

海桐皮熏洗液制备工艺及其质量标准研究

杨萍

资阳市食品药品检测检验中心

DOI:10.32629/fcmr.v7i4.18111

[摘要] 目的: 制备海桐皮熏洗液,并建立其质量标准。方法: 该方法以优化制备工艺流程为目的,以阿魏酸含量及干膏率为综合指标。将乳香、当归、川芎、甘草定性鉴别,阿魏酸含量用HPLC法测定。结果: 海桐皮熏洗液最好的提取工艺是水煎煮四次,加水体积分别为13倍、12倍、12倍、12倍量水,每次提取时间为1h。TLC分析显示斑点清晰,阴性对照无干扰。TLC斑点清晰,阴性无干扰。阿魏酸在1.936~24.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好($r=0.9995$),平均回收率为102.50%,RSD为1.92%。结论: 该分析方法操作简便,结果可靠,专属性(RSD<2%)与重复性均符合要求,适用于海桐皮熏洗液的质量控制。

[关键词] 海桐皮熏洗液; 制备工艺; 质量标准; 阿魏酸; TLC; HPLC

中图分类号: R97 文献标识码: A

Preparation and quality standard of Haitongpi Xunxiye

Ping Yang

Ziyang Food and Drug Testing and Inspection Center

[Abstract] OBJECTIVE To prepare Haitongpi Xunxiye (HTPXXY) and to establish its quality standard. METHODS The preparation process was optimized using the content of ferulic acid and dry paste as comprehensive indicators. TLC was adopted in the qualitative identification of Olibanum, Angelicae sinensis radix, Chuanxiong rhizome. In the qualitative identification of Glycyrrhizae radix etrhizoma, HPLC was used for the purpose of determining the amount of ferulic acid, HPLC was also employed. RESULTS The optimal extraction process of HTPXXY is to extract 4 times (1.5 h each time) with 13, 12, 12, and 12 times volume of water respectively. The TLC spots were clear without negative interference. Hesperidin showed good linear relationships within the ranges of 1.936–24.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9995$), which average recoveries was 102.50% with the RSD of 1.92%. CONCLUSION This simple, reliable, specific and repeatable method can be used for the quality control of HTPXXY.

[Key words] Haitongpi Xunxiye; preparation process; quality standard; ferulic acid; TLC; HPLC

引言

海桐皮熏洗液是由海桐皮、铁线透骨草、乳香、没药等12味中药组成的汉源县中医医院临床经验方,临床主要用于跌打损伤,翻筋骨错,疼痛不止的治疗。方中海桐皮的功效是祛风、除湿、通络、止痛、杀虫,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗真菌等药理作用^[1-4],化学研究主要涵盖三萜及其皂苷和苯丙素类化合物。乳香具有活血定痛、消肿生肌的功效,主要含有萜类和挥发油类,现代研究显示,乳香具有抗炎镇痛、活血祛瘀等药理活性^[5-7]。现代药理学证实没药亦具有散瘀定痛、消肿生肌的功效,其化学成分以挥发油、萜类、甾体类、木脂素类类为主,具有抗炎、镇痛等活性^[8-12]。为更好地促进该方院内制剂的开发和研制,推广临床应用,本文采用正交实验对其制备工艺进行优化并建立其质量标准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪,厂家为美国Agilent公司;BGZ-420型电热鼓风干燥箱,(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司,原上海博讯实业有限公司);DK-S28电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试剂

海桐皮、乳香、没药、威灵仙来源于成都欣福源中药饮片有限公司,铁线透骨草来源于洪雅县瓦屋山药业有限公司,酒当归、红花、甘草来源于四川禾木源药业有限公司,其余中药材来源于四川利民中药饮片有限责任公司。乳香、当归、甘草、川芎四味对照药材及阿魏酸对照品来源于中国食品药品检定研究院;甲醇与乙腈均采用美国Thermo Fisher Scientific公司色

谱纯级别(纯度 $\geq 99.9\%$),符合HPLC分析要求;实验用水为超纯水(电阻率 $\geq 18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, TOC $<10\text{ppb}$),满足《中国药典》纯化水标准;剩余试剂为分析纯(AR级),满足常规实验需求。

