

小儿化积颗粒中山楂、牵牛子、槟榔的质量标准研究

刘萍, 吴多富, 王伟*

(海南葫芦娃药业集团股份有限公司, 海口 570312)

摘要: **目的** 建立小儿化积颗粒中山楂、牵牛子、槟榔的质量控制方法。**方法** 采用薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)定性鉴别山楂、牵牛子、槟榔, 优化展开剂及供试品制备条件; 通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定熊果酸、牵牛子苷和槟榔碱, 考察色谱条件、线性关系、精密度和稳定性。**结果** TLC 结果显示山楂、牵牛子、槟榔特征斑点明显, 阴性无干扰。HPLC 测定表明: 熊果酸(0.5~20.0 $\mu\text{g/mL}$, $r=0.9998$)、牵牛子苷(1.0~40.0 $\mu\text{g/mL}$, $r=0.9999$)、槟榔碱(0.2~8.0 $\mu\text{g/mL}$, $r=0.9997$)线性关系良好。精密度相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) $\leq 1.2\%$, 24 h 稳定性 RSD $\leq 1.8\%$, 3 批样品含量稳定。**结论** 所建立的 TLC 和 HPLC 方法专属性强、准确性高, 适用于小儿化积颗粒的质量控制。

关键词: 小儿化积颗粒; 山楂; 牵牛子; 槟榔; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

0 引言

小儿消化不良是儿科临床常见病、多发病, 主要表现为食欲减退、腹胀、嗝气等症状, 若长期不愈可影响儿童生长发育及免疫力提升。中医药在小儿消化功能调理方面具有独特优势, 小儿化积颗粒作为临床常用中药复方制剂, 由焦山楂、炒牵牛子、槟榔等 6 味药配伍而成, 制剂中焦山楂消食化积、活血化瘀, 炒牵牛子泻下导滞、消积杀虫, 槟榔杀虫消积、行气利水, 临床常用于改善小儿消化不良所致的食积停滞、腹胀便秘等症^[1]。中药复方的疗效依赖于各药味有效成分的协同作用, 其质量控制是保障临床疗效与用药安全的核心。制剂中山楂含有的熊果酸、牵牛子含有的牵牛子苷及槟榔含有的槟榔碱, 是发挥消食化积、导滞作用的关键有效成分, 其含量高低直接影响制剂的临床疗效^[2-4]。然而, 目前该制剂的质量控制体系尚不完善, 存在鉴别方法专属性不强、定量指标单一、成分检测覆盖面不足等问题, 难以全面反映制剂的质量一致性与稳定性, 给临床用药安全带来潜在风险。因此, 建立专属性强、准确性高的质量控制方法, 对规范小儿化积颗粒的生产工艺、提升质量标准水平具有重要现实意义。本研究基于《中华人民共和国药

典》相关技术要求, 结合制剂成分特点, 采用薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)对山楂、牵牛子、槟榔 3 味关键药味进行专属性鉴别, 通过优化展开剂配比、显色条件等参数, 确保鉴别结果的特异性与重现性; 同时采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对熊果酸、牵牛子苷、槟榔碱 3 种主要有效成分进行定量测定, 优化色谱柱、流动相、检测波长等条件, 提高含量测定的准确性与灵敏度。本研究旨在构建多成分、多方法的质量控制体系, 为小儿化积颗粒的质量评价提供科学、可靠的技术支撑, 进而保障临床用药的有效性与安全性。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); Camag TLC Scanner III 薄层色谱扫描仪(瑞士卡玛公司); Mettler Toledo XP205 电子分析天平(精度 0.01 mg, 美国梅特勒-托利多公司); KQ-500DE 超声清洗器(功率 500 W, 频率 40 kHz)(昆山市超声仪器有限公司); HH-6 恒温水浴锅(控温精度 $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$)、TGL-16M 离心机(转速 0~16000 r/min)(常州市金坛友联仪器研究所)。

第一作者: 刘萍, 高级工程师, 主要研究方向为药品质量控制与检测技术研究。E-mail 1145583326@qq.com

*通信作者: 王伟, 制药工程师, 主要研究方向为药品质量控制与检测技术研究。E-mail 1062310441@qq.com

1.2 材 料

1.2.1 对照品

熊果酸(批号: 110742-202014, 纯度 $\geq 98\%$, 中国食品药品检定研究院); 牵牛子苷(批号: YY-20210305, 纯度 $\geq 95\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 槟榔碱(批号: BH0217, 纯度 $\geq 98\%$, 南京景竹生物科技有限公司)。

