

参黄搽剂的质量标准研究^Δ

江洁怡*,李素梅,胥爱丽,李养学(广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室,广州510095)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)11-1545-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.21

摘要 目的:为参黄搽剂质量标准的建立提供参考。方法:按2015年版《中国药典》(四部)中薄层色谱法(TLC)对参黄搽剂中的苦参、黄柏、大黄、黄芩进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定参黄搽剂中苦参碱和氧化苦参碱的含量[色谱柱为Phenomenex Luna NH₂,流动相为乙腈-无水乙醇-3%磷酸水溶液(80:10:10,V/V/V),柱温为45℃,流速为1.0 mL/min,检测波长为220 nm,进样量为5 μL]。结果:TLC结果显示,各供试品色谱与对照药材/对照品色谱相应位置上有相同颜色的对应斑点,且斑点清晰、比移值适中、分离度高,阴性对照无干扰。HPLC结果显示,苦参碱、氧化苦参碱分别在进样量为203.60~1 221.60 ng($r=0.999\ 4$)、210.08~840.30 ng($r=0.999\ 7$)范围内与其峰面积呈现出良好的线性关系;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3.0%($n=6$);平均加样回收率分别为96.03%、100.93%,RSD分别为2.55%、2.69%($n=9$)。结论:所建立方法专属性强、准确度高、重现性好,可用于参黄搽剂的质量控制。
关键词 参黄搽剂;质量标准;苦参碱;氧化苦参碱

Study on Quality Standard of Shenhuang Liniment

JIANG Jieyi, LI Sumei, XU Aili, LI Yangxue (Guangdong Institute of TCM Engineering Technology/Guangdong Key Lab of TCM Research and Development, Guangzhou 510095, China)

[6] 王成龙,赵东峰,杨志烈,等.环磷酸胺诱导的小鼠骨髓抑制模型及中药对其防治作用机制研究进展[J].世界中医药,2017,12(9):2252-2257.

[7] 姚鸿萍,陈丽梅,杨孝江,等.生血颗粒对免疫介导再生障碍性贫血模型小鼠的作用[J].西北药学杂志,2005,42(2):67-69.

[8] 张鹏,何春玲,郭雨晨,等.左归补髓生血方对再生障碍性贫血小鼠骨髓有核细胞凋亡的影响[J].安徽中医药大学学报,2018,37(4):79-82.

[9] 刘春燕,邵宗鸿.再生障碍性贫血发病机制研究进展[J].中国实用内科杂志,2016,36(5):345-349.

[10] ADES L, MARY JY, ROBIN M, et al. Long-term outcome after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia[J]. *Blood*, 2004, 103(7):2490-2497.

[11] FRICKHOFEN N, HEIMPEL H, KALTWASSER JP, et al. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia[J]. *Blood*, 2003, 101(4):1236-1242.

[12] 黄景玉,黄博.苁蓉益肾颗粒治疗肿瘤化疗后骨髓抑制的疗效[J].现代肿瘤医学,2018,26(9):1416-1420.

[13] 于波涛,王玲洁,刘天亮,等.扶正生血胶囊对化疗致小鼠骨髓抑制的保护作用[J].华西药杂志,2017,32(6):575-578.

[14] 靳艳玲,刘国彦,莫善列,等.海洋中药蛎昆一号制剂对5-Fu化疗后所致动物骨髓抑制的增效研究[J].医学信息,2018,31(21):51-55.

[15] 罗桂芳,唐娅辉,吴莉峰,等.强骨生血口服液对小鼠化疗后骨髓抑制的保护作用及机制研究[J].中国新药杂志,2017,26(22):2664-2671.

[16] 张平.益血生胶囊联合兔抗人胸腺细胞免疫球蛋白治疗再生障碍性贫血的临床研究[J].现代药物与临床,2018,33(7):1751-1754.

[17] 王茂生,杨淑莲,孙长勇,等.中药膏方治疗血液病经验体会[J].中国中医药科技,2019,26(1):48-49,155.

[18] 马萌.再生障碍性贫血的中医气化论治策略[J].中华中医药杂志,2018,33(12):5538-5541.

