

西帕依固龈液质量标准研究

欧亮苗¹ 李柯翱² 季志红² 哈木拉提·吾甫尔³ 田树革³

(1 新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐, 830054; 2 新疆奇康哈博维药股份有限公司, 乌鲁木齐, 830026;

3 新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐, 830054)

摘要 目的:建立西帕依固龈液的质量标准。方法:以没食子酸为指标,采用 TLC 法对西帕依固龈液进行定性鉴别,采用福林酚试剂法和高效液相色谱法分别测定西帕依固龈液中总多酚和没食子酸的含量。结果:使用硅胶 GF₂₅₄ 薄层板,甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6:3:1)为展开剂,以 1% 的三氯化铁乙醇溶液为显色剂,在薄层色谱中检出西帕依固龈液中的没食子酸。10 个批次的西帕依固龈液中总多酚平均含量为 9.77 mg/mL, RSD 为 1.58%。采用 Shim-pack PREP 色谱柱,流动相为甲醇-1% 磷酸,检测波长为 273 nm,西帕依固龈液中没食子酸与其他成分分离度良好。结论:该方法简便、准确、专属性强,能够有效控制西帕依固龈液的质量,为西帕依固龈液的质量标准完善提供依据和参考。

关键词 西帕依固龈液;质量标准;薄层色谱鉴别;福林酚法;高效液相色谱

Quality Standard Study of Xipayi Colluturymaxillary

Ou Liangmiao¹, Li Keao², Ji Zhihong², Halmuart · Upur³, Tian Shuge³

(1 College of TCM, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2 Xinjiang Qikang Habo Uyghur Medicine Limited Liability Company, Urumqi 830026, China; 3 The Central Laboratory of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract Objective: To establish quality control system of Xipayi Colluturymaxillary. **Methods:** The Xipayi Colluturymaxillary was identified by TLC method with gallic acid as index. Folin Ciocalteau method and HPLC method were used to measure the content of total polyphenols and gallic acid in Xipayi Colluturymaxillary separately. **Results:** On the silica gel GF₂₅₄ thin layer plate, developed with mixture of toluene- acetic ether- formic acid(6:3:1) and with 1% Ferric trichloride ethanol solution as color developing agent, gallic acid was detected in the Xipayi Colluturymaxillary. Total polyphenol content of 10 batches of Xipayi Colluturymaxillary in the average was 9.77 mg/ml, the relative standard deviation (RSD) was 1.58%. Gallic acid was separated well in Shim-pack PREP chromatographic column with isocratic elution by methanol-1% phosphoric acid and detected at wave length of 273 nm. **Conclusion:** The method is simple, accurate and specific, which can control the quality of Xipayi Colluturymaxillary effectively, providing basis and reference for improving the quality standard of Xipayi Colluturymaxillary.

Key Words Xipayi Colluturymaxillary; Quality standard; TLC; Folin-ciocalteau; HPLC

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.04.029

西帕依固龈液是以没食子为药材的制剂,具有健齿固龈、清血止痛功能。用于牙周疾病引起的牙齿酸软、咀嚼无力、松动移位,牙龈出血以及口舌生疮、咽喉肿痛,口臭烟臭^[1-4]。据报道,西帕依固龈液在口腔护理中具有理想的临床应用价值^[5-7]。没食子为壳斗科植物没食子树(*Quercus Infectoria* Oliv.)幼枝上的干燥虫瘿,由没食子蜂科昆虫没食子蜂(*Cynips gallae-tinctoriae* Oliv.)的幼虫寄生而形成^[8-9]。目前企业对西帕依固龈液质量控制方法还不完善,只对西帕依固龈液进行性状、薄层鉴别,且薄层鉴别的 Rf 值较大,没有对主要成分和活性成分的含量进行测定,从而不能有效地监控西帕依固

液的质量。本研究的目的是提供一种简单、快速、准确的西帕依固龈液质量检测方法。该方法步骤依次为:先采用薄层色谱法鉴别西帕依固龈液中的没食子酸;再采用福林酚试剂法测定西帕依固龈液中总多酚的含量;最后采用高效液相色谱法测定西帕依固龈液中没食子酸的含量^[10-14]。

1 材料与方法

1.1 试剂 西帕依固龈液(新疆奇康哈博维药股份有限公司),没食子酸标准品(天津市光复精细化工研究所,含量:99%),没食子药材(新疆奇康哈博维药股份有限公司),所有试剂均为分析纯,甲醇为色谱纯(飞世尔实验器材有限公司),水为纯净水(娃

