

玄槐止痛颗粒的质量标准研究

张浩怡, 熊悦悦, 张鹤鸣(脑认知与教育科学教育部重点实验室, 广东省中药保健食品工程技术研究中心, 华南师范大学脑科学与康复医学研究院, 广东 广州 510631)

摘要: **目的** 建立玄槐止痛颗粒的质量标准。**方法** 采用薄层色谱法对玄槐止痛颗粒中大黄、黄柏、救必应、槐花进行定性鉴别; 高效液相色谱法测定大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 5 种蒽醌类成分的含量。**结果** 薄层色谱方法专属性强, 准确简便; 含量测定方法准确, 无阴性干扰。大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚和大黄酚的含量分别为 2.334、3.315、1.943、7.373、0.778 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 且在各自线性范围内线性关系良好(r 分别为 0.999 9、0.999 8、0.999 7、0.999 9、0.999 9), 平均加样回收率分别为 98.54% (RSD=1.12%)、98.34% (RSD=0.58%)、98.05% (RSD=1.03%)、98.17 (RSD=0.77%)、97.25% (RSD=1.13%)。**结论** 所建立的鉴别方法和含量测定方法能有效控制玄槐止痛颗粒的质量, 方法专属性强、准确度高、可重复性好, 可为该制剂的质量控制提供参考。

关键词: 薄层色谱法; 反相高效液相色谱法; 质量控制; 玄槐止痛颗粒; 蒽醌类

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)07-1024-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.017

Quality Control of *Xuanhuai Zhitong* Granules

ZHANG Haoyi, XIONG Yueyue, ZHANG Heming (Guangdong Provincial Engineering Research center for Dietary Supplement, Key Laboratory of Brain Cognition and Education Science, Ministry of Education, Institute of Brain Science and Rehabilitation Medicine, South China Normal University, Guangzhou 510631 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish the quality standard for *Xuanhuai Zhitong* Granules. **Methods** TLC was used for the qualitative identification of *Phellodendron*, *Rhubarb*, *Ilex rotunda* Thunb, and *Sophora japonica*. High performance liquid chromatography (HPLC) was adopted in the content determination of five anthraquinones included aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and emodin mono methyl ether in rhubarb. **Results** TLC spots for different herbs were all clear, accurate and simple. The established method for quantitative determination were accurate with no negative interference. The contents of five anthraquinones in rhubarb, the aloe-emodin, rhein, emodin, emodin mono methyl ether and chrysophanol were respectively 2.334, 3.315, 1.943, 7.373, 0.778 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and showed good linear relationships within their own ranges (r were 0.999 9, 0.999 8, 0.999 7, 0.999 9, 0.999 9, respectively), and the average recoveries were 98.37% (RSD=2.80%), 99.13% (RSD=1.20%), 98.09% (RSD=1.54%), 98.63 (RSD=2.13%), 97.94% (RSD=1.56%). **Conclusion** The established methods were both accurate, with strong specificity and repeatability, which can be used for the quality control of *Xuanhuai Zhitong* Granules and provide an experimental basis for further research.

Keywords: TLC; RP-HPLC; quality control; *Xuanhuai Zhitong* Granule; anthraquinones

止痛如神汤源于明代医家申斗恒的《外科启玄》^[1], 清代吴谦在《医宗金鉴》中将其列为治疗痔

疮的首方^[2]。玄槐止痛颗粒由止痛如神汤化裁而成, 是珠海市人民医院肛肠外科王兰英主任医师结合近

收稿时间: 2020-12-31

作者简介: 张浩怡, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物应用。Email: hy_zhang_jluzh@163.com。通信作者: 张鹤鸣, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药药理、中药新药研发。Email: d_zhm@163.com。