[19] 郭雨晨,董昌虎.再生障碍性贫血动物模型研究进展[J].临床血液学杂志,2018,31(3):407-409.

[20] 曹瑞,张波,王光建,等.丝裂霉素和5-氟尿嘧啶诱发小鼠血小板减少、白细胞减少动物模型的建立[J].西北药学杂志,2011,26(6):432-433.

[21] 程斌,翁琳,王增.化疗引起IV度骨髓抑制的临床观察与分析[J].中国药房,2010,21(14):1310-1312.

Δ 基金项目:广东省医疗机构中药制剂研发技术平台建设(No.2013B040200040);创新中药研发平台建设(No.2017A070701017)
* 助理研究员,硕士。研究方向:中药质量分析。电话:020-83482098。E-mail:blpz.jiang@163.com

(收稿日期:2018-12-27 修回日期:2019-03-06)
(编辑:林 静)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the establishment of quality standard of Shenhuang liniment. METHODS: Qualitative identification of *Sophora flavescens*, *Phellodendron chinense*, Rhei Radix Et Rhizoma and *Scutellaria baicalensis* in Shenhuang liniment were carried out by TLC according to the method of 2015 edition of *Chinese Pharmacopeia* (part IV). HPLC method was used to determine the contents of matrine and oxymatrine in Shenhuang liniment [Phenomenex Luna NH₂ column, mobile phase consisting of acetonitrile-absolute ethanol-3% phosphoric acid aqueous solution (80 : 10 : 10, V/V/V), column temperature of 45 °C, flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength of 220 nm, sample size of 5 μL]. RESULTS: Results of TLC showed that the corresponding spots of the same color were found in the corresponding positions of the chromatograms for test samples and reference substance/substance control; and the spots were clear, retardation factor was moderate, the separation degree was high, and the negative control had no interference. Results of HPLC showed that the linear range of matrine and oxymatrine were 203.60-1 221.60 ng($r=0.999\ 4$) and 210.08-840.30 ng($r=0.999\ 7$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3.0% ($n=6$). Average recovery rates were 96.03% and 100.93%, and RSDs were 2.55% and 2.69% ($n=9$). CONCLUSIONS: Established method is specific, accurate and reproducible, and can be used for quality control of Shenhuang liniment.

KEYWORDS Shenhuang liniment; Quality standard; Matrine; Oxymatrine

参黄搽剂为本院院内制剂,由苦参、黄柏、大黄、黄芩、冰片五味中药经水煎浓缩后制备而成,具有清热燥湿、解毒止痒等作用,用于治疗皮炎、接触性皮炎、痤疮及毛囊炎等病,症见皮肤红肿、瘙痒渗液,症属湿热毒蕴者均适用。作为方中君药,苦参具有多种药理活性,如抗病原微生物、抗炎、抗过敏、调节免疫和神经等^[1],而苦参碱和氧化苦参碱作为苦参中的主要药效成分,具有抗过敏^[2]、抑菌^[3-4]、抗病毒^[5-6]、抗炎^[7]、抗心律失常^[8]、抗肿瘤^[9]、抗纤维化^[10]等作用。黄柏具有降血压、抑菌、抗癌等药理活性^[11],大黄具有泻下、止血、抗炎、抗氧化等药理活性^[12],黄芩具有抑菌、抗癌、抗氧化、抗病毒、抗炎等药理活性^[13-14],以上三药共为臣药,共同发挥增强君药清热解毒、燥湿的作用。冰片为使药,具有抑菌、消炎镇痛等药理活性,且冰片作为常用的佐使药,与其他药味配伍时,能起到提高药物生物利用度的作用^[15-16]。本制剂在临床应用多年,疗效确切,但其质量标准较低。现有质量标准仅对苦参、大黄两味药材进行薄层鉴别^[17],为了有效地控制该制剂质量,确保临床用药的安全性和有效性,本研究拟采用薄层鉴别法(TLC)对该制剂中苦参、黄柏、大黄、黄芩四味药材进行定性鉴别,同时采用高效液相色谱法(HPLC)测定方中苦参碱和氧化苦参碱的含量,为其质量标准的制订提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 型 HPLC 仪(美国 Agilent 公司);TLC SAMPLER 4 型自动点样仪、Reprostar 3 薄层成像系统(瑞士 Camag 公司);XS205 DU 型电子分析天平(美国 Mettler-Toledo 公司);HWS-26 型电热恒温水浴锅(重庆金控科技有限公司);DHG-9203A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);Micro 17R 型微量离心机(美国 Thermo 公司);KQ-700DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q Advantage 型 A10 自动纯