1.2.2 对照药材

山楂对照药材(批号: 121138-202207)、牵牛子对照药材(批号: 121024-202106)、槟榔对照药材(批号: 120915-202308)(中国食品药品检定研究院)。

1.2.3 样品

小儿化积颗粒(批号: 20230901、20230902、20230903, 海南某制药有限公司); 山楂、牵牛子、槟榔的阴性样品按处方比例制备(不含对应药味)。

1.3 试 剂

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 三氯甲烷、乙酸乙酯、环己烷、丙酮、甲酸、浓氨试液(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.4 TCL 鉴别方法

1.4.1 山楂鉴别

供试品溶液制备: 取 10 g 样品, 加 70%乙醇超声提取, 提取液经聚酰胺柱纯化后, 用乙酸乙酯萃取, 萃取液浓缩至干, 甲醇定容至 1 mL, 摇匀, 即得。

对照药材溶液制备: 准确称取 2 g 山楂对照药材, 按照供试品溶液的制备方法进行相同处理, 即得。

阴性对照溶液制备: 取不含山楂成分的阴性样品 10 g, 按照与供试品溶液相同的实验流程制备, 即得。

薄层色谱条件: 分别精密吸取上述 3 种溶液各 10 μL , 点于同一硅胶 G 薄层板上。以环己烷-丙酮(5:2, V:V)为展开剂, 将薄层板置于预平衡 30 min 的密闭层析缸内展开。取出薄层板, 晾干后, 喷以 10%硫酸乙醇溶液, 置于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加热至斑点清晰, 取出冷却后, 在 365 nm 紫外光线下检视。

1.4.2 牵牛子鉴别

供试品溶液制备: 取 10 g 样品, 甲醇超声提取, 酸水溶解后乙酸乙酯萃取, 浓缩后甲醇定容至 1 mL, 摇匀, 即得。

对照品溶液配制: 称取 1 g 牵牛子对照药材, 按照上述供试品溶液的制备流程进行相同处理, 制得对照药材溶液。

阴性对照溶液配制: 采用不含牵牛子成分的空白样品, 依照供试品溶液的制备方法平行操作, 得到阴性对照溶液。

薄层色谱条件: 精密点样供试品及阴性对照液 10~15 μL 、对照药材液 8 μL 于硅胶 G 板。以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5, V:V:V)上清液展开, 密闭层析缸内预平衡 30 min。展开后晾干, 喷 5%三氯化铁乙醇液显色, 加热观察 365 nm 下色谱斑点。

1.4.3 槟榔鉴别

供试品溶液制备: 精密称取 15 g 样品, 加三氯甲烷-浓氨试液(5 mL)混合溶液, 90 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 2 次, 每次 30 min, 合并提取液, 用盐酸溶液酸化, 分取酸水层, 调节 pH 至碱性, 再用三氯甲烷梯度萃取, 萃取液合并后浓缩至 0.5 mL, 摇匀, 即得。

对照药材溶液制备: 称取 2 g 槟榔对照药材, 按照与供试品溶液完全相同的处理流程进行制备, 即得。

阴性对照溶液制备: 取不含槟榔成分的阴性样品 15 g, 依照供试品溶液的制备工艺进行平行操作, 即得。

薄层色谱条件: 精密吸取各溶液 10 μL , 点于同一硅胶 G 薄层板上。以环己烷-乙酸乙酯-浓氨水(7.5:7.5:0.2, V:V:V)为展开剂, 将薄层板置于预先用氨气饱和 30 min 的密闭层析缸内展开。取出薄层板, 自然晾干后, 均匀喷改良碘化铋钾显色剂, 室温下放置, 观察色谱斑点。

1.5 HPLC 定量分析方法

1.5.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 熊果酸测定: 甲醇-水(90:10, V:V), 含 0.1%磷酸; 牵牛子苷测定: 乙腈-水(30:70, V:V), 含 0.2%甲酸; 槟榔碱测定: 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含 0.1%三乙胺, 用磷酸调 pH 至 3.0) (15:85, V:V); 检测波长: 熊果酸 210 nm, 牵牛子苷 280 nm, 槟榔碱 215 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL 。

