

蛇床子搽剂的质量标准研究^Δ

韩雪^{1*}, 柴金苗^{2#}, 李钦青¹, 王永辉³ (1.山西中医药大学中药学院, 太原 030619; 2.山西中医药大学中西医结合临床学院, 太原 030619; 3.山西中医药大学实验管理中心, 太原 030619)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1245-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.22

摘要 目的:初步拟定蛇床子搽剂(简称为“搽剂”)的质量标准。方法:观察搽剂的性状,采用薄层色谱法对搽剂中蛇床子素进行定性鉴别并对搽剂的相对密度、含醇量和pH值等进行测定,采用高效液相色谱法对搽剂中蛇床子素和欧前胡素进行定量分析。结果:3批样品均为红棕色液体,气香。在供试品薄层色谱中,在与对照品色谱相应位置上显现出相同颜色的荧光斑点。蛇床子素和欧前胡素检测质量浓度的线性范围分别为0.101 2~0.910 8、0.006 2~0.124 4 mg/L(r 均为0.999 6),精密度试验的RSD分别为1.38%、0.79% ($n=6$),稳定性试验的RSD分别为0.33%、0.41% ($n=6$),重复性试验的RSD分别为0.83%、1.98% ($n=6$),平均加样回收率分别为98.73%、99.25% (RSD分别为1.29%、1.22%, $n=6$);含量测定结果显示,3批样品中蛇床子素含量为2.20~2.35 mg/mL,欧前胡素为0.310~0.340 mg/mL。结论:建立的方法操作简单、快速、准确,可用于蛇床子搽剂的质量控制。

关键词 蛇床子搽剂;薄层色谱法;蛇床子素;欧前胡素;高效液相色谱法;质量标准

Study on Quality Standard of *Cnidium monnieri* Liniment

HAN Xue¹, CHAI Jinmiao², LI Qinqing¹, WANG Yonghui³ (1.College of TCM, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030619, China; 2.Clinical College of Combination of TCM and Western Medicine, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030619, China; 3.Experimental Management Center, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030619, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To formulate the quality standard of *Cnidium monnieri* liniment (called “liniment” for short) preliminarily. METHODS: The property of liniment was observed. TLC was used for qualitative identification of osthole in liniment; relative density, alcohol content and pH value were also determined. The osthole and imperatorin in liniment were

外,由于僵蚕粉末入药疗效受多种因素的共同影响,故未来仍需对僵蚕的药动学特征等进行系统研究。

参考文献

- [1] 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,2015:375.
- [2] 南北朝·雷斅.雷公炮炙论通解[M].西安:三秦出版社,2001:74.
- [3] 王翊.握灵本草[M].叶新苗,校注.北京:中国中医药出版社,2012:183.
- [4] 南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2008:1021-1022.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1998:179-182.
- [6] 赵琦,周建国.虫类中药辨治小儿哮喘临床体会[J].医药

前沿,2016,6(34):330-331.

- [7] 韦燕博,张奇,程为平,等.僵蚕临床应用举隅[J].山东中医杂志,2015,34(12):961-962.
- [8] 孙小菊,徐丽君,魏世超,等.黄连粉末与煎剂在胃液中溶出性能比较[J].时珍国医国药,2013,24(8):1910-1912.
- [9] 徐莹.僵蚕炮制前后蛋白质的差异研究[D].镇江:江苏大学,2016:19.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知:中药饮片卷[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:973.
- [11] 王秋红,赵珊,王鹏程,等.半仿生提取法在中药提取中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(18):187-191.
- [12] 薛璇玑,罗俊,张新新,等.半仿生酶法提取柿叶中总黄酮的工艺筛选及优化[J].中国药房,2017,28(13):1813-1816.
- [13] 李晶峰,孙佳明,张辉,等.僵蚕的化学成分及药理活性研究[J].吉林中医药,2015,35(2):175-177.
- [14] 徐冲,商思阳,刘梅,等.僵蚕化学成分和药理活性的研究进展[J].中国药房,2014,25(39):3732-3734.