水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

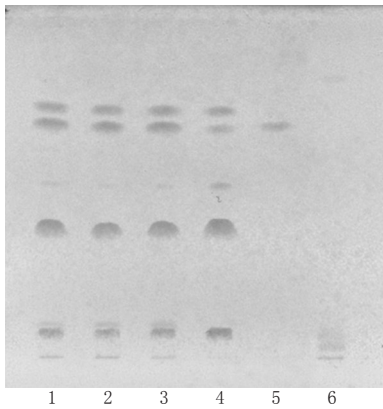
参黄搽剂(由广东省中医药工程技术研究院提供,批号:180604、180605、180606,规格:每瓶装 30 mL,每 1 mL 含生药 82 mg);苦参对照药材(批号:121019-201708)、黄柏对照药材(批号:121510-201105)、大黄对照药材(批号:120984-201202)、黄芩对照药材(批号:120955-201309)、苦参碱对照品(批号:110805-201709,纯度:98.7%)、大黄酸对照品(批号:110757-201607,纯度:99.3%)、氧化苦参碱对照品(批号:110780-201508,纯度:92.5%)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶 G 薄层板、硅胶 H 薄层板(青岛海洋化工厂);乙腈等液相用试剂为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 苦参、黄柏、大黄、黄芩的定性鉴别

2.1.1 苦参 取参黄搽剂 25 mL,加浓氨水调 pH 为 8~9,然后用三氯甲烷萃取 2 次,每次 30 mL;取萃取后的三氯甲烷液,蒸干后残渣加三氯甲烷 1 mL 溶解,作为供试品溶液。另取苦参对照药材 0.5 g,加水 150 mL,加热煮沸提取 1 h,滤过并浓缩至约 25 mL,加浓氨水调溶液 pH 为 8~9,然后照供试品溶液处理法制成对照药材溶液。另取苦参碱对照品适量,加乙醇制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。按处方工艺制备缺苦参的阴性样品,同供试品溶液处理方法制成缺苦参的阴性对照溶液。照 2015 年版《中国药典》(后文简称“药典”)(四部)通则 0502^[18]中 TLC 法进行测定,吸取上述制备好的 4 种溶液各 10 μL,分别点于同一用 1% NaOH 溶液制备的硅胶 G 薄层板上,以甲苯-丙酮-甲醇(8:3:0.5, V/V/V)为展开剂,展开,取出晾干后,再以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-水(2:4:2:1, V/V/V/V, 10 °C 以下放置)上层溶液为展开剂,展开,取出晾干,用碘化铋钾试液显色。结果,在供试品色谱图上,在与对照药材/对照品图谱相同位置上有对应

斑点出现,且阴性对照无干扰,结果见图1。



注:1~3.供试品(批号依次为180604、180605、180606);4.苦参对照药材;5.苦参碱对照品;6.阴性样品

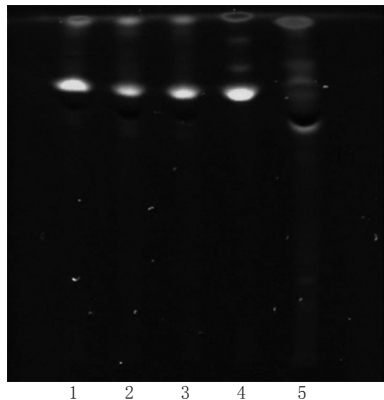
Note:1-3. test sample(batch number is 180604, 180605, 180606 in turn); 4. control medicinal material of *S. flavescens*; 5. matrine control sample; 6. negative sample