基金项目: 广州市科技计划项目(201605100954069)。

30 年临床实践而总结出的经验方, 并已获得国家专利授权(201610398617.2)。全方由救必应、黄柏、制大黄、黄芩、槐花等 10 余味中药组成, 具有清热燥湿、凉血止血、活血消肿、行气止痛的功效。临床上广泛用于痔科之湿热下注、气滞血瘀症所致痔病、肛裂、肛周脓肿、结肠炎、盆底失弛缓及各种肛门直肠术后并发症, 具有良好的开发与应用前景。大黄为本制剂的君药, 主要活性成分有芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、鞣质类等^[3]。大黄具有凉血止血、消炎抑菌的作用, 其中芦荟大黄素、大黄素、大黄酸有较强消炎抑菌作用; 凉血止血作用以大黄素甲醚、大黄酚为主^[4]。此 5 种蒽醌类成分均为制剂中的主要药效成分, 而且在制剂加工制备过程中, 大黄的成分及其含量、功效易发生改变^[5]。黄柏、救必应、槐花清热燥湿增强君药凉血止血、行气止痛之力为臣药。本颗粒剂为中药新制剂, 目前未见其质量标准的研究报道。故本研究通过采用薄层色谱方法对黄柏、大黄、救必应、槐花进行定性鉴别, 并采用反相高效液相色谱法对君药大黄中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚和大黄酚进行含量测定。

1 仪器与材料

1.1 仪器 AR224CN 型电子天平(精度为万分之一, 奥豪斯仪器有限公司); 硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂); KQ-500D 型超声仪(上海乔跃仪器有限公司); DHG-9030A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); ZF 三用型紫外分析仪(北京天创尚邦仪器设备有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅(常州奥华仪器有限公司); U3000 高效液相色谱系统(G1311A 四元泵、G1329A 自动进样器、DAD 检测器, 美国赛默飞公司); Chromeleon 变色龙色谱分析软件。

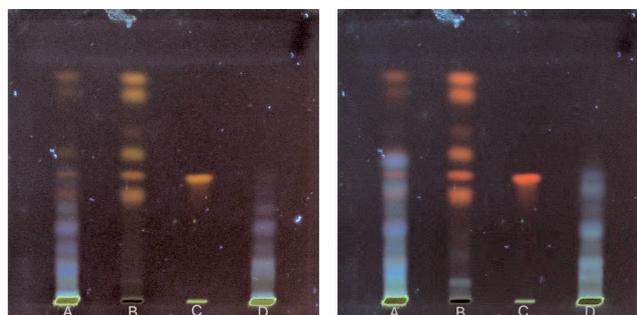
1.2 材料 对照品芦荟大黄素(批号: 110795-201710)、大黄素(批号: 110756-201913)、大黄酸(批号: 110757-201607)、大黄酚(批号: 110796-201922)、大黄素甲醚(批号: 110758-201817)、盐酸小檗碱(批号: 110713-202015)、紫丁香苷(批号: 111574-201605)、芦丁(批号: 100080-201811), 对照药材大黄(批号: 120984-201202)、黄柏(批号: 121510-201807)、救必应(批号: 121076-201303)、槐花(批号: 121063-201804), 均购自中国食品药品检定研究院; 玄槐止痛颗粒(批号: 20201124、20201125、20201126)及玄槐止痛颗粒阴性样品, 均

由广东省中药保健食品工程技术研究中心制剂室制备。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为屈臣氏纯净水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 大黄的鉴别 取玄槐止痛颗粒 2 g, 研碎, 加入甲醇 20 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 取续滤液 3 mL, 蒸干, 残渣加水 5 mL 使溶解, 再加盐酸 2 mL, 摇匀, 水浴锅加热 30 min, 立即冷却, 加入乙酸乙酯 3 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺大黄的阴性样品 0.2 g 和大黄对照药材 0.2 g, 同法制成阴性对照溶液和对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典: 一部》通则 0502)^[7]试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(12:4:0.2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外光灯(365 nm)处检视。在供试品色谱中, 在于其他两种对照溶液相应的位置上, 显相同的 5 个橙黄色的荧光主斑点, 且阴性对照在相应的位置上无干扰。氨蒸汽熏 30 min 后, 待氨蒸汽挥发完置于 105 $^{\circ}$ C 加热 3 min, 变为红色或亮蓝色主斑点。结果见图 1。