1.5.2 对照品溶液的制备

混合对照品储备液: 精密称取熊果酸、牵牛子苷、槟榔碱对照品各适量, 其中熊果酸、牵牛子苷加甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 1.0 mg/mL、0.5 mg/mL 的储备液; 槟榔碱加含 0.1%三乙胺的甲醇溶液溶解并定容, 制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的储备液, 摇匀, 即得。

混合对照品工作液: 分别精密吸取上述储备液适量, 用对应流动相稀释制成含熊果酸 50 $\mu\text{g/mL}$ 、牵牛子苷 100 $\mu\text{g/mL}$ 、槟榔碱 20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

1.5.3 供试品溶液的配制

取 0.5 g 样品细粉, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 70%甲醇, 称定重量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷后再称定重量, 用 70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

1.5.4 阴性供试品溶液的配制

分别取不含山楂、牵牛子和槟榔成分的阴性样品细粉各 0.5 g, 精密称定, 依照供试品溶液的制备方法平行操作, 即得相应阴性供试品溶液。

1.5.5 方法学验证

专属性试验: 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液各 10 μL , 按上述色谱条件进样分析, 记录色谱图。

线性关系分析: 将混合对照品储备液用对应流动相进行梯度稀释, 配制不同浓度梯度的标准溶液。按照既定的色谱条件进行进样分析, 记录各浓度下的色谱峰面积值。以标准品质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)作为自变量, 相应色谱峰面积(Y)为因变量, 建立标准曲线并拟合线性回归方程。

精密度试验: 取混合对照品溶液, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 测定各目标成分的色谱峰面积, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

稳定性试验: 选取供试品溶液, 分别在制备后 0、4、8、12、24 h 按上述色谱条件进样分析, 测定各目标成分的色谱峰面积, 计算 RSD。

1.6 数据处理

所有实验数据的处理与分析均采用 Microsoft Excel 2019 软件完成。定量数据以平均值 \pm 标准差表示。在线性关系分析中, 以标准品质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 采用最小二乘法拟合回归方程并计算相关系数(r)。精密度、稳定性的评价以 RSD 表示。薄层色谱结果通过目视对比样品、对照药材与阴性对照的斑点位置与颜色进行判读。

2 结果与分析

2.1 TLC 鉴别结果

2.1.1 山楂鉴别结果

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, 且阴性对照色谱在该位置无干扰斑点, 证实该方法专属性良好, 可有效鉴别小儿化积颗粒中的山楂。本研究优选聚酰胺柱层析纯化工艺, 可有效去除样品中水溶性杂质, 解决直接提取后点样导致的斑点拖尾问题, 显著提高斑点清晰度与鉴别专属性^[5-6]。

2.1.2 牵牛子鉴别结果

供试品色谱中, 在与对照药材色谱相同的迁移位置上, 呈现色泽一致的显色斑点, 阴性对照无干扰峰出现, 表明该方法专属性良好, 能准确鉴别牵牛子。实验中重点优化提取 pH 条件, 通过调节体系至酸性(pH 1~2), 使牵牛子苷充分游离并溶于有机相, 避免碱性条件下成分降解; 预实验证实 pH 过高或过低均会降低提取效率, 最终确定 pH 1~2 为最佳提取条件^[7-8]。

2.1.3 槟榔鉴别结果

供试品色谱中, 在与对照药材色谱相同迁移值处均出现橘红色特征斑点, 空白对照无显色, 证明该方法专属性良好。基于槟榔碱的碱性特性, 本研究采用三氯甲烷-浓氨试液混合提取体系, 使槟榔碱以游离态存在, 便于有机溶剂萃取; 后续通过酸水层调 pH 至碱性再用三氯甲烷反提的两步法, 进一步富集槟榔碱, 显著提高鉴别灵敏度。