图1 苦参的TLC图

Fig 1 TLC chromatograms of *S. flavescens*

2.1.2 黄柏 取黄柏对照药材0.1 g,加水约150 mL,加热煮沸提取1 h,滤过并浓缩至约25 mL,加浓氨水调溶液pH至8~9,同“2.1.1”项下供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按处方工艺制备缺黄柏的阴性样品,同“2.1.1”项下供试品溶液制备方法制成缺黄柏的阴性对照溶液。照药典(四部)通则0502^[18]中TLC法进行测定,吸取已制备好的2种溶液和“2.1.1”项下的供试品溶液各5 μ L,分别点于同一以0.5%羧甲基纤维素钠为黏合剂制备的硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(30:15:4, V/V/V, 10 $^{\circ}$ C以下放置)下层溶液作为展开剂,置于以氨气熏蒸预饱和的展缸中,展开,取出晾干,置于紫外光灯(波长为365 nm)下检视。结果,在供试品色谱图上,在与对照药材图谱相同位置上有对应斑点出现,且阴性对照无干扰,结果见图2。

2.1.3 大黄 取参黄搽剂15 mL,加盐酸1 mL,水浴回流30 min,立即冷却,用乙醚萃取2次,每次20 mL;取萃取后的乙醚溶液,蒸干后加三氯甲烷1 mL溶解,得供试品溶液。另取大黄对照药材0.3 g,加水150 mL,加热煮沸提取1 h,滤过并浓缩至约15 mL,再加盐酸1 mL,然后按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。另取大黄酸对照品适量,加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。按处方工艺制备缺大黄的阴性样品,然后按供试品溶液制备方法制成缺大黄的阴性对照溶液。照药典(四部)通则0502^[18]中TLC法进行测定,吸取制备好的供试品溶液、阴性对照溶液各8 μ L,对照药材溶液、对照品溶液各4 μ L,分别点于同一以0.5%羧甲基纤维素钠为黏合剂制备的硅胶H薄层板上,用石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)的上层溶液作为



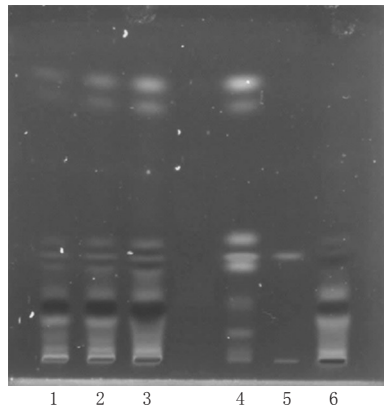
注:1~3.供试品(批号依次为180604、180605、180606);4.黄柏对照药材;5.阴性样品

Note:1-3. test sample(batch number is 180604, 180605, 180606 in turn); 4. control medicinal material of *P. chinense*; 5. negative sample

图2 黄柏的TLC图

Fig 2 TLC chromatograms of *P. chinense*

展开剂,展开,取出晾干后,置于氨气中熏至斑点清晰,于紫外光灯(波长为365 nm)下检视。结果,在供试品色谱图上,在与对照药材图谱相同位置上有对应斑点出现,且阴性对照无干扰,结果见图3。



注:1~3.供试品(批号分别为180604、180605、180606);4.大黄对照药材;5.大黄酸对照品;6.阴性样品

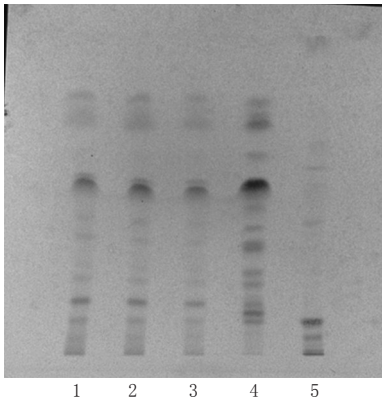
Note:1-3. test sample(batch number is 180604, 180605, 180606 in turn); 4. control medicinal material of Rhei Radix Et Rhizoma; 5. rhein control sample; 6. negative sample