2 制备工艺

2.1 吸水率考察

根据海桐皮熏洗液的处方称取药材,然后加入十倍的水量,在0.5小时、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时和3小时后进行过滤,测量滤液的体积,计算其吸水率,结果分别为69.07%、107.21%、111.27%、121.32%、124.65%、129.31%。这说明药方最大的吸水量是药材质量的1倍,当浸泡时间超过1h后,其吸水速率将有所降低。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Swell Chromplus C18(4.6 \times 250mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-2%冰醋酸溶液(V:V, 20:80); 检测波长: 323nm; 流速: 1mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

2.2.2 溶液的制备

精密称取12.20mg阿魏酸,用稀乙醇定容到25mL,以备对照品储备液之用。梯度稀释对照品储备液至1.936、3.872、5.808、12.10、24.20 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度。取5mL中试样品,加入甲醇稀释至25mL,涡旋混匀后经0.45 μm 滤膜过滤,即可得到供试品溶液。缺当归、川芎的处方也应按比例称定,按供试品同法处理和制备,即可得到阴性对照溶液。

2.2.3 标准曲线的绘制

精密进样系列浓度对照品溶液,记录各浓度点色谱峰面积,根据浓度和峰面积制作标准曲线,即得 $Y=48.213X-15.187$, $R=0.9995$,质量浓度在1.936~24.20 $\mu\text{g/mL}$ 之间线性关系较好。

2.3 干膏率的测定

取半帖处方量的方剂,对药材进行准确称量,并根据每一个考察条件进行提取。精密量取供试品储备液30mL,蒸干至恒重,立即称质量,计算干膏率。

2.4 正交实验的设计

基于单因素考察结果,选取对阿魏酸含量及干膏率影响显著的因素,设计L9(3⁴)正交试验方案。精密称取半帖处方量药材9份,按因素水平表进行提取实验。以干膏率和阿魏酸含量为评价指标进行综合评分,具体数据见表1-表3。

表1 正交因素水平表

水平	因素			
	A加水量(倍)	B提取次数(次)	C提取时间(h)	D空白
1	10	2	1	
2	12	3	1.5	
3	14	4	2	

表2 正交试验方案及结果

试验号	A	B	C	D	综合评分
	加水量	提取次数	提取时间	空列	
1	1(10倍)	1(2次)	1(1h)	1	68.26
2	1	2	2	2	81.49
3	1	3	3	3	82.12
4	2(12倍)	1	2(1.5h)	3	82.2
5	2	2(3次)	3	1	84.59
6	2	3	1	2	90.61
7	3(14倍)	1	3(2h)	2	75.22
8	3	2	1	3	81.73
9	3	3(4次)	2	1	84.62
K_1	77.292	75.229	80.201	79.157	
K_2	85.798	82.604	82.77	82.441	
K_3	80.525	85.782	80.644	82.017	
R	8.506	10.553	2.568	3.284	

表3 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	110.718	2	55.359	5.785	0.147
B	175.971	2	87.985	9.194	0.098
C	11.324	2	5.662	0.592	0.628
误差	19.139	2	9.57		

由表2可知,海桐皮熏洗液的提取液在设置的水平范围内,其固体总量、阿魏酸含量、甘草酸铵三项指标综合评分最大的是实验组6,即A2B3C1。A、C因素,即加水量和提取时间的长短对海桐皮熏洗液的综合评分没有明显的影响,而B因素对综合评分有更明显的影响($p<0.1$)。

此外,在设置的三个因素中,对海桐皮熏洗液中的提取液综合评分的影响大小顺序均为提取次数(B)>加水量(A)>提取时间(C)。本工艺过程最终确定,第一次以13倍的量加水浸泡1h,第二次、第三次、第四次均以每次12倍的量加水浸泡,提取4次,每次1h。

2.5 验证实验

海桐皮熏洗液工艺经正交试验验证,收膏率均值为33.52%(RSD=0.66%, n=9),阿魏酸含量为0.0676mg/g(RSD=2.45%)。

各项指标RSD均小于3%,表明工艺稳定可靠,符合质量要求。

3 TLC定性鉴别

3.1 乳香

对照药材溶液的制备:用50毫升无水乙醇超声提取乳香对照药材1克;供试品溶液的制备:用10毫升乙醇超声溶解10毫升本品溶液蒸干后的残留物;阴性样品溶液的制备:按处方方法制成除去乳香的样品溶液。照薄层色谱法(通则0502)试验,以石油醚(60~90℃)-乙醚(15:1)为展开剂,结果见图1。

