

七黄膏的质量标准研究

蔡 芸 吴雪娟 宋情梅 平艳艳 秦菁莉

云南省文山壮族苗族自治州中医医院 云南 文山 663099

【摘要】：目的：建立七黄膏的质量标准，以确保其有效成分的稳定性和安全性。方法：研究采用高效液相色谱法（HPLC）对复方膏剂中的芍药苷进行定量分析。通过薄层色谱法（TLC）对赤芍和苦参进行定性鉴别。结果：采用高效液相色谱（HPLC）测定芍药苷浓度时，在 0.08983 至 0.04492 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现出显著的线性关系。平均回收率为 104.87%，相对标准偏差（RSD）仅为 0.04%。TLC 分析表明，赤芍和苦参在色谱图上具有明确的特征斑点。结论：本研究成功建立了含赤芍、苦参的复方膏剂的质量标准，通过上述方法，可以准确测定和保证该复方膏剂中有效成分的含量，从而确保其疗效和安全性。

【关键词】：赤芍；苦参；复方膏剂；薄层色谱；高效液相

DOI:10.12417/2811-051X.26.12.008

七黄膏主要以赤芍、苦参、三七等组方的外用膏剂，兼具清热凉血、散瘀止痛、燥湿抗炎之效，临床应用优势突出。但该复方成分复杂，受药材产地、炮制工艺、提取方式影响较大，目前尚无系统、规范的质量控制体系。本研究旨在建立赤芍苦参复方膏剂的质量控制体系，采用薄层色谱法实现药材的特征性鉴别，利用高效液相色谱技术对核心活性成分芍药苷进行精准含量测定与系统解析。通过定性定量相结合的质量评价体系，有效弥补现有质控短板，保障该复方膏剂临床应用的安全性、有效性、质量均一性，为其院内制剂标准化生产及临床推广提供依据。