a. 未加热紫外 365 nm 下检视 b. 加热后紫外 365 nm 下检视

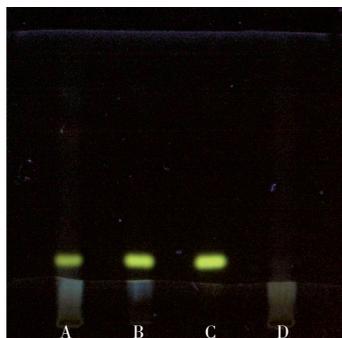
注: A. 供试品; B. 大黄对照药材; C. 大黄酸对照品; D. 阴性样品

图 1 大黄薄层色谱鉴别

Figure 1 TLC chromatograms of Rhubarb

2.1.2 黄柏的鉴别 取玄槐止痛颗粒 5 g, 研碎, 加甲醇 20 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 滤液浓缩成 5 mL, 作为供试品溶液, 另精密取黄柏对照药材 0.5 g, 加甲醇 20 mL, 同法制成对照药材溶液。取黄柏阴性样品 5 g, 同法制成阴性对照溶液。取盐酸小檗碱对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典: 一部》通则 0502)^[7]试验, 分别吸取上述 4 种溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-异丙酮-甲醇-浓氨试液(12:6:3:3:4)为展

开剂, 置氨蒸气预饱和的展开缸内展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同的黄色荧光斑点。阴性对照无干扰。结果见图 2。



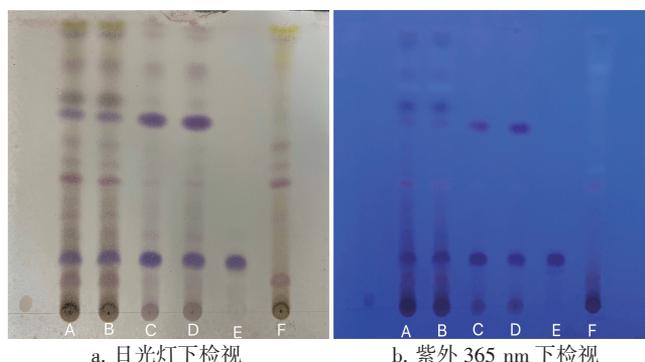
注: A. 供试品; B. 黄柏对照药材; C. 盐酸小檗碱对照品; D. 阴性样品

图 2 黄柏薄层色谱鉴别

Figure 2 TLC chromatogram of Phellodendri cortex

2.1.3 救必应的鉴别 取玄槐止痛颗粒 5 g, 研碎, 加甲醇 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次, 每次 20 mL。合并正丁醇液, 用氨试液 10 mL 洗涤, 弃去氨液, 取正丁醇液, 蒸干。残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。称取救必应对照药材 0.5 g, 同法制成对照药材溶液。取紫丁香苷对照品 1 mg, 加甲醇 1 mL 溶解, 作为对照品溶液。取缺救必应的 5 g 阴性样品, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典: 一部》通则 0502)试验, 吸取上述 4 种溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板, 以三氯甲烷-甲醇-水(10:2:0.2)为展开剂^[6], 展开, 取出, 晾干, 喷 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。日光灯和紫外光灯(365 nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照色谱相应位置上, 显相同颜色的斑点, 且阴性对照在相同位置上无干扰, 证明鉴别方法可行。结果见图 3。

2.1.4 槐花 取玄槐止痛颗粒 10 g, 研碎, 加入甲醇 40 mL, 密塞, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液作为供试品溶液。称取槐花对照药材 0.5 g, 加入甲醇 25 mL, 同法制成对照药材溶液; 再取缺槐花的阴性样品 5 g, 同法制成阴性对照溶液。另取芦丁对照品 4 mg, 加甲醇 1 mL 使溶解, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典: 一部》通则 0502)试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,