基金项目:自治区科技厅重大专项《新疆维吾尔药与特色天然药物创制及产业化示范》—西帕依固龈液技术改造及产业化示范(编号:201130105-5)

作者简介:欧亮苗(1990—),女,2013 级在读硕士研究生,研究方向:中药活性成分筛选, E-mail:675063286@qq.com

通信作者:田树革(1968—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药化学与质量标准, E-mail:tsgyz@sina.com

哈哈集团有限公司)。随机抽取 10 批次的西帕依固龈液做为样品,其样品批号分别为 111002、111005、111006、111007、111008、111009、111030、111039、111040、111041。

1.2 仪器 LC-6AD 高效液相色谱仪, CBM-20A 色谱工作站, SPD-20A 型紫外检测器, SIL-20A 型自动进样器, CTO-10ASvp 型柱温箱(日本岛津公司), KQ-5200DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), ZF-6 型三用紫外分析灯(上海嘉鹏科技有限公司), TH-II 型薄层加热器(武汉药科新技术开发有限公司), GBC Cintra-40 型紫外可见分光光度计(澳大利亚 GBC 科学仪器公司), B-260 型水浴锅(上海亚荣生化仪器厂), XS105 型十万分之一电子天平(德国梅特勒-托利多仪器有限公司), AL04 型万分之一电子天平(德国梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 对照品溶液的制备 取没食子酸对照品,加甲醇制成每 1 mL 含各 2 mg 的溶液,作为对照溶液 A。

2.1.2 对照药材溶液的制备 取没食子对照药材 0.1 g,加甲醇 20 mL,超声处理 25 min,滤过,滤液浓缩至 2 mL,作为对照药材溶液 B。

2.1.3 供试品溶液的制备 取西帕依固龈液直接作为供试品溶液。

2.1.4 点样与展开 吸取对照溶液 A 2 μ L,对照溶液 B 和供试品溶液各 4 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(体积比为 6:3:1)为展开剂,展开后,取出,干燥后置于紫外灯波长 254 nm 下检视,供试品色谱中,在与没食子酸和没食子药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。喷以质量浓度为 1% 的三氯化铁乙醇溶液,供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的斑点(使用 TH-II 型薄层加热器)。

2.2 总多酚含量测定

2.2.1 测定波长的选择 取样品溶液和对照品溶液 A 适量,在紫外分光光度计中进行全波长扫描,二者均在 760 nm 附近有最大吸收,因此选择 760 nm 为测定波长。

2.2.2 标准溶液的配制 精确称取 2 mg 没食子酸标准品,置于 10 mL 容量瓶中,加适量水,超声溶解后,放冷,加水稀释至刻度,摇匀即得 0.2 mg/mL 的没食子酸标准溶液。

2.2.3 福林酚试剂的制备^[15] 称量 10 g 钨酸钠和

2.5 g 钼酸钠,用 70 mL 蒸馏水溶于 250 mL 回流瓶中,加入 5 mL 磷酸和 10 mL 浓盐酸,混匀,煮沸回流 2 h,加入 15 g 硫酸锂,5 mL 蒸馏水和 3 滴溴水,开口沸腾 15 min(至溴水挥尽为止),放置冷却,定容至 100 mL,滤过,置棕色瓶中,保存备用。

2.2.4 标准曲线的绘制 准确吸取 50 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L 的没食子酸标准溶液,分别置于具塞试管中,加相应的水定容至 8 mL,摇匀,先向各试管中加 0.5 mL 的福林酚试剂,再在 1~8 min 内加入 1.5 mL 的质量百分比为 15% 的 Na₂CO₃,溶液摇匀,加塞拧紧,在 70 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 后迅速冷却,用分光光度计测量其在 760 nm 处的吸光度。

2.2.5 样品含量的测定方法 准确吸取 0.5 mL 西帕依固龈液样品置于 10 mL 容量瓶中,加入 1 mL 福林酚试剂,摇匀,再加入 2 mL 15% Na₂CO₃,定容至 10 mL,溶液于 70 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 后迅速冷却,离心除去沉淀物,吸取上层清液,用分光光度计测量其在 760 nm 处的吸光度。