1 仪器、试剂与药品

1.1 仪器

高效液相色谱仪：LC-2030 puls 型高效液相色谱仪（岛津马来西亚工厂）

电子天平：FB224L 型电子天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）

数控超声波清洗器：3JY08（歌能）

电热恒温水浴锅：HH-S21-型电热恒温水浴锅（金坛市大地自动化仪器厂）

旋涡混合器：XH-T 型旋涡混合器：（金坛区白塔新宝仪器厂）

真空泵：AP-01P 真空泵（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）

1.2 试剂与药品

芍药苷对照品：110736-202044（中国食品药品检定研究院）

苦参碱对照品：110805-202010（中国食品药品检定研究院）

乙腈、甲醇均为分析纯

磷酸：2023022801（成都市科隆化学品有限公司）

硅胶 G 薄层板：青岛海洋化工厂分厂硅胶板、德国默克公司硅胶板、青岛市基亿达硅胶试剂厂硅胶板

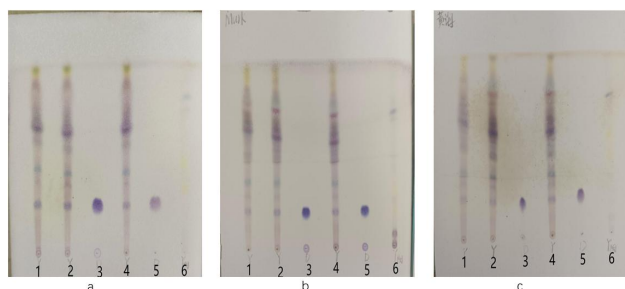
膏剂：20201208；20241225；20250215

实验用其他试剂均为色谱纯

2 定性鉴别

2.1 赤芍的薄层鉴别

精密称取本品 10.0g，加入乙醇 20mL，混合后置于水浴锅中加热，使其充分溶解并均匀混合，持续搅拌 5 分钟，以确保成分充分分散。过滤，蒸干。蒸干后的残渣中加入 15mL 水，使其完全溶解转移至分液漏斗中。加入水饱和的正丁醇 20mL，振摇，以实现目标成分与杂质的有效分离。静置分层后，弃去下层水液，保留正丁醇层。用氨试液 15mL 对正丁醇层进行洗涤，以去除残留的水溶性杂质，弃去氨液。再用正丁醇饱和的水 15mL 洗涤正丁醇层，进一步去除杂质，弃去水液。将萃取后的正丁醇溶液置于高真空环境下脱溶直至完全干涸，所得固体产物随即转移至含有 1 mL 乙醇的密闭容器内，通过超声振荡实现充分溶解，进而获得待测试样溶液，供后续检测使用。参照相同步骤制备赤芍阴性对照提取物。另取一定量芍药苷纯品，用甲醇稀释至终浓度为 1 mg/mL 作为标准储备液。薄层色谱分析法的操作规程，分别吸取上述三种溶液各 5 μL 点样于预涂硅胶 G 薄层板上，采用氯仿-醋酸乙酯-甲醇-冰醋酸（8:1:2:0.1）混合溶剂作为展开剂进行分离。取出，晾干，用 5% 香草醛硫酸溶液显色，加热至 105 $^{\circ}\text{C}$ 观察结果。供试品色谱图中目标化合物对应的斑点颜色与对照品一致，而阴性对照组未能出现相应特征性的显色斑点。结果见图 2-1。

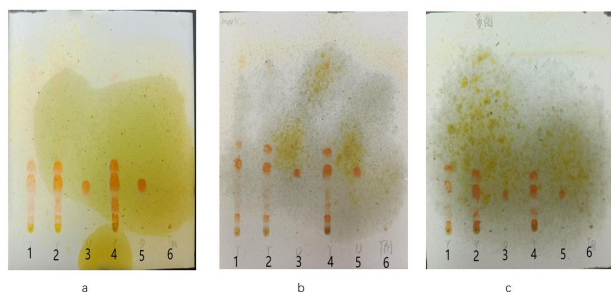


1,2,4-供试品溶液; 3,5-对照品溶液; 6-阴性对照溶液

图 2-1 膏剂中的芍药苷 TLC 鉴别谱图

2.2 苦参的薄层鉴别

精密称取本品 10.00g, 置于具塞锥形瓶中, 加入乙醇 20.0mL, 将锥形瓶放置于水浴锅上, 加热至样品完全溶解, 期间持续搅拌 5 分钟。冷却后过滤, 收集滤液。将滤液转移至蒸发皿中, 置于水浴锅上, 调节温度至 60℃左右, 蒸干。冷却后加入纯化水 15.0mL, 再加入浓氨试液 0.3mL, 搅拌均匀, 静置 5 分钟。随后加入三氯甲烷 50.0mL, 超声处理 30 分钟。超声结束后, 取出蒸发皿, 放冷至室温, 过滤, 收集滤液。量取滤液 10.0mL, 置于水浴锅上蒸干。残渣用甲醇 1.0mL 溶解, 搅拌均匀, 即得供试品溶液, 备用。选取苦参碱标准品, 使用乙醇溶解使其浓度达到每毫升含 1mg, 构建浓度适中的对照溶液。按照《中国药典》中薄层色谱技术指导方案, 分别吸取等量的两种溶液各 5 μ L 点样于同一批硅胶 G 薄层板, 在相同条件下采用醋酸乙酯、丙酮、苯及氨按体积比 4:3:2:0.2 混合配制的展开剂进行分离操作。取出、晾干, 再喷洒稀释状态的碘化铋钾试剂以显现斑点分布情况。供试品色谱中可清晰观察到与对照品匹配的位置特征显著的斑点; 而阴性对照组未见预期目标斑点出现。结果见图 2-2。从左到右依次为青岛海洋化工厂分厂硅胶板、德国默克公司硅胶板、青岛市基亿达硅胶试剂厂硅胶板。