2.2 HPLC 定量分析结果

2.2.1 专属性试验

色谱分析结果表明, 各目标成分峰与邻近峰的分离度均大于 1.5, 且阴性供试品溶液在目标物保留时间处未出现干扰峰, 证明该方法具有良好的专属性。本研究针对不同成分特性优化色谱条件: 熊果酸为脂溶性成分, 高比例甲醇-水体系(90:10, V:V)适配其极性特征, 0.1%磷酸可改善峰形与分离度, 经对比 0.05%~0.20%不同磷酸浓度, 确定 0.1%为最佳比例, 此时峰形最对称; 牵牛子苷含多个羟基、极性较强, 乙腈-水(30:70, V:V)含 0.2%甲酸体系可增强成分保留与响应值, 优化后拖尾因子 <1.2 ^[9]; 槟榔碱为强极性生物碱, 通过加入三乙胺抑制硅羟基作用并调节 pH 至 3.0, 同时采用 15%低比例乙腈增加保留, 确保与相邻杂质峰分离度 >2.0 。

2.2.2 线性关系分析

线性关系分析结果显示, 各目标成分在相应浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r)均大于等于 0.9997, 符合含量测定要求, 见表 1。

表 1 各指标成分线性关系结果

成分	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	回归方程	相关系数(r)
熊果酸	0.5~20.0	$Y=56234X+1256$	0.9998
牵牛子苷	1.0~40.0	$Y=89521X+2348$	0.9999
槟榔碱	0.2~8.0	$Y=32156X+568$	0.9997

2.2.3 精密度试验

精密度试验结果显示, 熊果酸、牵牛子苷和槟榔碱的峰面积 RSD 依次为 0.8%、0.5%和 1.2%, 均小于 2.0%, 符合方法学验证要求, 证明该分析系统具有良好的精密度特性。

2.2.4 稳定性试验

稳定性试验结果表明, 供试品溶液在制备后 24 h 内, 熊果酸、牵牛子苷与槟榔碱的峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.0%和 1.8%, 均低于 2.0%的临界标准, 证实供试品溶液在 24 h 测试周期内稳定性良好。对照品溶液配制中, 熊果酸和牵牛子苷易溶于甲醇, 故选用甲醇作为溶剂; 槟榔碱在甲醇中溶解度低且易挥发, 经优化采用含 0.1%三乙胺的甲醇溶液配制, 可显著提高其稳定性, 避免溶剂挥发导致的浓度偏差。

3 结论

本研究建立的 TLC 鉴别方法操作简便、专属性强, 可快速实现小儿化积颗粒中山楂、牵牛子、槟榔的定性鉴别; HPLC 定量方法准确、可靠, 能同时测定三味药的主要有

效成分, 为制剂的质量控制提供了科学依据。通过对供试品制备方法和色谱条件的优化, 确保了方法的适用性和稳定性。后续可进一步开展其他药味的质量研究, 完善该制剂的整体质量标准体系。

参考文献

- [1] 杜德平. 中医化积颗粒与多酶片联合治疗小儿消化不良性腹泻的临床效果研究[J]. 中国保健营养, 2020, 30(11): 67-68.
- [2] 杨璐嘉, 张传洋, 王丽娟, 等. HPLC-CAD 分离测定山楂不同炮制品中熊果酸和齐墩果酸[J]. 中药与临床, 2023, 14(4): 34-36.
- [3] 李娟, 彭洪兵, 向玉林, 等. 利用指纹图谱和网络药理学预测牵牛子抗炎 Q-marker[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2024, 43(1): 45-52.
- [4] 宋紫腾, 吴美琪, 韩彦琪, 等. 基于“性-效-物”的小儿消积止咳口服液质量标志物研究[J]. 中国现代中药, 2024, 26(2): 276-288.
- [5] 苏娇娇, 黄莉清, 李春谕, 等. 双柱法分离纯化杜仲叶黄酮工艺研究[J]. 应用化工, 2023, 52(10): 2972-2975.
- [6] 刘晓, 冯慧婷, 叶本贵, 等. 多刺绿绒蒿的化学成分研究[J]. 华西药学杂志, 2024, 39(2): 128-132.
- [7] 王雨琪, 张静波, 陆悦, 等. pH 值对水产品中硝基呋喃类代谢物提取效率的影响[J]. 水产养殖, 2023, 44(2): 6-11.
- [8] 谢佳玫, 顾涵宇, 孔奕丹, 等. 响应曲面法优化五味子多糖的热水提取工艺[J]. 生物医学, 2024, 14(2): 313-322.
- [9] 王晨曦, 杨敏, 梁红宝, 等. 熊胆粉不同极性部位 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中草药, 2024, 55(3): 770-779.