图3 大黄的TLC图

Fig 3 TLC chromatograms of Rhei Radix Et Rhizoma

2.1.4 黄芩 取参黄搽剂20 mL,蒸至近干,加硅藻土适量吸附,蒸干,加乙酸乙酯20 mL,超声(功率:700 W,频率:40 kHz)提取30 min,滤过,蒸干后残渣加甲醇2 mL溶解,得供试品溶液。另取黄芩对照药材1 g,加水150 mL,加热煮沸提取1 h,滤过并蒸至近干,加硅藻土适量吸附,蒸干,然后按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按处方工艺制备缺黄芩的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成缺黄芩的阴性对照溶液。照药典(四部)通则0502^[18]中TLC法进行测定,吸取制备好的3种溶液各2 μ L,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以甲苯-乙酸

乙酯-甲醇-甲酸(10:3:1:2, *V/V/V/V*)混合溶液为展开剂,置于展缸中预饱和和30 min,取出晾干,于紫外光灯(波长为365 nm)下检视。结果,供试品色谱图上,在与对照药材图谱相同位置上有对应斑点出现,且阴性对照无干扰,结果见图4。



注:1~3.供试品(批号分别为180604、180605、180606);4.黄芩对照药材;5.阴性样品
Note: 1-3. test sample(batch number is 180604, 180605, 180606 in turn); 4. control medicinal material of *S. baicalensis*; 5. negative sample

图4 黄芩的TLC图

Fig 4 TLC chromatograms of *S. baicalensis*

2.2 苦参碱、氧化苦参碱的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna NH₂(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-无水乙醇-3%磷酸水溶液(80:10:10, *V/V/V*);流速:1.0 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:45 ℃;进样量:5 μL。

2.2.2 溶液的制备 (1)混合对照品溶液:分别精密称取苦参碱、氧化苦参碱对照品适量,用无水乙醇-乙腈(20:80, *V/V*)溶液溶解,并制成苦参碱、氧化苦参碱质量浓度分别为407.20、420.15 μg/mL的单一贮备液,备用。分别取苦参碱、氧化苦参碱贮备液适量,加无水乙醇-乙腈(20:80, *V/V*)溶液制成苦参碱、氧化苦参碱质量浓度分别为81.44、168.06 μg/mL的混合对照品溶液。(2)供试品溶液:精密量取离心(3 000 r/min, 5 min)后的参黄搽剂上清液15 mL,加浓氨水0.5 mL,放置30 min,然后用三氯甲烷萃取5次,每次20 mL,末次萃取后收集萃取液离心破乳,合并三氯甲烷液,蒸干后残渣用无水乙醇溶解,并转移到5 mL量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。(3)阴性对照溶液:按参黄搽剂处方工艺制备缺苦参的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成缺苦参的阴性对照溶液。

2.2.3 专属性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液(样品批号:180604)、阴性对照溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,以苦参碱、氧化苦参碱峰计的理论板数分别为3 333、6 407,分离度均>1.5,且阴性对照无干扰,表明该方法具有良好的专属性,色谱图见图5。