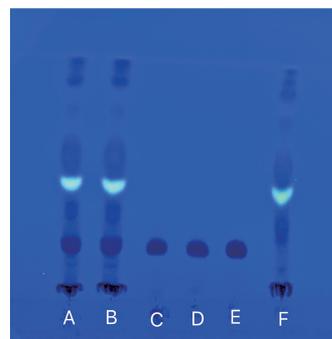


注: A~B. 供试品; C~D. 救必应对照药材; E. 紫丁香苷对照品; F. 阴性样品

图 3 救必应薄层色谱鉴别

Figure 3 TLC chromatogram of *Ilex rotunda* Thunb

以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 3% 的三氯化铝乙醇溶液, 待乙醇挥发干后, 氨蒸气中熏 30 min, 置于紫外 365 nm 处观察, 在供试品色谱中, 在与对照色谱相同的位置上有相同颜色斑点, 阴性对照在相应位置上无干扰。结果见图 4。



注: A~B. 供试品; C~D. 槐花对照药材; E. 芦丁对照品; F. 阴性样品

图 4 槐花薄层色谱鉴别

Figure 4 TLC chromatogram of *Sophorae flos*

2.2 含量测定

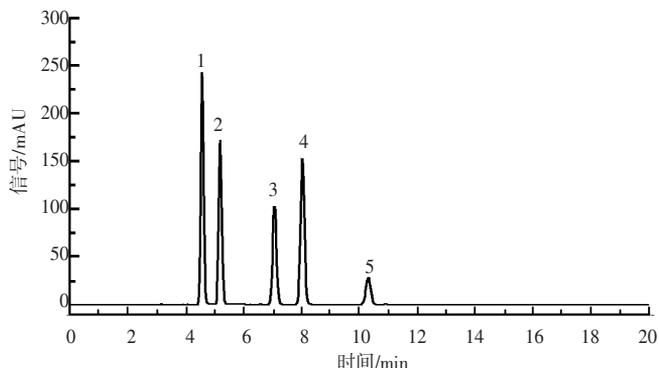
2.2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil GOLD™(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15); 检测波长: 254 nm; 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。理论塔板数按大黄素峰计算大于 3 000。

2.2.2 混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液的制备 ①混合对照品溶液: 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量, 加甲醇分别制成每毫升含有芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别为 100、80、70、90、50 μ g 的对照品溶液, 分别精密量取上述 5 种对照品溶液各 200 μ L, 混匀, 即得(芦荟大黄素、大黄

酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为 20、16、14、18、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。②供试品溶液：精密称定玄槐止痛颗粒(批号：20201124)1 g，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定质量，加热回流 1 h，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，振摇均匀，滤过。精密量取续滤液 5 mL，置烧杯中，挥去溶剂，加 8% 的盐酸溶液 10 mL，超声处理 5 min；再加三氯甲烷 10 mL，加热回流 1 h，放冷，置分液漏斗中，用少量的三氯甲烷洗涤容器，并入分液漏斗中；分取三氯甲烷层，盐酸液再用三氯甲烷振摇提取 3 次，每次 10 mL；合并三氯甲烷液，减压回收溶剂至干，残渣加甲醇使溶解，转移至 10 mL 的量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得^[7]。③阴性对照溶液：精密称取缺大黄的阴性样品 1 g，按供试品溶液制备方法制成阴性对照样品溶液。