2.3 没食子酸含量测定

2.3.1 色谱条件及系统适用性试验^[16] Shim-pack PREP 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m),流动相: A = 甲醇、B = 质量浓度为 0.1% 的磷酸,流速 1 mL/min,检测波长为 273 nm,柱温为 25 $^{\circ}$ C。采用梯度洗脱程序,随时间调整流动相中 B 的体积百分数: 0~7 min,流动相 B 从 83% 线性降至 70%; 7~10 min,流动相 B 从 70% 线性增至 85%; 10~15 min,流动相 B 从 85% 线性降至 15%; 15~20 min,流动相 B 从 15% 线性增至 83%。

2.3.2 标准溶液制备 精确称取 0.41 mg 没食子酸标准品,加甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,配成浓度为 0.041 mg/mL 的标准溶液,过 0.45 μ m 的微孔滤膜,备用。

2.3.3 标准曲线的绘制 分别吸取标准溶液 5 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、9 μ L,进样,按上述的色谱条件测定色谱峰面积。

2.3.4 样品溶液的制备 吸取西帕依固龈液 200 μ L,加水定容至 10 mL 容量瓶中,过 0.45 μ m 的微孔滤膜,得到样品溶液。

2.3.5 样品含量的测定 按上述的色谱条件测定相应的色谱峰面积,并计算出西帕依固龈液中没食子酸的含量。

3 结果

3.1 薄层色谱鉴别 如图 1 所示,采用所述的方法

可快速、准确、定性的确定西帕依固龈液中的主要成分没食子酸,采用紫外灯与显色剂显色结果一致。

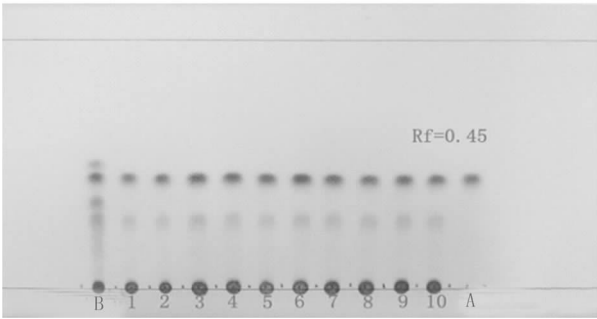


图1 三氯化铁显色的薄层色谱图

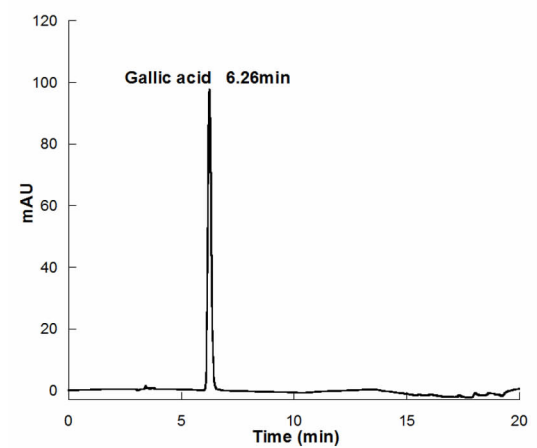


图2 没食子酸标品的高效液相色谱图

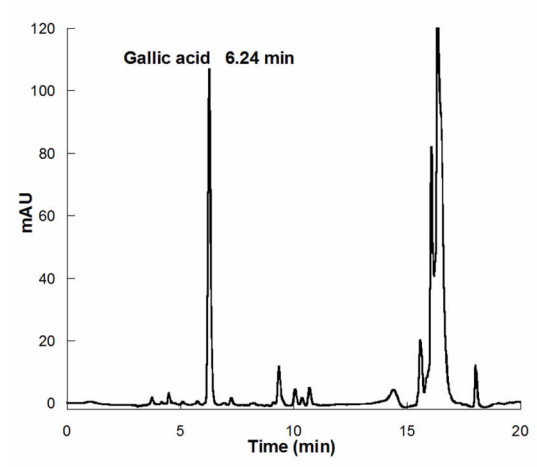


图3 西帕依固龈液的高效液相色谱图

3.2 总多酚含量测定

3.2.1 标准曲线的建立 准确吸取 50 μL 、100 μL 、150 μL 、200 μL 、250 μL 、300 μL 的没食子酸标准溶液,分别置于具塞试管中,加相应的水定容至 8 mL,摇匀,先向各试管中加 0.5 mL 的福林酚试剂,再在 1~8 min 内加入 1.5 mL 的质量百分比为 15% 的 Na_2CO_3 ,溶液摇匀,加塞拧紧,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 后迅速冷却,用分光光度计测量其在 760 nm 处的吸光度。以吸光度为纵坐标,没食子酸浓度为横坐标,