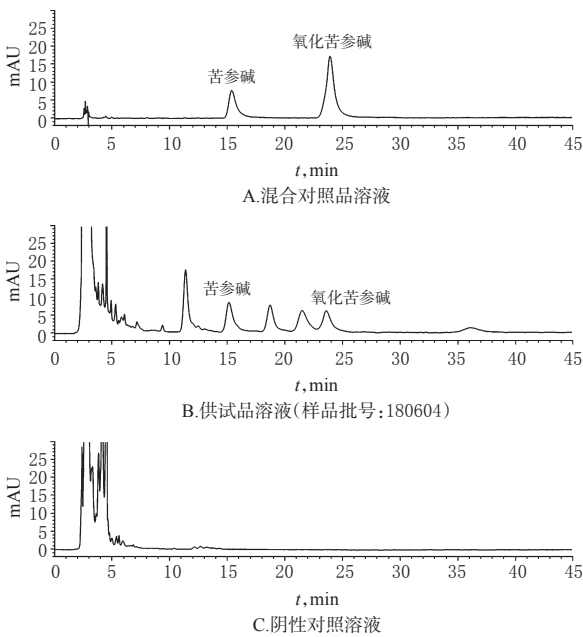


图5 HPLC图

Fig 5 HPLC chromatograms

2.2.4 线性关系考察 精密量取“2.2.2(1)”项下制备好的对照品贮备液适量,加乙腈-无水乙醇(80:20, *V/V*)溶液分别制成每1 mL含苦参碱40.72、81.44、22.16、162.88、203.60、244.32 μg和含氧化苦参碱42.02、63.02、84.03、105.04、168.06 μg的混合对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(*y*)对进样量(*x*)进行线性回归,得到苦参碱的回归方程为: $y=0.458\ 0x-4.980\ 6(r=0.999\ 4)$,氧化苦参碱的回归方程为: $y=0.514\ 2x-5.043\ 0(r=0.999\ 7)$ 。结果显示,苦参碱、氧化苦参碱分别在进样量为203.60~1 221.60、210.08~840.30 ng范围内与其峰面积呈现出良好的线性关系。

2.2.5 检测限与定量限考察 采用逐步稀释法测定苦参碱、氧化苦参碱的检测限,以信噪比为3(*S/N*=3)得出检测限,以*S/N*=10得出定量限。结果显示,苦参碱、氧化苦参碱的检测限分别为50.90、57.30 ng,定量限分别为169.67、168.06 ng。

2.2.6 精密度试验 精密吸取制备好的同一供试品溶液(样品批号:180604)5 μL,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,苦参碱、氧化苦参碱峰面积的RSD分别为1.72%、2.23% (*n*=6),表明该色谱条件下方法精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取制备好的同一供试品溶液(样品批号:180604)5 μL,按“2.2.1”项下色谱条件,分别在制备样品后0、5、10、15、20、24 h进样,记录峰面积。结果显示,苦参碱、氧化苦参碱峰面积的RSD分别为1.55%、2.77% (*n*=6),均<3%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一批次参黄搽剂(样品批号:180604),按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,平行6份,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,苦参碱、氧化苦参碱的平均含量分别为47.34、30.64 μg/mL, RSD 分别为2.84%、2.89% (n=6),均<3%,表明该方法具有良好的重复性。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量的同一批次参黄搽剂(样品批号:180604)7.5 mL,分别按供试品含量的50%、100%、150%加入苦参碱、氧化苦参碱对照品,再按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,每个浓度平行制备3份,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。结果显示,苦参碱和氧化苦参碱的平均加样回收率分别为96.13%、100.93%, RSD 分别为2.55%、2.69% (n=9),表明该方法准确度较好,结果见表1。

表1 回收率测定结果(n=9)

Tab 1 Determination results of reloverly rate(n=9)							
成份	取样量, mL	样品中含 量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收 率, %	平均加样回 收率, %	RSD, %
苦参碱	7.5	355.05	173.06	525.80	98.67	96.13	2.55
	7.5	355.05	173.06	513.86	91.77		
	7.5	355.05	173.06	527.33	99.55		
	7.5	355.05	346.12	687.61	96.08		
	7.5	355.05	346.12	683.29	94.83		
	7.5	355.05	346.12	688.27	96.27		
	7.5	355.05	519.18	863.87	98.00		
	7.5	355.05	519.18	841.71	93.74		
氧化苦参碱	7.5	355.05	519.18	854.85	96.27	100.93	2.69
	7.5	229.80	105.04	330.28	95.66		
	7.5	229.80	105.04	334.89	100.05		
	7.5	229.80	105.04	335.98	101.09		
	7.5	229.80	210.08	437.18	98.72		
	7.5	229.80	210.08	450.79	105.20		
	7.5	229.80	210.08	442.23	101.12		
	7.5	229.80	315.11	547.74	100.90		
	7.5	229.80	315.11	552.78	102.50		
	7.5	229.80	315.11	554.78	103.13		

2.2.10 样品含量测定 分别精密吸取3个批次参黄搽剂的供试品溶液及混合对照品溶液各5 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,每个样品测2次,记录峰面积并计算样品中苦参碱和氧化苦参碱的含量。结果显示,3个批次样品中苦参碱、氧化苦参碱的平均含量分别为46.98、31.02 μg/mL,平均总含量为78.00 μg/mL。根据3批样品含量测定结果可知,制剂中苦参碱和氧化苦参碱总量的平均值为2.34 mg/瓶,按平均含量的80%设限^[19],初步拟定以苦参碱、氧化苦参碱总量计,每瓶制剂中不得少于1.87 mg。样品中苦参碱、氧化苦参碱含量测定结果见表2。

