

三伏贴凝胶膏剂质量标准研究*

刘 军, 王银洁, 李文静, 赵锦涛, 柳 茜

(银川市中医医院, 宁夏 银川 750001)

摘要: 目的 制定“三伏贴”凝胶膏剂的质量标准。方法 采用薄层色谱法(TLC)对方中的麻黄、延胡索进行定性鉴别,运用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中的芥子碱硫氰酸盐进行含量测定。结果 TLC 斑点清晰,分离度良好,阴性对照无干扰;芥子碱硫氰酸盐在 0.0109~0.0872mg/mL 与峰面积分值呈良好的线性关系($r=1.0000$),平均加样回收率为 98.33%,RSD=2.01%。结论 所建立的定性定量方法分离度好,简便,专属性好,可用于三伏贴凝胶膏剂的质量控制。

关键词: 三伏贴; 凝胶膏剂; 质量标准; 芥子碱硫氰酸盐

中图分类号: R286.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)03-0022-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.006

哮喘和过敏性鼻炎为临床常见病。国家中医药管理局“中医适宜技术推广项目”中药三伏贴穴位敷贴法在治疗呼吸系统疾病中的哮喘、过敏性鼻炎疗效较好、优势明显^[1]。但由于传统贴膏无质量标准,各批次间皮肤刺激性差异较大,部分人群敷药后局部出现皮肤表皮下渗液形成水泡^[2-4],甚至形成永久疤痕而难以被患者接受,影响伏贴疗法的继续进行,且疗效评定因制剂无标准而缺乏可靠依据^[5]。为寻求反应可控、方便经济且疗效更佳三伏贴新剂型,我院在多年冬病夏治三伏贴的临床及科研基础上研制了三伏贴凝胶膏剂。其组方是根据目前广泛应用的《张氏医通·诸气门》中的消喘膏临床加减,由白芥子、麻黄、细辛、延胡索、干姜、姜汁等组成^[5-7]。本文旨在通过建立制剂中麻黄、延胡索的薄层鉴别,并对方中白芥子的主要有效成分芥子碱硫氰酸盐含量进行测定,以期建立该制剂的质量标准,近而通过临床验证形成疗效稳定可控的治疗哮喘、过敏性鼻炎的医院中药制剂,更好地推广和提升中医特色医疗技术水平。

1 材料

1.1 仪器

1260 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,配有 G1315D DAD 检测器);Agilent 5TC-C18 色谱

柱(460*250mm,5 μ m),超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司);电子天平(METTLER TOLEDO*S205);SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市宇翔仪器有限公司)

1.2 试药

芥子碱硫氰酸盐(批号 111702-201504),购自中国食品药品检定研究院,磷酸二氢钾(批号 20120730,天津基准化学试剂有限公司),水为超纯水,乙腈为色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司),其他试剂均为化学纯。薄层 G 板(青岛海洋化工厂分厂,规格:50*100mm)三伏贴凝胶膏剂自制(批号 20160215,20160304,20160307)

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

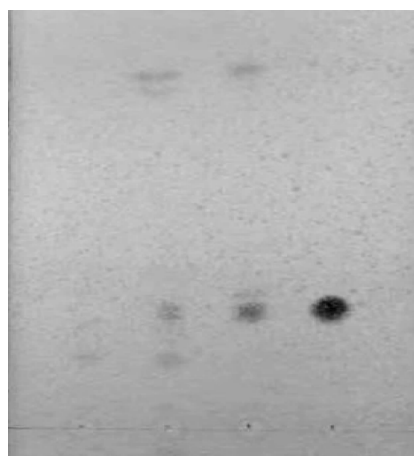
麻黄^[8-10]取三伏贴凝胶膏剂内容物约 15g,加氯仿 50mL,加浓氨水数滴(调至 pH=9~10),加热回流 1h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL 溶解并充分振摇,作为供试品溶液。取缺麻黄的阴性样品约 15g,同法制成阴性对照溶液。取麻黄对照药材 0.5g,同法制成对照药材溶液;取盐酸麻黄碱适量,甲醇溶解,作为对照品溶液。分别吸取 8 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板,以氯仿-甲醇-浓氨试液(20:5:0.5)为展开剂,展开,取出,凉干,喷以茚三酮试液,加热至斑

* 基金项目: 2014 年银川市科技发展计划(2014057)