1,2,4-供试品溶液; 3,5-对照品溶液; 6-阴性对照溶液

图 2-2 膏剂中的苦参碱 TLC 鉴别谱图

3 含量测定

3.1 色谱条件

色谱柱 WondaSil C18 柱 (4.6 $\times$ 250mm); 以 0.1%磷酸水溶液-乙腈 (88:12) 为流动相; 检测波长为 230nm, 流速:

1ml/min; 柱温 25℃; 进样量 10 μ L。

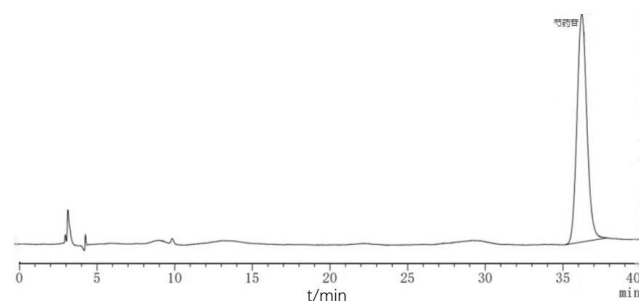
3.2 溶液配置

准确称取特定质量的芍药苷对照品, 置入 50 mL 容量瓶内, 添加适量甲醇促使其完全溶解, 然后以甲醇溶液稀释至刻度线并充分混匀, 最终构建浓度为 46.4 μ g/mL 的标准对照液体系。

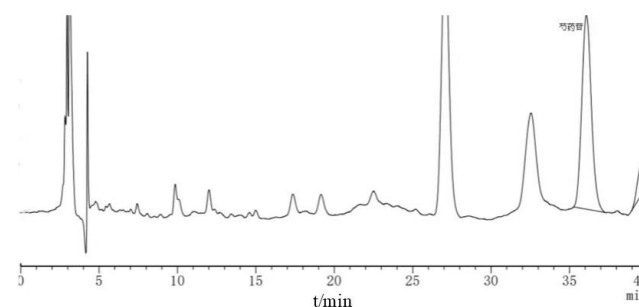
取样品粉末 10 g, 置于含有 20 mL 乙醇的容器中, 在恒温水浴条件下加热以确保物料完全溶解, 并持续搅拌 5 min。过滤, 蒸干。向浓缩后的残留物中加入 15 mL 纯化水, 充分混匀后利用分液漏斗进行有机相与水相的分离操作。首次选用 20 mL 正丁醇作为萃取剂, 剧烈振摇提取目标化合物, 收集有机层并排除水分; 随后再用 15 mL 预饱和正丁醇-水混合溶剂 (比例同前) 重复上述步骤一次。将两次回收的有机相合并, 蒸干, 添加 1 mL 高浓度乙醇使其完全溶解, 最终制得供检测使用的待测试样溶液。

3.3 专属性性试验

本研究运用芍药苷对照品溶液、待测复方膏剂样品溶液以及阴性对照样品溶液, 在第 3.1 节中规定的色谱条件下进行分析。实验结果表明, 对照品溶液与样品溶液均在相同保留时间呈现相同的特征色谱峰, 而阴性对照样品溶液则未能检测到相应色谱峰, 从而验证了该检测方法具有较高的特异性。相关色谱数据详见附录中的图 3-1。



(a) 芍药苷对照品溶液



(b) 膏剂样品溶液

图 3-1 芍药苷对照品溶液、膏剂样品溶液色谱图

3.4 重复性试验

本研究选取同一批次共六份样品,并依据预设色谱条件进行分析。通过对各组分峰面积数据的系统收集与统计处理,得出芍药苷特征峰的相对标准偏差(RSD)为0.16%,整体样本含量测定的RSD值进一步降低至0.0029%。说明分析体系具有较好的重复性与可信度。

3.5 稳定性试验

从编号为20241225的供试品中精确移取10 μ L溶液,并置于常温环境,依据3.1项节所述色谱学方法依次在0h、2h、4h、6h及24h时点进行进样与数据采集。通过对各时段所得峰面积值计算相对标准偏差,RSD为0.0028%。充分证明该样品溶液在室温条件下于24小时内展现出优异的稳定性特征。