Δ基金项目:山西省科技创新团队建设计划项目(No.2013131022);山西省科技创新项目(No.2008101017)

* 讲师,硕士。研究方向:中药物质基础及新药开发。电话:0351-3179903。E-mail:sever_2001@126.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中医目系理论及相关药物的研究。电话:0351-3179842。E-mail:jinmiaoch@163.com

(收稿日期:2017-09-05 修回日期:2017-11-28)

(编辑:林静)

analyzed qualitatively by HPLC. RESULTS: 3 batch of samples were reddish brown liquid and fragrant smelling. In TLC of test sample, the same color fluorescent spots were found in corresponding position as chromatogram of control sample. The linear range of osthole and imperatorin were 0.101 2-0.910 8 ($r=0.999\ 6$) and 0.006 2-0.124 4 mg/L ($r=0.999\ 6$). RSDs of precision tests were 1.38% and 0.79% ($n=6$). RSDs of stability tests were 0.33% and 0.41% ($n=6$). RSDs of reproducibility tests were 0.83% and 1.98% ($n=6$), respectively. Average recoveries rate were 98.73% (RSD=1.29%, $n=6$) and 99.25% (RSD=1.22%, $n=6$). Results of content determination showed that the content of osthole and imperatorin were 2.20-2.35 mg/mL and 0.310-0.340 mg/mL, respectively. CONCLUSIONS: Established method is simple, rapid, accurate and can be used for quality control of *C. monnieri* liniment.

KEYWORDS *Cnidium monnieri* liniment; TLC; Osthole; Imperatorin; HPLC; Quality standard

蛇床子为伞形科植物蛇床的干燥果实,味辛、苦,性温,具有温肾壮阳、祛风燥湿的功效。蛇床子及其制剂在临床上已应用多年,包括散剂、软膏、洗剂、酊剂等,主要用于治疗湿疹等各种瘙痒性疾病^[1-7]。蛇床子的有效化学成分主要为香豆素类化合物,包括蛇床子素、欧前胡素等^[8],其中具有较强活性的单体成分为蛇床子素,其含量为蛇床子的质量控制标准之一^[9-11]。蛇床子作为常用外用药,一般采用传统煎煮法进行提取^[12]。已有的研究表明,以水提法提取蛇床子其有效成分的提取率很低^[13]。另有研究表明,蛇床子止痒的有效成分主要为其醇提取物和挥发油^[14],并且采用醇提蛇床子素的提取效果最优^[15]。因此,为了更利于蛇床子素等脂溶性有效成分的提取,笔者改变了传统的提取方法,选用乙醇作为提取溶剂制备了蛇床子搽剂。为更好地保证该制剂的疗效,控制蛇床子搽剂的内在质量,笔者采用薄层色谱法对蛇床子搽剂进行定性鉴别,同时对其相对密度、含醇量及pH值等进行测定,并建立同时测定蛇床子搽剂中蛇床子素和欧前胡素两种组分的高效液相色谱方法,初步拟定蛇床子搽剂的质量标准。

1 材料

1.1 仪器

Waters E2695 高效液相色谱仪,包括 e2695 分离单元、2998 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);TU-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);FB224 自动内校电子分析天平(上海舜禹恒平科学仪器有限公司);AB135-S 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);PHS-3C 经济型酸度计(成都世纪方舟科技有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

蛇床子药材(产地:安徽)购自河北省安国中药材市场,由山西中医学院中药鉴定教研室王兵老师鉴定为真品;蛇床子搽剂(山西中医药大学自制,批号分别为:20170311、20170312、20170313,规格:50 mL/瓶);蛇床子对照品(批号:110822-201609,纯度:100%)、欧前胡素对照品(批号:110826-201415,纯度:98%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,乙醇、甲苯、乙

酸乙酯、正己烷等均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 蛇床子搽剂的制备

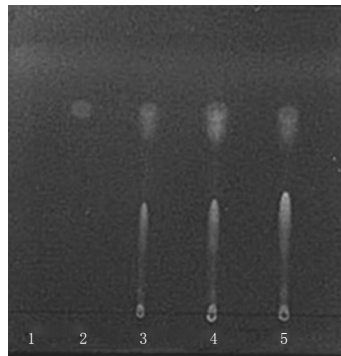
取蛇床子药材 200 g,粉碎成中粉,加入 75% 乙醇 1 100 mL,浸渍 24 h,然后以 3 mL/min 渗漉提取,收集滤液,滤液加 75% 乙醇调整至 1 000 mL,滤过,即可。