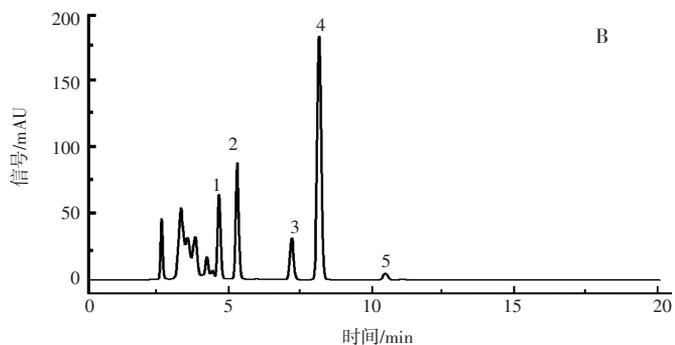
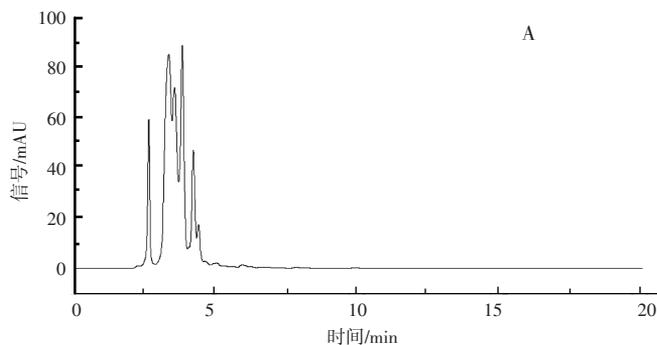
2.2.3 阴性干扰试验 取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照样品溶液，在上述色谱条件下分别进样，得到相应的色谱图，见图 5~6。结果表明供试品

溶液中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚色谱峰与其他组分完全分离，峰形对称性好，阴性对照溶液在相同的保留时间内对芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的测定无干扰。



注：1. 芦荟大黄素；2. 大黄酸；3. 大黄素；4. 大黄酚；5. 大黄素甲醚
图 5 混合对照品溶液高效液相色谱图

Figure 5 HPLC chromatograms of Aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol, emodin mono methyl ether



注：A. 阴性对照样品；B. 玄槐止痛颗粒。1. 芦荟大黄素；2. 大黄酸；3. 大黄素；4. 大黄酚；5. 大黄素甲醚

图 6 玄槐止痛颗粒高效液相色谱图

Figure 6 HPLC chromatograms of Xuanhuai Zhitong Granules

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下配置的对照品溶液，分别配置成芦荟大黄素浓度分别为：100、50、33.3、25、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；大黄酸浓度分别为：80、40、26.7、20、16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；大黄素浓度分别为：70、35、23.3、17.5、14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；大黄酚浓度分别为：90、45、30、22.5、18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；大黄素甲醚浓度分别为：50、25、16.7、12.5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液，精密吸取 10 μL ，注入高效液相色谱仪，按上述色谱条件进行测定。以峰面积(Y)为纵坐标，进样量(X, μg)为横坐标，以最小二乘法进行线性回归，得到的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的线性考察结果

见下表 1。结果表明，芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚在线性范围内具有良好的线性关系。

表 1 线性关系考察结果

Table 1 The standard curve of Aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol, emodin mono methyl ether

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
芦荟大黄素	$Y=24.0776X-0.0933$	0.9999	0.2~1
大黄酸	$Y=32.4818X-0.4500$	0.9998	0.16~0.8
大黄素	$Y=0.2425X-0.2387$	0.9997	0.14~0.7
大黄酚	$Y=0.3041X+0.5650$	0.9999	0.18~0.9
大黄素甲醚	$Y=0.3607X-0.1002$	0.9999	0.1~0.5

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下的混合对照品溶液(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为 100、80、70、90、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 连续进样 6 次, 按“2.2”项下色谱条件测定峰面积, 结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积的 RSD 分别为 0.713%、0.308%、0.517%、1.297%、0.153%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取“2.2.2”项下制备的供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10、15、20、24 h, 按“2.1”项下色谱条件分别进样 10 μL , 测定峰面积, 结果供试品溶液中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积的 RSD($n=9$)分别为 0.90%、0.79%、1.36%、1.08%、1.14%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批样品(批号: 20201124)1 g, 按照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别测定峰面积, 结果供试品溶液中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积的 RSD($n=6$)分别为 1.57%、1.14%、1.09%、0.89%、1.35%, 表明方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取同一批已知芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的样品(批号: 20201124)适量, 研细, 精密称取约 1 g, 共 5 份, 置于 25 mL 量瓶中, 分别精密加入芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 加甲醇稀释, 加热回流 1 h, 放冷, 定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 按“2.2.1”项下的色谱条件测定。结果见表 2。