绘制标准曲线。得到线性回归方程 $Y = 118.4X + 0.0502$, $r = 0.9994$,在所测量的没食子酸浓度范围内浓度与吸光度呈良好的线性关系。

3.2.2 样品含量的测定 准确吸取样品溶液 4 份,按“1.3.2.5”项下测定方法测定样品溶液吸光度,并根据标准曲线计算样品溶液中多酚含量,结果见表 1。

表1 样品含量测定结果 (mg/mL, n=4)

样品编号	总多酚含量	RSD%	没食子酸含量	RSD%
111002	10.14	2.99	2.14	1.23
111005	8.54	2.50	1.96	0.95
111006	9.63	1.09	2.81	1.32
111007	10.35	1.73	3.13	2.12
111008	10.30	1.02	3.36	1.87
111009	8.13	1.13	2.59	1.43
111030	11.24	2.44	4.06	2.23
111039	10.69	0.65	3.71	1.76
111040	9.70	1.07	3.17	1.53
111041	9.02	1.23	2.98	1.15

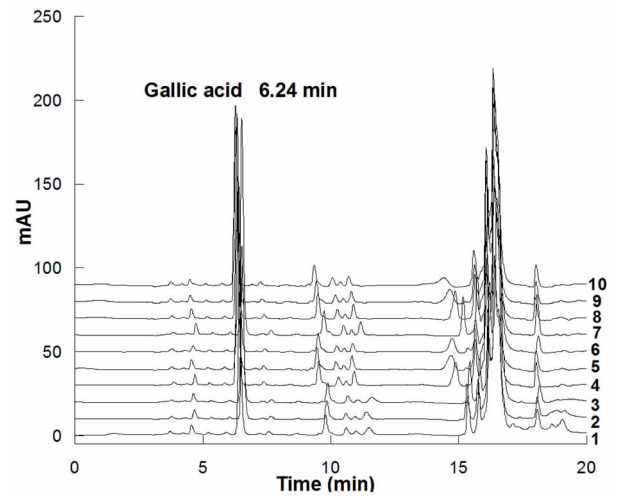


图4 不同批次西帕依固龈液的高效液相色谱图

3.3 没食子酸含量测定

3.3.1 标准曲线的建立 分别准确吸取标准溶液 5 μL 、6 μL 、7 μL 、8 μL 、9 μL ,进样,按上述的色谱条件测定色谱峰面积。以浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归,得到回归方程 $Y = 6883468.29X + 511517.5$, $r = 0.9991$ 。

3.3.2 样品含量的测定 准确吸取样品溶液 4 份,按“1.3.3.1”项下测定方法测定相应的色谱峰面积,并根据标准曲线计算样品溶液中没食子酸含量,结果见表 1。

4 讨论

薄层色谱鉴别结果显示,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(为 6:3:1)为展开剂,薄层斑点无拖尾,分离较

好,Rf 较适合。通过对照药材和西帕依固龈液比较,发现西帕依固龈液的主要斑点在药材中均可以找到,说明西帕依固龈液和药材的主要化学成分一致,西帕依固龈液漱口剂达到了将药材中的主要化学成分转移到制剂中的目的。

采用福林酚试剂法测定西帕依固龈液中总多酚的含量,反应原理为酚类化合物在碱性条件下可将钨钼酸还原,生成蓝色的化合物,颜色的深浅与酚含量呈正相关。没食子酸为没食子药材中主要酚类成分之一,选取没食子酸为对照品,采用福林酚试剂法测定总多酚含量,为有效控制西帕依固龈液的质量提供较为简便的检测方法。

采用 Shim-pack PREP 色谱柱,流动相为甲醇-1% 磷酸,流速 1 mL/min,检测波长为 273 nm,柱温为 25 ℃,并采用梯度洗脱程序进行含量测定,10 个批次的西帕依固龈液中没食子酸平均含量为 2.99 mg/mL,与其他成分分离度较良好。