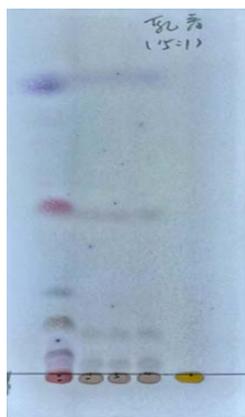


图1 乳香的TLC图谱

(左侧为对照药材,中间3个为供试品,右侧为阴性样品)

3.2 当归、川芎

当归对照药材溶液的制备:用50毫升碳酸氢钠溶液(1%)超声提取0.5克当归对照药材,滤液调pH至2~3,乙酸乙酯提取3次(30mL/次),浓缩后甲醇定容至1毫升;川芎对照药材溶液的制备:同当归对照药材溶液的制备;供试品溶液的制备:取本品20mL,同当归对照药材溶液的制备;阴性样品溶液的制备:称取除当归、川芎外的其余药材,将缺当归和川芎的样品按工艺过程制备。照薄层色谱法(通则0502)试验,结果见图2。

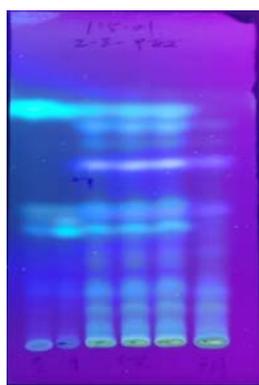


图2 当归、川芎的TLC图谱

(左侧为当归对照药材溶液、川芎对照药材溶液,中间3个为供试品,右侧为阴性样品)

供试品TLC图谱显示,与对照品斑点位置一致的色谱峰,阴性对照无干扰,且斑点颜色一致,表明专属性良好。

3.3 甘草

对照品溶液的制备:准确称取适量甘草酸铵对照品,用稀乙醇定容至10 μg/mL,摇匀、滤过,取续滤液;供试品与阴性样品溶液制备:分别取本品5mL及缺甘草阴性样品,甲醇定容至25mL,涡旋混匀后经0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液备用。照HPLC法(通则0512)进样10 μL,色谱条件:C18柱,梯度洗脱按表4所示进行;检测波长设置为237nm;结果如图3所示。

表4 流动相配比

时间(分钟)	流动相A: 乙腈(%)	流动相B: 0.1%磷酸溶液(%)
0~25	25→43	75→57
25~26	43→100	57→0
26~30	100→25	0→75

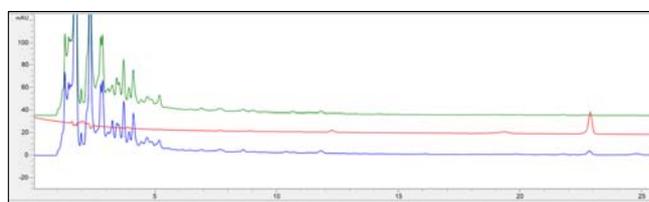


图3 甘草的HPLC色谱图

(A: 阴性样品液; B: 对照品溶液; C: 供试品溶液)

HPLC分析显示,供试品主峰保留时间与对照品一致,阴性对照无干扰峰,方法专属性符合要求。

4 含量测定(阿魏酸的含量测定)