3.6 精密度试验

本研究选取芍药苷对照品共6份样品,按照3.1项所述的色谱分析条件进行检测。方法的相对标准偏差RSD为0.0087%,证实其具有出色的重复性与可信度,完全符合现行技术规范的要求。

3.7 线性关系考察

准确称取浓度为0.0449 mg/ml的芍药苷对照品溶液,依次精密量取2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L及10 μ L样本,按照预设色谱条件进行分析,并记录各目标成分对应的峰面积数据。以峰面积(Y)和进样量(X)进行回归,得标准曲线:芍药苷 $Y=1E+06X-8876.5$, $R^2=0.9991$,结果表明芍药苷在0.08983~0.04492范围内呈良好的线性关系。

3.8 加样回收率

取已知芍药苷含量的样品6份,分别精准加入芍药苷对照品0.03311mg。根据3.2项的方法制备供试品溶液,并严格遵照3.1项规定的色谱参数对样品进行检测,平均回收率为104.87%,相对标准偏差(RSD)仅为0.04%。

4 讨论

本复方膏剂含三七、赤芍、苦参等多味药材,以液状石蜡为基质,基质干扰严重。本研究参考药典眼膏鉴别方法,采用乙醇加热溶解去除液状石蜡,可有效去除辅料干扰、纯化样品。

本法在药典赤芍鉴别基础上,创新性采用水饱和正丁醇作为提取溶剂,显著提升芍药苷提取效率与分离度。

针对药典原有展开系统分离度差、效率低的问题,优化建立醋酸乙酯-丙酮-苯-氨水改良展开体系,优化后斑点清晰、无拖尾、比移值适宜,方法简便、快速、成本低,适合批量检测。

优化色谱条件,将柱温调整为25 $^{\circ}$ C,有效解决杂质峰重叠问题,芍药苷峰形对称、分离良好。经标准曲线、精密度、重复性等方法学验证,该定量方法稳定、准确、可靠,可用于本复方膏剂芍药苷的质量控制。

5 结论

本试验确定了该复方膏剂的质量标准,拟定以苦参和赤芍的薄层鉴别色谱作为该复方膏剂的定性鉴别标准;以芍药苷作为含量测定检测标准。含量测定的方法学考察结果表明,专属性、线性关系、精密度和重复性均良好。

参考文献:

- [1] Jung Y, Kim B, Ryu M H, et al. Chinese medicines reported to have effects on contact dermatitis in the last 20 Years[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2017, 24(1): 64-71.
- [2] 张建军, 李伟, 乐娜, 等. 赤芍及赤芍总单萜、赤芍总酚对热毒血瘀证大鼠的清热凉血散瘀功效[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(3): 196-202.
- [3] 周玉媛, 周萌, 王起成, 等. 赤芍在银屑病各型血证中的临床应用及现代药理研究[J]. 西部中医药, 2022, 35(8): 150-153.
- [4] 张石凯, 曹永兵. 赤芍的药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2021, 39(2): 97-101.
- [5] 陆小华, 马骁, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.
- [6] 蒋合众. 苦参碱及氧化苦参碱药理作用和制备方法研究进展[J]. 实用中西医结合临床, 2007, 7(1): 89-90.
- [7] 谢辉, 毛春芹, 狄留庆. 护肝拔毒软膏质量标准研究[J]. 中成药, 2003, 25(11): 882-884.
- [8] 景倩. 赤芍配方颗粒质量标准研究[J]. 中国科技投资, 2018(28): 251.
- [9] 姜卫中, 余惠珍, 姜胜琴. 芍药颗粒的质量标准[J]. 中国药师, 2007, 10(11): 1089-1091.
- [10] 高岩, 刘奎, 俞恩珠. 眩晕宁口服液的薄层色谱鉴别[J]. 中国药师, 2006, 9(12): 1161-1162.