2.2.9 样品含量测定 取 3 批玄槐止痛颗粒样品, 分别精密称取 1.5 g, 按照“2.2.2”项下方法制备样品溶液(平行操作 3 份), 按“2.1”项下色谱条件测定。结果见表 3。

3 讨论

本研究采用薄层色谱对玄槐止痛颗粒中的大黄、黄柏、救必应、槐花进行定性鉴别。在薄层色谱试验中, 选择了默克(merck)、青岛海洋以及自制的硅胶 G 板进行耐用性考察。结果发现默克和青岛海洋的薄层板效果相似, 且优于自制薄层板。故本研究选择了青岛海洋薄层板。同时, 对薄层色谱试验的温度(5 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$)和湿度(15% 和 75%)进行了考

表 2 加样回收率试验结果($n=5$)

Table 2 Results of the recovery tests($n=5$)

成分	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芦荟大黄素	1.003 1	2.448 6	2.458 8	4.835 7	98.54	98.54	1.12
	1.102 1	2.781 1	2.660 0	5.259 9	96.67		
	1.100 3	2.804 4	2.798 2	5.563 9	99.31		
	1.101 3	2.563 0	2.703 3	5.240 1	99.50		
	1.000 3	2.778 0	2.530 2	5.240 8	98.70		
大黄酸	1.020 1	3.416 5	3.590 3	6.819 7	97.33	98.34	0.58
	1.003 2	3.191 3	3.101 1	6.103 0	96.99		
	1.019 2	3.470 3	3.690 0	7.072 2	98.77		
	1.021 1	3.230 2	3.490 8	6.608 0	98.32		
	1.002 1	3.432 0	3.602 8	6.789 3	96.51		
大黄素	1.021 0	2.054 4	2.102 3	4.129 3	99.34	98.05	1.03
	1.002 2	2.009 9	2.102 2	4.009 7	97.51		
	1.020 0	1.947 6	2.001 2	3.910 1	99.02		
	1.019 9	2.013 3	2.002 1	3.961 0	98.67		
	1.000 3	2.001 2	2.100 1	3.977 8	96.99		
大黄酚	1.003 2	7.787 7	7.407 0	14.789 0	97.33	98.17	0.77
	1.000 2	7.257 9	7.300 0	14.329 3	98.43		
	1.023 0	7.517 9	7.307 8	14.512 9	97.89		
	1.010 0	7.350 8	7.301 1	14.651 9	97.88		
	1.003 1	7.569 4	7.330 9	14.900 3	99.33		
大黄素甲醚	1.003 0	0.756 9	0.700 3	1.410 4	96.79	97.25	1.13
	1.012 9	0.825 4	0.820 0	1.601 5	97.33		
	1.020 1	0.660 5	0.628 9	1.238 5	96.05		
	1.003 2	0.760 9	0.800 1	1.515 5	97.09		
	1.019 9	0.793 3	0.802 2	1.580 0	99.03		

表 3 玄槐止痛颗粒中 5 种蒽醌类成分的含量测定结果($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

Table 3 Determination of five anthraquinones in Xuanhuai Zhitong Granules($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
20201124	2.140 2	3.432 1	1.901 1	7.338 2	0.773 3
20201125	2.399 8	3.306 3	1.899 7	7.290 3	0.782 3
20201126	2.463 0	3.207 9	2.026 8	7.489 0	0.779 7
平均值	2.334 3	3.315 4	1.942 5	7.372 5	0.778 4

察, 发现温度和湿度对本试验方法系统的影响较小, 结果均符合要求, 故本试验在室温进行即可。

薄层色谱法鉴定大黄时, 根据《中国药典》大黄薄层色谱法的展开系统以及文献方法^[6]的展开系统乙酸乙酯-甲酸-水(9:1:2), 展开发现特征斑点不清晰且斑点存在拖尾现象。故对展开剂的极性进行调节, 最终采用乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1)作为展开剂, 斑点分离度好, 显色清晰, 无拖尾现象以及阴性干扰。根据《中国药典》对黄柏的薄层鉴别的要

