴性样品溶液,同供试品溶液制备方法操作,结果表明阴性样品无干扰。

2.4.2 耐用性试验 分别考察两根不同商品规格的色谱柱和不同品牌液相色谱仪,测定同一批(B05009)样品,按上述色谱条件测定,计算胆红素含量,结果见表1。结果表明耐用性试验良好。

2.4.3 线性关系考察 分别精密吸取浓度为0.4 mg/L、1.6 mg/L、3.2 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、16 mg/L的

表1 不同商品规格的色谱柱测定结果

色谱柱	仪器	含量/(mg/g)
Agilent C18(150 mm×4.6 mm, 5 μm)	岛津20AT	0.518 1
Quasar C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)	Agilent 1200	0.502 0

对照品溶液,进样量10 μL注入高效液相色谱仪,以测得的峰面积 Y 为纵坐标,胆红素的进样浓度 X 为横坐标,绘制标准曲线,得到胆红素进样量在0.004~0.160 μg范围内,其进样量与峰面积之间呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=31\,476X-984.42$, $R=0.999\,9$ 。

2.4.4 精密度试验 取“2.3.2”的胆红素对照品溶液(浓度4 mg/L)5 μL,按上述色谱条件下重复进样6次,胆红素平均峰面积值为123 130.7,相对标准差

(RSD)为0.2%($n=6$),表明方法精密度良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批号(B05009)样品6份,精密称取1.5 g,分别置100 mL棕色容量瓶中,按上述供试品溶液制备方法制备供试品溶液,测定供试品中胆红素的含量,其中胆红素的相对标准差RSD为0.9%,符合要求,表明方法重复性较好。

2.4.6 准确度试验 取已知含量本品(批号B05009,胆红素:0.518 1 mg/g)0.75 g,精密称定,置100 mL棕色量瓶中,再精密加入浓度为0.102 4 g/L对照品溶液[精密称取胆红素对照品(含量98.9%)5.175 mg,至50 mL棕色量瓶中,加二氯甲烷稀释至刻度,作为对照品溶液]4 mL,加二氯甲烷80 mL,超声处理(功率180 W,频率50 kHz)40 min,用二氯甲烷定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。按拟订方法平行测定6份,记录色谱图。求得总的胆红素含量,根据样品中已知的胆红素含量和加入胆红素的量,测定其含量,计算回收率,结果见表2。胆红素平均回收率为102.78%,RSD=1.13%。表明准确性较好。

2.5 样品测定及限度制定 按照拟定的色谱条件和方法,测定了17批次小儿珍贝散样品中胆红素的含量,结果见表3。小儿珍贝散中人工牛黄限度按照各批次结果的平均值下浮20%制定,限度为“每1克含人工牛黄以胆红素($C_{33}H_{36}N_4O_6$)计,不得少于0.45 mg”。

3 讨论

小儿珍贝散作为儿童用药制剂,但相关的质量研究甚少;处方中,川贝母、沉香、人工牛黄在投料中均有可能存在质量隐患。故本研究通过对小儿珍贝散的质量标准的研究和提高,希能真实反映产品质量。

在显微鉴别研究中发现,各厂家样品均能检出天竺黄的不规则透明片状物,但该显微特征均少见,最终建议删除天竺黄的显微特征方法,建立珍珠、川贝母、沉香的显微特征鉴别方法,增加该品种的质量控制指标。

在沉香的薄层色谱方法研究中,因药典标准中

表3 小儿珍贝散样品17批次含量测定结果/(mg/g)

序号	批号	生产企业	胆红素含量
1	K03002	A	0.530 5
2	K03001	A	0.522 6
3	B10016	A	0.534 7
4	B09013	A	0.509 8
5	B07011	A	0.569 4
6	B07010	A	0.506 1
7	B05009	A	0.518 1
8	B04007	A	0.608 0
9	190301	B	0.495 8
10	200301	B	0.531 3
11	200201	B	0.502 3
12	190401	B	0.563 4
13	190301	B	0.551 4
14	180703	B	0.504 8
15	180402	B	0.609 4
16	180401	B	0.660 8
17	180101	B	0.605 9

注:测定的17批次胆红素含量平均值为0.548 4 mg/g,标准差为0.05。

沉香薄层鉴别方法虽可行但斑点信息较少且主要为色酮类成分,故本次研究优化供试品处理方法,将溶剂乙醚换成乙酸乙酯,供试品斑点信息增多,同时增加香草醛硫酸溶液显色,进一步考察萜类成分。由图2A图谱信息显示,沉香对照药材有5个主斑点,供试品10-18与对照药材斑点信息一致,供试品1~8缺失同一主斑点;由图2B日光下图谱信息显示,在同一色谱条件下,前述缺失的主斑点处各样品颜色深浅不一,1~8号斑点颜色整体浅于10~18号;说明不同企业间沉香投料质量存在一定差异。

在川贝母的薄层色谱方法研究中,参照药典2015年版贝母属类药材甾体生物碱TLC鉴别的基础上,比较超声处理和加热回流两种处理方式,选择加热回流提取方式,同时调整和优化展开剂类型和比例,最终选择环己烷-乙酸乙酯-二乙胺(12:10:1)二次展开系统。同时将川贝母与伊犁贝母、平贝母、湖北贝母及浙贝母等常见伪品进行比较,从薄层色谱信息上可以看出川贝母对照药材与川贝母