2.2 性状

取本品 3 批(批号:20170311、20170312、20170313)进行性状观察。结果,3 批样品均为暗棕红色的液体,气香。

2.3 蛇床子素定性鉴别

取本品 3 批(批号:20170311、20170312、20170313),作为供试品溶液;另取蛇床子素对照品适量,用无水乙醇制成 1 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液;另取 75% 乙醇,作为阴性对照溶液。按 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0502 法^[10]进行薄层色谱鉴别,分别吸取上述 5 个溶液各 0.5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-正己烷(3:3:2, V/V/V)为展开剂展开,取出,晾干,置于紫外灯(365 nm 波长)下检视。结果,供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照溶液无干扰,结果见图 1。



注:1.阴性对照;2.蛇床子素对照品;3.供试品(批号:20170311);4.供试品(批号:20170312);5.供试品(批号:20170313)

Note: 1. negative control; 2. osthole control; 3. sample (batch number: 20170311); 4. sample (batch number: 20170312); 5. sample (batch number: 20170313)

图 1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram

2.4 相对密度

分别取本品3批(批号:20170311、20170312、2017-0313),参考2015年版《中国药典》(四部)通则0601中比重瓶法^[10]进行测定。结果,3批样品的相对密度分别为0.89、0.89、0.88,暂定蛇床子搽剂的相对密度为0.85~0.93。

2.5 含醇量

分别取本品3批(批号:20170311、20170312、2017-0313),参考2015年版《中国药典》(四部)通则0711中第二法——蒸馏法^[10]进行测定。结果,3批样品的含醇量分别为69%、70%、70%,暂定蛇床子搽剂的含醇量为65%~75%。

2.6 pH值

分别取本品3批(批号:20170311、20170312、2017-0313),参考2015年版《中国药典》(四部)通则0631项下方法^[10]测定。结果,3批样品的pH值分别为6.20、6.17、6.20,暂定蛇床子搽剂的pH值为6.0~6.5。

2.7 蛇床子素、欧前胡素含量测定

2.7.1 色谱条件 色谱柱:Waters C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(65:35, V/V)等度洗脱;流速:1.0 mL/min;检测波长:320 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.7.2 对照品溶液的制备 (1)蛇床子素对照品溶液:取蛇床子素对照品适量,精密称定,加无水乙醇制成质量浓度为0.506 mg/mL的对照品贮备液;精密量取1 mL贮备液于10 mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,得质量浓度约0.0506 mg/mL的对照品溶液。(2)欧前胡素对照品溶液:取欧前胡素对照品适量,精密称定,加无水乙醇制成质量浓度为0.311 mg/mL的对照品贮备液;精密量取1 mL贮备液于10 mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,得质量浓度约0.0311 mg/mL的对照品溶液。

2.7.3 供试品溶液的制备 精密量取本品2 mL,置于25 mL量瓶中,加75%乙醇稀释至刻度,摇匀,然后以离心半径为6 cm、6 000 r/min离心10 min,收集上清液。精密量取上清液5 mL,加75%乙醇稀释,定容,摇匀,0.22 μm微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液作为供试品溶液。

2.7.4 系统适用性试验 取“2.7.2”项下对照品溶液、“2.7.3”项下供试品溶液以及空白溶液(75%乙醇),分别按“2.7.1”项下条件进样,记录色谱。结果,空白溶液对蛇床子素和欧前胡素测定无干扰,相邻峰间分离度大于1.5,按蛇床子素和欧前胡素计理论板数均在5 000以上。色谱图见图2。

2.7.5 线性关系考察 分别精密量取“2.7.2”项下对照品溶液0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,分别置于5 mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀。按照“2.7.1”项下色谱条件进