收稿日期: 2016-04-01

作者简介: 刘军(1971-),男,宁夏银川人,主任药师,研究方向:医院制剂开发。E-mail:nxlj@163.com

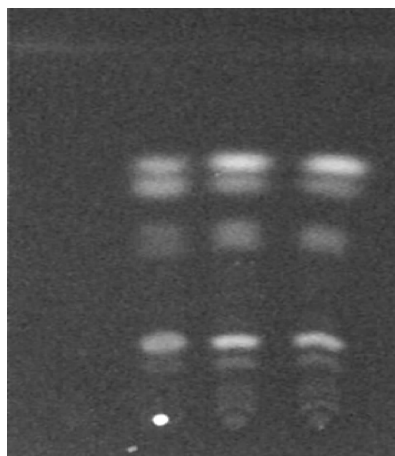
点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材与对照品色谱相应的位置上,显相同的红色斑点,且阴性无干扰。结果见图1。



1. 阴性对照溶液; 2. 麻黄对照药材溶液; 3. 供试品溶液; 4. 盐酸小檗碱对照品溶液

图1 三伏贴凝胶膏剂之麻黄的薄层鉴别图

延胡索^[11-13]取三伏贴凝胶膏剂内容物约15g,参照2015年版《中国药典》,加甲醇50mL,超声30min,滤过,滤液蒸干后加水10mL使之溶解,加浓氨试液调pH至9~10,用乙醚萃取3次,每次10mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加甲醇1mL使之溶解,作为供试品溶液。另取延胡索对照药材0.5g同法制成对照药材溶液。取缺延胡索的阴性样品约15g,同法制备得阴性对照溶液。分别吸取上述3种溶液8 μ L,分别点于同一硅胶G板,以甲苯-丙酮



1. 阴性对照溶液; 2. 延胡索对照药材溶液; 3. 供试品溶液; 4. 供试品溶液

图2 三伏贴凝胶膏剂之延胡索的薄层鉴别图

(9:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置碘缸中的3min后取出,待板上吸附的碘挥尽后,置紫外灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点且阴性无干扰。结果见图2。

2.2 HPLC含量测定

2.2.1 色谱条件

Agilent 5TC -C18 色谱柱(460mm*250mm, 5 μ m),流动相:乙腈-0.08%磷酸二氢钾(10:90),流速:1.0mL/min,检测波长:326nm。

2.2.2 对照品溶液制备

精密称取芥子碱硫酸盐对照品适量,加流动相制成0.0109mg/mL的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取三伏贴凝胶膏剂内容物约4g,精密称定,加甲醇50mL,振摇后置水浴锅上加热使之分散,超声提取30min,静置后取上清液,用甲醇定容至50mL,摇匀,经0.22 μ m滤膜过滤后,续滤液即为供试品溶液。