色谱条件同“2.2.1”,溶液的制备同“2.2.2”,标准曲线的绘制同“2.2.3”。

4.1 专属性考察

精确地移取适量对照品、供试品、阴性样品溶液,按HPLC法进样分析,结果见图4。

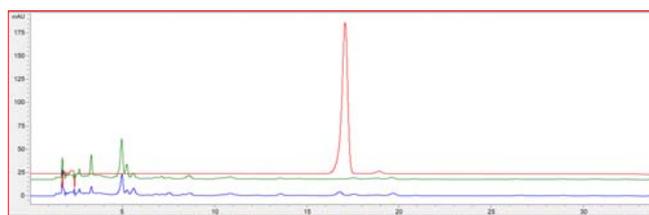


图4 对照品(A)、阴性对照(B)、供试品(C)的HPLC图

4.2 精密度、重复性、稳定性和加标回收实验

根据方法学验证中对精密度、重复性、稳定性和准确度(加标回收)提出的要求,精密吸取对照品溶液10 μL,计算其峰面积RSD为0.58%,由此可得出仪器具有良好的精密度;取同批海桐皮熏洗液制备6份供试品溶液,阿魏酸峰面积RSD为0.86%,符合重复性要求;同一供试品溶液间隔不同时间进样测定,24小时内峰面积RSD为1.01%,说明该溶液在24h内有很好的稳定性;通过加标回收试验,6份供试品溶液的平均回收率为98.5%~101.2%(详见表5),验证了方法的准确性。

表5 加样回收率实验 (n=6)

成分	样品中含量/ μg	对照品加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
阿魏酸	178.5239	242	240.3916	99.34	102.5	1.92
			247.7548	102.38		
			244.0213	100.84		
			250.7104	103.6		
			253.666	104.82		
			249.1029	102.94		

5 讨论

经过多年的临床应用,这个方剂显示出显著的疗效,并且不良反应较小。本文对海桐皮熏洗液的主要影响因素加水量、煎煮次数、煎煮时间进行正交实验,结合研究结果与实际生产情况,确立了稳定、可靠的制备工艺。本研究结合处方的组成及主要功效,以收膏率及阿魏酸的综合评分作为评价指标^[13]。

此外,本文初步建立海桐皮熏洗液的质量标准,提出了阿魏酸含量的测定方法,进行方法学考察且符合相关标准,同时运用现代技术手段对复方药味中的乳香、当归、川芎、甘草进行了定性鉴别^[14],有效控制了中药制剂质量,同时也为开发疗效好、安全性高的中药复方新药提供了可靠的保证。

[参考文献]

- [1]尹建元,杨晓虹,孟勤,等.刺楸中新七糖皂苷的结构解析[J].分析化学,2004(10):1381-1384.
- [2]朱玮,贾夏,张鞍灵,等.刺楸属植物化学成分及生物活性研究进展[J].西北林学院学报,2004(3):119-124
- [3]HU W C,HEO S I,WANG M H. Antioxidant and cytoprotective activity of castoraria(kalopanax pictus) leaves[J].Food Science and Biotechnology,2009,18(6):1523-1527.
- [4]王焯,刘梓煜,刘伟,等.海桐皮质量标准优化研究、7[J].

长春中医药大学学报,2023,39(07):741-745.

[5]赵金凤,周春兰,周凤琴,等.乳香挥发性成分GC-MS分析[J].中国中药杂志,2011,36(8):1050-1053.

[6]郑立红,刘振丽,宋志前,等.基于气质联用技术的乳香醋炙前后挥发油成分变化分析[J].中国中医基础医学杂志,2022,28(10):1677-1681.

[7]张嘉慧,张林林,郝艳琦,等.醋乳香现代研究进展及质量标志物的预测[J].中国现代中药,2024,26(2):240-251+233.

[8]SHEN T,LI GH,WANG XN,et al.The genus Commiphora:A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J].J Ethnopharmacol,2012,142(2):319-330.

[9]LEO R,THERACHYIL L,SIVEEN S K,et al.Protein expression profiling identifies key proteins and pathways involved in growth inhibitory effects exerted by guggulsterone in human colorectal cancer cells[J].Cancers,2019,11(10):1478.

[10]DEKEBO A,DAGNE E,STERNER O.Furanosesquiterpenes from Commiphora sphaerocarpa and related adulterants of true myrrh[J].Fitoterapia,2002,73(1):48-55.

[11]FRATERNALE D,SOSA S,RICCI D,et al.Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal furanosesquiterpenoids isolated from Commiphora erythraea(Ehrenb.)Engl.Resin[J].Fitoterapia,2011,82(4):654-661.

[12]哈瑞雯,周海燕,白杨,等.没药化学成分研究进展[J].中国现代中药,2022,24(7):1374-1386.

[13]瞿孝兰.荆防藿朴解毒合剂制备工艺与质量标准研究[D].成都中医药大学,2021.

[14]国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.

作者简介:

杨萍(1992—),女,汉族,四川资阳人,在读研究生,工程师,研究方向:食品、药品检验检测。