3 讨论

3.1 TLC鉴别方法的确定

本研究对参黄搽剂中苦参、黄柏、大黄、黄芩分别进

表2 参黄搽剂中苦参碱、氧化苦参碱含量测定结果 (n=2, μg/mL)

Tab 2 Determination results of matrine and oxymatrine in shenghuang liniment(n=2, μg/mL)

样品批号	苦参碱	氧化苦参碱	总量
180604	47.67	29.41	77.08
180605	45.53	32.82	78.35
180606	47.73	30.82	78.56
平均	46.98	31.02	78.00

行了TLC鉴别,所建立的鉴别方法分离度良好、无拖尾现象,且阴性对照无干扰,专属性强,能实现方中各药味的快速鉴别。苦参的鉴别方法笔者参考了药典(一部)^[20]苦参项下下载的TLC法并有所调整,药典(一部)中采用加氨水和三氯甲烷放置过夜进行药材提取,笔者考虑到本制剂为经提取过的液体,故将方法调整为加氨水调pH后用三氯甲烷萃取。另外,笔者曾采用在10℃以下放置的三氯甲烷-甲醇-浓氨(5:0.6:0.3, V/V/V)的下层溶液为展开剂进行展开,但斑点比移值(R_f)较高,改为本研究中所用二次展开系统展开后,斑点R_f值适中且分离度好。大黄的鉴别笔者参考了药典(一部)^[20]大黄项下下载的TLC法并有所调整,药典(一部)中先加甲醇浸泡提取药材,得甲醇液蒸干后,加水溶解,再加盐酸回流提取,笔者考虑到本制剂为经提取过的液体,故将方法调整为直接加盐酸回流提取;另外,笔者曾用药典展开方法展开,结果TLC图谱中橙黄色荧光斑点不清晰,后改为置于氨气预饱和的展缸中展开,结果斑点清晰。黄柏、黄芩的鉴别分别参考药典(一部)^[20]黄柏、黄芩项下下载的TLC法。

3.2 HPLC含量测定中供试品溶液制备方法的确定

参黄搽剂中苦参为君药,笔者参考药典(一部)^[20]苦参项下下载的含量测定方法,考虑到本品为液体制剂,药材已经经水煮提取,故选择采用萃取的方法对样品中有效成分进行提取。萃取时又发现样品乳化较严重,如果不破乳会影响含量测定结果,经离心破乳后,测定结果重复性高、稳定性好,故采用离心的方法对末次萃取后的混合液进行破乳处理。测定样品时笔者另发现,样品测定结果平行性较差,经排除人为误差影响后,怀疑是处理过程中加氨水将待测生物碱成分分离出来了,该过程需要一定的反应时间,故笔者对加氨水后的放置时间进行了考察,发现加氨水后直接测定时结果平行性较差,而放置30 min后含量测定结果平行性好,且放置60 min与放置30 min比结果相差不大,故确定加氨水放置30 min后再进行测定。此外,笔者对萃取次数还进行了考察,发现苦参碱、氧化苦参碱的含量随萃取次数的增加而增加,但萃取5次后,含量增加不明显,表明萃取5次对苦参碱、氧化苦参碱的提取较完全,故选萃取5次作为样品的提取次数。