彭燕^[17]等报道采用差示分光光度法测定西帕依固龈液中没食子酸的含量。秦贻强^[18]等报道采用反相高效液相色谱法进行没食子酸含量测定。本研究逐一对西帕依固龈液进行定性、定量分析,所采用的方法简单、快速、准确,通过对没食子酸的定性和定量分析,实现对西帕依固龈液中主要成份的监控,再配合总多酚含量的测定,从而建立西帕依固龈液的质量标准,为有效评价西帕依固龈液成品质量提供依据,同时有利于企业生产过程中的质量控制。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:123.
- [2] 孙媛元. 西帕依固龈液对口腔白色念珠菌体外溶血活性研究[J]. 中国卫生产业,2014(9):27-28.
- [3] 王向,庞晓燕. 西帕依固龈液辅助治疗牙周炎疗效观察[J]. 山西医药志,2013,42(21):1284-1285.

- [4] 常瑾. 西帕依固龈液应用于单纯性牙龈炎与牙周炎的临床疗效与菌斑抑制情况分析[J]. 现代妇女(医学前沿),2014(5):32-32,19.
- [5] 李文媚,李映芳. 生理盐水与西帕依固龈液在门诊口腔护理中的应用[J]. 齐鲁护理杂志,2014,20(7):93-94.
- [6] 张静,孙莲莲. 西帕依固龈液在胃肠减压患者口腔护理中的应用[J]. 包头医学,2012,36(2):115-116.
- [7] 李婷,吴佩玲,闫亮,等. 含漱西帕依固龈液与 1% 双氧水对减少牙体治疗中细菌性气雾的临床研究[J]. 新疆医科大学学报,2010,33(4):459-460,462.
- [8] 木巴拉克·伊明江,布海里且木·阿里,曾灿丽,等. 维药没食子水提液的稳定性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):53-58.
- [9] H. Hapidin, H. Abdullah, I. N. Soelaiman. The potential role of quercus infectoria gall extract on osteoblast function and bone metabolism[J]. Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases,2012,2(4):82-88.
- [10] 常占瑛,马桂芝,高晓黎,等. HPLC 法测定新疆不同产地石榴皮中没食子酸的含量[J]. 新疆医科大学学报,2009,32(11):1552-1553,1556.
- [11] 李洁,张雪佳,李柯翔,等. HPLC 测定维药睡莲华中没食子酸和烟花苷含量[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(8):92-94.
- [12] 刘起中,张可可. HPLC 法测定五倍子中没食子酸的含量[J]. 中草药,2002,33(5):427.
- [13] 任源,堵年生. HPLC 测定没食子中没食子酸的含量[J]. 华西药杂志,2005,20(1):71-72.
- [14] 司马义江·阿布都热西提,阿依努尔·阿木提. 高效液相色谱法测定维吾尔药制剂西帕依固龈液中没食子酸含量[J]. 中国药业,2012,21(21):27-28.
- [15] 马美范,王新明. 福林法测定啤酒多酚含量的研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(5):93-96.
- [16] 马久太,单娜,卢新义等. HPLC 法测定冠心舒通胶囊中没食子酸的含量[J]. 世界中医药,2011,6(4):354-355.
- [17] 彭燕,苗爱东,王本富,等. 差示分光光度法测定西帕依固龈液中没食子酸的含量[J]. 中成药,2008,30(5):13-14.
- [18] 秦贻强,蔡小玲,龚勋,等. 西帕依固龈液中总鞣质和没食子酸的含量测定[J]. 中国医药科学,2012,2(5):97-98.

(2014-09-15 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 585 页)

- [22] 陈星. 呼吸检测电子鼻及其在肺癌诊断应用中的研究[D]. 杭州:浙江大学,2008.
- [23] 郑哲洲. 基于电子鼻和证素辨证的 2 型糖尿病患者病证结合气味图谱研究[D]. 福建中医药大学,2014.
- [24] 邹慧琴,韩玉,邢姝,等. 电子鼻技术及其在中药领域中的应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2012,14(6):2120-2125.

- [25] 杨瑶琨,张媛. 电子鼻鉴定技术在中药领域应用的展望[A]. 中国商品学会中药商品专业委员会. 第三届中国中药商品学术年会暨首届中药葛根国际产业发展研讨会论文集[C]. 中国商品学会中药商品专业委员会,2012:6.
- [26] 孙晓非. DFA 技术与应用研究[D]. 阜新:辽宁工程技术大学,2004.

(2014-07-19 收稿 责任编辑:张文婷)