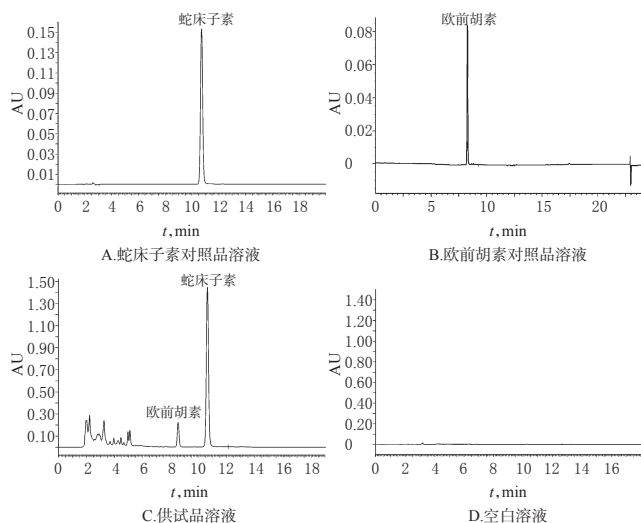


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

样测定,记录峰面积。以对照品溶液的质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析,得蛇床子素的回归方程为 $y=326\ 724x+1\ 678$ ($r=0.999\ 6$),欧前胡素的回归方程为 $y=3.33\times 10^6x+41\ 313$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,蛇床子素和欧前胡素检测分别在质量浓度为0.101 2~0.910 8、0.006 2~0.124 4 mg/mL范围内线性关系良好。

2.7.6 精密度试验 精密吸取“2.7.2”项下对照品溶液10 μL,在“2.7.1”色谱条件下连续进样6次,测得欧前胡素和蛇床子素峰面积的RSD分别为1.38%、0.79%($n=6$),表明仪器的精密度良好。

2.7.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:20170311),在室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h后分别按“2.7.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。结果,欧前胡素和蛇床子素峰面积的RSD分别为0.33%、0.41%($n=7$),表明供试品溶液在室温条件下12 h内稳定性良好。

2.7.8 重复性试验 精密吸取同一供试品溶液(批号:20170311)2 mL,共6份,按“2.7.3”项下的方法制备供试品溶液,再按“2.7.1”项下色谱条件下进样测定,记录峰面积。结果,欧前胡素和蛇床子素峰面积的RSD分别为0.83%、1.98%($n=6$),表明重复性良好。

2.7.9 准确度试验 精密量取已知蛇床子素含量(0.451 mg/mL)和已知含量欧前胡素含量(为0.056 mg/mL)的供试品(批号均为20170311)溶液2 mL,分别置于25 mL量瓶中,加入蛇床子素对照品溶液(0.45 mg/mL)或欧前胡素对照品溶液(0.056 mg/mL)2 mL,然后分别加入75%乙醇至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液,平行制备6份。然后按照“2.7.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积并计算平均加样回收率。结果,蛇床子素、欧前胡素的平均加样回收率分别为98.73%、99.25%,RSD分

别为1.29%、1.22% ($n=6$),表明仪器准确度较好。

2.7.10 样品含量测定 分别精密吸取3批供试品溶液和2种对照品溶液各10 μL ,按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以外标法计算样品中蛇床子素和欧前胡素含量。结果,批号为20170311的样品溶液中蛇床子素和欧前胡素的含量分别为2.25、0.325 mg/mL;批号为20170312的样品溶液中蛇床子素和欧前胡素的含量分别为2.35、0.340 mg/mL;批号为20170313的样品溶液中蛇床子素和欧前胡素的含量分别为2.20、0.310 mg/mL。

3 讨论

蛇床子是治疗多种皮肤病的最常用药物之一,临床多以外用为主,在治疗瘙痒症的诸多复方中,蛇床子亦为主药。中药成方制剂中含蛇床子的制剂多为熏洗方,且蛇床子的提取方式多为煎煮法或水提醇沉法。药理学研究发现^[16],蛇床子素可以抑制组胺引起的瘙痒,其作用机制为调节与组胺依赖性瘙痒相关的离子通道,但水提物无显著止痒效果^[17]。在前期研究中,笔者以蛇床子素为主要筛选指标,对提取方式、溶剂浓度、溶剂用量等因素进行了考察,同时综合考虑工业生产效率与提取成本的影响,最终确定以75%乙醇作为提取溶剂进行提取。考虑到所分析生物碱类物质的极性较强,水溶性较好,以及在色谱柱上的保留问题,笔者在预试验中尝试了不同类型(Waters、Agilent、Thermo)的色谱柱,结果Waters色谱柱对生物碱类化合物的保留和分离效果更好。