3.3 HPLC 色谱条件的确定

笔者曾参考药典(一部)^[20]苦参项下下载的含量测定方法,在药典规定流动相的基础上,对色谱柱、柱温、流速进行了考察。在色谱柱方面,笔者分别考察了 Waters Spherisorb NH₂、Thermo Synchronis Amino、Phenomenex Luna NH₂这3种不同色谱柱对分离效果的影响,发现该方法对不同色谱柱适应性良好,但 Phenomenex Luna NH₂色谱柱的色谱峰峰形更好、保留时间适中,故最终选则 Phenomenex Luna NH₂作为含量测定的色谱柱。在柱温方面,笔者分别考察了 35、40、45℃这3种不同柱温对分离效果的影响,结果当柱温为 35℃时,苦参碱和氧化苦参碱的分离度均低于 1.5,当柱温高于 40℃后,苦参碱和氧化苦参碱的分离度均在 1.5 以上,且其分离度均随柱温的增加而升高,故最终选柱温为 45℃。在流速方面,笔者考察了 0.8、1.0、1.2 mL/min 这3种流速对分离效果的影响,结果流速对分离效果影响不大,综合分析时间及仪器耐用性后,选择 1.0 mL/min 作为分析流速。最终所建立的含量测定方法专属性强、分离度好。

综上所述,本研究建立了参黄搽剂中苦参、黄柏、大黄、黄芩四味药材的 TLC 鉴别方法,在建立方法下测得的样品斑点清晰、分离度高,且阴性对照无干扰。此外,本研究还建立了方中苦参碱和氧化苦参碱含量测定的 HPLC 法,并初步拟定了以苦参碱、氧化苦参碱总量计,每瓶中不得少于 1.87 mg 的质量标准。本研究所建立的方法可行性高、重复性好,可用于参黄搽剂的质量控制。

参考文献

[1] 穆甲骏,王卫国,侯启昌.苦参生理活性物质研究现状与展望[J].河南师范大学学报(自然科学版),2014,43(6):131-137.

[2] 龙梅,徐玲,王欢.苦参的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(99):78-79.

[3] 樊宏伟,卢继红,张蓉.苦参碱类生物碱的体外抑菌、抑病毒及诱生干扰素的实验研究[J].中医药信息,2000,17(4):75-76.

[4] 李媛媛,阎旭,李墨林,等.氧化苦参碱体外抑菌活性的研究[J].中国微生态学杂志,2012,24(3):244-245,250.

[5] 董方亮.氧化苦参碱抗慢性病毒性肝炎作用机制及临床

研究概述[J].中国药师,2013,34(12):1912-1914.

[6] 刘晓琼,沈宏辉,陈佳欣,等.苦参碱类生物碱联合胸腺肽抗 HBV 作用研究[J].中国中药杂志,2016,41(7):1275-1281.

[7] 董晓巧,俞文华,张祖勇,等.氧化苦参碱对脑外伤大鼠脑组织 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平的影响[J].浙江中西医结合杂志,2012,22(7):508-510,516.

[8] 刘艳明,王雪芳.氧化苦参碱对缺血缺氧致兔心律失常保护作用及机制研究[J].河北医药,2015,37(9):1308-1310.

[9] 陈晓峡,向小庆,叶红.苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2013,34(11):361-364.

[10] 陈晨,金玉.氧化苦参碱防治慢性肾纤维化机理的实验研究[J].陕西中医,2014,35(1):106-109.

[11] 李嘉诚,吴岚,蔡同凯,等.黄柏化学成分及其药理作用研究进展[J].药学实践杂志,2018,36(5):389-391,398.

[12] 于建玉,廖欣,丁厚伟,等.中药大黄药理作用研究进展及其临床应用[J].中国现代药物应用,2016,10(11):286-287.

[13] 谢艳,毕军花,郭云鹏.道地黄芩与非道地黄芩的解毒作用比较研究[J].中医药导报,2015,21(8):35-38.

[14] 姜丹.黄芩道地性的遗传和化学物质基础研究[D].北京:北京中医药大学,2018.

[15] 苏坤莲,凡永杰,刘原,等.冰片对心脑血管系统药理作用及其机制的研究进展[J].辽宁中医杂志,2018,45(9):2001-2003.

[16] 尚坤,李敬文,常美月,等.冰片化学成分及药理作用研究[J].吉林中医药,2018,38(1):93-95.

[17] 孙冬梅,林晓燕,李素梅,等.复方芪麻胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2017,28(18):2553-2556.

[18] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57-59.

[19] 孔燕,王健.益气通脉软胶囊质量标准的研究[J].中成药,2019,41(3):516-521.

[20] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:23,202,301,305.

(收稿日期:2019-02-27 修回日期:2019-04-04)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