表2 回收率测定结果

序号	取样量/g	样品中胆红素的量/mg	加入胆红素的量/mg	测得胆红素的量/mg	回收率/%
1	0.757 5	0.392 4	0.409 6	0.814 9	103.14
2	0.753 9	0.390 6	0.409 6	0.810 3	102.48
3	0.756 7	0.392 0	0.409 6	0.820 6	104.63
4	0.755 7	0.391 5	0.409 6	0.814 4	103.24
5	0.754 4	0.390 8	0.409 6	0.810 5	102.46
6	0.758 6	0.393 0	0.409 6	0.805 7	100.76

注:胆红素平均回收率为102.78%,相对标准差(RSD)=1.13%。

斑点信息相似,斑点较少,且颜色较浅,与其他贝母信息斑点差距较大,伊犁贝母同时具有 a、b、c、d 4 个信息斑点,且颜色较深;企业 A 提供的川贝母药材与该企业样品 10~12 与伊犁贝母信息斑点相似,初步判定该企业投料存在质量问题。将图谱导入 ChemPatern 软件,对川贝母药材(h)、伊犁贝母药材(d)、企业 A 样品(a、b、c)及企业 B 样品(e、f、g)进行聚类分析,结果企业 A 样品(a、b、c)与伊犁贝母聚成一类,进一步说明企业投料存在质量问题。

中国药典 2020 年版人工牛黄含量测定胆红素采用紫外分光光度法,该法干扰较大,专属性较差,故本研究参照牛黄含量测定胆红素含量测定方法。同时考察供试品超声、回流两种不同的处理方法,结果一致,从操作简捷的角度考虑,最终选择了回流的供试品处理方法。含量测定结果显示,各样品之间含量差异较小,质量较为稳定。

(本文图 1~3 见插图 6-3)

参考文献

- [1] 姚长良,张建青,毕启瑞,等. 中药质量标准和检测技术研究及应用[J]. 中国食品药品监管, 2021(9): 106-115.
- [2] XIE DS, PENG W, CHEN JC, et al. A novel method for the discrimination of hawthorn and its processed products using an intelligent sensory system and artificial neural networks [J]. Food Sci

Biotechnol, 2016, 25(6): 1545-1550.

- [3] 邓哲,荆文光,刘安. 薄层色谱法在当前中药质量标准中的应用探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 201-206.
- [4] 赵宝颖. 浅析中药牛黄质量问题及鉴别[J]. 消费导刊, 2021(20): 1, 3.
- [5] 赵丽娜,籍学伟,王玉华. 蒙成药小儿清肺八味丸的质量控制方法研究[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(3): 27-32.
- [6] 胡晓茹,刘晶晶,戴忠,等. 含牛黄中成药的质量控制现状[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(17): 1374-1379.
- [7] 霍会霞,孙慧,张云封,等. 中药沉香药理作用和质量控制研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(2): 152-155, 159.
- [8] 彭德乾,王灿红,刘洋洋,等. 沉香的化学成分及其药理活性的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 358-365.
- [9] 刘薇,张文娟,程显隆,等. 中药川贝母质量控制方法研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(2): 41-46.
- [10] 兰青阔,赵新,陈锐,等. 基于 LAMP 的中药材川贝母真伪鉴别方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 551-556.
- [11] 张志勇,杨洁,齐泽民. 川贝母的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 9-13.
- [12] 黄漠然,赵文靖,李晋生,等. 牛黄及其代用品化学成分、分析方法和药理作用研究进展[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1116-1123.
- [13] 李美芳,刘敏,肖丽和,等. 氨金黄敏颗粒中人工牛黄的胆红素含量测定[J]. 中国药品标准, 2021, 22(4): 367-374.
- [14] 石岩,魏锋,吕宝俊,等. 培植牛黄中胆红素的测定及含量考察研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2852-2856.

(收稿日期:2021-11-03,修回日期:2022-02-08)

引用本文:金凤华,程庆兵,刘业飞,等. 中药材蛇莓标准关键控制指标研究[J]. 安徽医药, 2022, 26(6): 1098-1101.

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.008.

◇ 药学研究 ◇



中药材蛇莓标准关键控制指标研究

金凤华¹,程庆兵¹,刘业飞¹,叶红兵¹,叶玲²

作者单位:¹合肥市食品药品检验中心,安徽 合肥 230088;

²复旦大学附属肿瘤医院闵行分院,上海 200240

通信作者:刘业飞,男,主任中药师,研究方向为中药质量分析,Email:Liuyf2088@163.com

摘要: 目的 建立中药材蛇莓的薄层色谱鉴定与含量测定方法,对其质量控制的关键性指标进行定性定量研究。方法 该研究于 2020 年 11 月至 2021 年 8 月,采用薄层色谱法定性鉴别蛇莓中的熊果酸;用高效液相色谱法(HPLC)对蛇莓中的鞣花酸含量进行测定。结果 不同产地批次蛇莓药材的薄层色谱斑点清晰,且供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显示相同颜色斑点;鞣花酸在进样量 2.0~20.0 μg 范围内有良好的线性关系($r=1.0$),平均加样回收率为 99.21%,相对标准差(RSD)=1.8%($n=10$)。结论 该定性定量方法简单、可行,重复性好、专属性强,可用于中药材蛇莓的质量控制。

关键词: 蛇莓; 薄层色谱; 色谱法,高压液相; 熊果酸; 鞣花酸

Study on the key control index of *Duchesneae Indicae* Herba standard

JIN Fenghua¹, CHENG Qingbing¹, LIU Yefei¹, YE Hongbing¹, YE Ling²

Author Affiliations:¹Hefei Food and Drug Inspection Center, Hefei, Anhui 230088, China; ²Minhang Branch, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200240, China