搽剂是药材提取物、药材细粉或挥发性药物用乙醇、水或适宜的溶剂制成的澄清或混悬的外用液体制剂。本研究按照2015年版《中国药典》(四部)1107搽剂制剂通则的要求^[10],对蛇床子搽剂的相对密度、pH值和乙醇量均进行了考察,可为该制剂的质量控制提供依据。本研究中蛇床子素的鉴别参考了药典中蛇床子的分析方法进行薄层展开,结果所得斑点较为清晰,阴性无干扰,专属性较强,方法可行,但其有效成分蛇床子素常温下不稳定,需注意低温贮藏,且操作时间不宜过长。此外,本研究还建立了同时测定蛇床子素和欧前胡素2个主要活性成分含量的方法。

本研究所建立的质量标准可控性高,能全面有效地控制蛇床子搽剂的质量,为蛇床子搽剂的疗效控制提供了可靠保障。

参考文献

- [1] 王艳华,王谨言,关晓梅.苦参、蛇床子、苍术等中药制剂治疗宫颈HPV感染临床研究[J].陕西中医,2017,38(10):1337-1338.
- [2] 肖卫红,杨全伟,徐宏峰,等.高效液相色谱法同时测定洁阴灵洗剂中苦参碱和蛇床子素的含量[J].医药导报,2015,34(12):1654-1656.
- [3] 庄美芬,束兰娣.蛇床子阴洗方外用联合知柏地黄丸口服治疗肾虚湿热型老年性阴道炎疗效观察[J].北京中医药,2015,34(8):657-658.
- [4] 赵莹莹,伍冠一,邵容格,等.中药成方制剂中含蛇床子方剂的用药规律分析[J].中国民族民间医药,2017,26(16):9-12.
- [5] 张瑞青.地肤子、蛇床子等在治疗会阴侧切口硬肿的临床疗效观察[J].中医临床研究,2012,4(22):28-29.
- [6] 王锦兰.蛇床子搽剂治疗湿疹39例[J].中国民间疗法,2007,15(10):21.
- [7] 郭汉香,廖镜云.复方蛇床子洗液治疗湿疹60例临床观察[J].实用中医药杂志,2006,22(6):365-366.
- [8] 李坤平,高崇凯,李卫民. UPLC/ESI-TOF-MS/MS分析蛇床子提取物中香豆素类化合物[J].中成药,2009,31(4):584-587.
- [9] 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,2015:315.
- [10] 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,2015:37、57、7789.
- [11] 郑立卿,张力,董晓华,等.蛇床子素药理作用研究进展[J].神经药理学报,2013,3(6):29-35.
- [12] 朱学明,周道年,黄付伟,等.复方蛇床子洗剂制备工艺研究[J].亚太传统医药,2016,12(21):22-24.
- [13] 邹霞,熊爱珍.正交试验优选蛇床子中蛇床子素提取工艺[J].中国药房,2009,20(21):1626-1627.
- [14] 刘明平,吴依娜,韦品清,等.蛇床子止痒有效组分筛选及作用机制研究[J].医药导报,2009,15(7):66-67.
- [15] 张荣,方庆.蛇床子素提取制备工艺的研究[J].中华中医药学刊,2003,21(8):1336.
- [16] YANG NN, SHI H, YU G, et al. Osthole inhibits histamine-dependent itch via modulating TRPV1 activity[J]. *Sci Rep*, 2016. DOI: 10.1038/srep25657.
- [17] 彭涛,冯玛莉,周然.蛇床子止痒有效成分的筛选[J].中国药物与临床,2002,2(5):283-285.

(收稿日期:2017-11-16 修回日期:2018-02-26)

(编辑:林静)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