求,以盐酸小檗碱、盐酸黄檗碱为鉴别黄柏的指标性成分,但以黄檗碱为薄层鉴别成分时,斑点显色不清晰,效果不理想,经研究最终采用含量相对较高的盐酸小檗碱作为黄柏的鉴别成分。同时对黄柏薄层鉴别的展开系统进行考察,发现将甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-水(6:3:2:1.5:0.3)^[9]中的水换成氨水,并把氨水比例调到 0.4,结果成分分离度好,特征斑点清晰,阴性对照无干扰。在救必应的薄层鉴别中,考察了三氯甲烷-甲醇-无水甲酸^[10]展开系统的不同比例,并对点样量进行考察。结果显示以三氯甲烷-甲醇-水(10:2:0.2)为展开剂,且供试品点样量为 4 μL ,对照药材和对照品为 2 μL ,喷完显色剂后置于烘箱中 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min,斑点显色清晰,分离度好。在槐花鉴别中,依照《中国药典》中槐花的鉴别方法处理样品,发现特征斑点不清晰,背景板较深。实验对样品处理方法进行调节后发现,本研究所用的供试品处理方法,成分分离度好,斑点清晰。

在含量测定的研究中,对流动相(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.4%磷酸溶液及流动相的不同比例)和柱温(20、25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$)^[11-13]进行了考察。结果发现,最终确定的流动相和柱温条件,对大黄中 5 种蒽醌类成分的分度好,峰形稳定,保留时间适合,没有阴性干扰和拖尾现象。同时,选择了不同色谱柱(Phenomenex、Thermo Accucore 和 Thermo Hypersil)、不同流速(0.7、1、1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)和不同提取方法(超声提取 30 min 和加热回流 1 h)进行耐用性考察。结果表明以 Thermo Hypersil 色谱柱、流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、加热回流的提取方法效果较好。

本研究采用薄层色谱方法对玄槐止痛颗粒中的大黄、黄柏、救必应、槐花进行了鉴别,反相高效液相色谱法定量测定了制剂中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。所建立的方法简单、准确、专属性强,斑点清晰,重现性好,

可为该制剂的质量标准研究提供依据。但是,本研究仍有部分主要药效成分在 254 nm 波长下,分离度不好或者峰面积吸收低,难以进行含量测定。在后续的研究中,可以尝试梯度洗脱方法或多波长检测方法对多个有效成分同时进行检测。

参考文献:

- [1] 夏殷. 止痛如神汤临证应用体会[J]. 中国中医急症, 2014, 23(5): 989-990.
- [2] 徐海霞, 赵长胜, 张妍, 等.《医宗金鉴》狼毒膏联合艾灸肠风穴治疗慢性肛周湿疹的临床观察[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(5): 905-909.
- [3] XUE H Y, JIAO C Y, YAO J. Current status of pharmacological effects of glycosides of herba cistanches[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2018, 34(4): 486.
- [4] LIU X, LI C M, GAO J D, et al. The development of the research of herba cistanches[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2013, 20(5): 575-576.
- [5] HUAZHEN S U, XIUMEI M A, JIANGCUN W, et al. Processing of rhubarb and determination of five free anthraquinones in raw rhubarb and stewed rhubarb[J]. Medicinal Plant, 2020, 11(5): 44-48.
- [6] 廖娟, 黄月纯. 胃肠舒片薄层鉴别研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(2): 28-30.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 24-25.
- [8] 唐立海, 朱寿光, 杨光英, 等. 益气聪明丸质量标准提高研究[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(4): 580-586.
- [9] 王秀芹, 侯惠婵, 林彤. 腹可安片质量标准改进研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 663-665.
- [10] 刘静. 骨复康胶囊的薄层色谱鉴别[J]. 药物鉴定, 2008, 17(6): 32-33.
- [11] 张博闻, 姚奇志, 文晓娟, 等. HPLC 测定加味升降散中 5 种大黄蒽醌类成分含量[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1399-1402.
- [12] 张世波, 皮凤娟, 黄娟, 复方大黄软膏质量标准研究[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(7): 39-42.

(编辑: 梁进权)