2.2.4 阴性溶液的制备

取除去白芥子的其他药材制备的凝胶膏剂,按“2.2.3”项下的方法操作制备得阴性对照溶液。

2.2.5 标准曲线制备

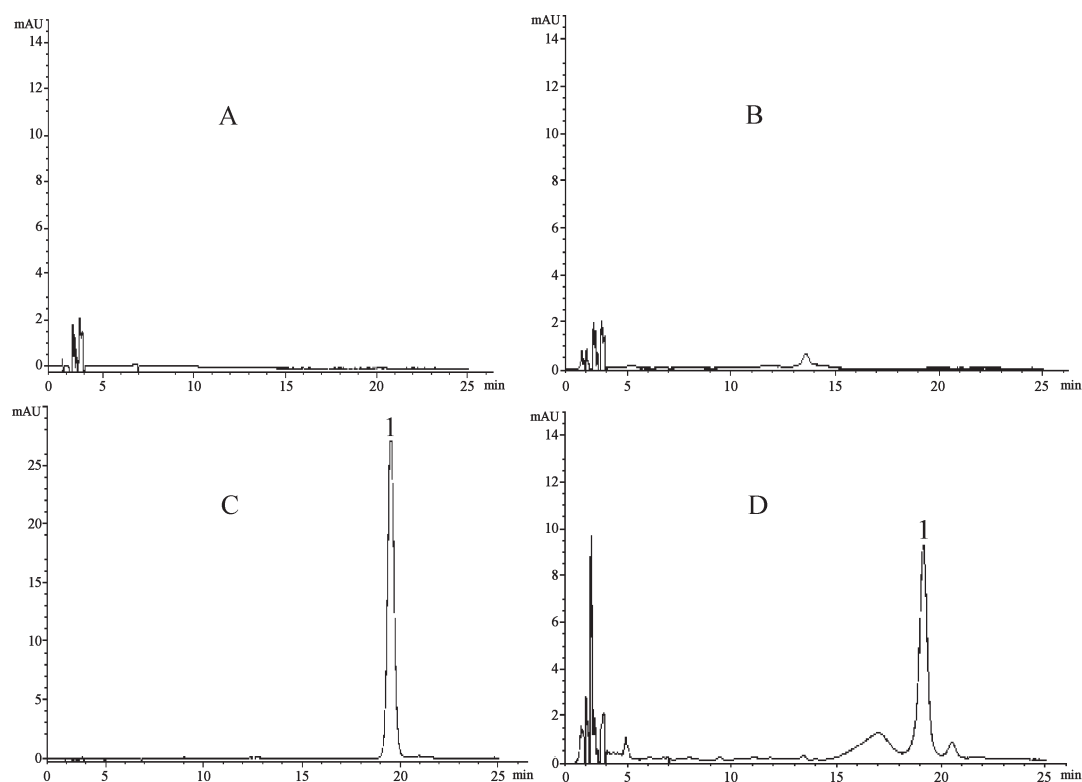
分别精密吸取上述浓度为0.0109mg/mL的对照品溶液0.5,1.0,2.0,3.0,4.0mL,置5mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取10 μ L注入液相色谱仪测定相应峰面积(A)。以上述5个对照品溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程: $Y=15112X+4.8998$, ($r=1.0000$),结果表明芥子碱硫酸盐在0.0109~0.0872mg/mL内线性关系良好。

2.2.6 专属性考察

分别取对照品溶液,供试品溶液及阴性对照溶液,按“2.2.1”项下的色谱条件分析。结果表明:芥子碱硫酸盐色谱峰与其它组分峰可达基线分离,供试品与芥子碱硫酸盐对照品在相同的保留时间有相同色谱峰,且分离度良好(大于1.5),其理论塔板数按芥子碱硫酸盐计不低于3000。而阴性对照溶液与在相同的保留时间处未出现色谱峰,故阴性无干扰,专属性良好。结果见图3。

2.2.7 精密度测定

取浓度为0.0436mg/mL的对照品溶液,在上述



A.空白溶液; B.阴性对照品溶液; C.芥子碱硫氰酸盐对照品溶液; D.供试品溶液; 1.芥子碱硫氰酸盐色谱峰

图3 三伏贴凝胶膏剂的高效液相色谱图

的色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 $RSD=0.577\%$, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性测定

取同一供试品溶液(批号 20150304), 于室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48h 内测定样品中的芥子碱硫氰酸盐的峰面积, 计算 $RSD=1.95\%$, 表明供试品溶液在 24h 内稳定。另外同时考察了浓度为 0.119mg/mL 对照溶液在 0, 12, 24, 48, 72h 内测定其峰面积, 结果显示对照品溶液在 72h 稳定, $RSD=0.97\%$ 。

2.2.9 重复性试验

精密称取“三伏贴”凝胶膏剂(批号 20150304), 按照供试品溶液制备法平行制备 6 份供试品溶液, 测定其峰面积并计算 $RSD=2.22\%$, 说明重复性良好。

2.2.10 加样回收率

取本品约 4g (已知芥子碱硫氰酸盐含量为 0.7226mg/4g), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 平行 9 份, 分别精密加入样品已知含量的 0.8 倍、1.0 倍、1.2 倍各 3 份, 按照上述供试品溶液方法制备样品。按 2.2.1 项下色谱条件进样 $10\mu\text{L}$, 计算其加样回收

率, 结果见表 1。

表1 芥子碱硫氰酸盐加样回收率试验

称样量 /g	芥子碱硫氰 酸盐量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加样回 收率/%	均值 /%	RSD /%
4.0225	0.7255	0.5450	1.2495	96.15	98.33	2.01
4.0001	0.7215	0.5450	1.2489	96.77		
3.9849	0.7187	0.5341	1.2409	97.77		
4.0103	0.7233	0.7085	1.4168	97.88		
4.0269	0.7263	0.7194	1.4170	96.01		
3.9998	0.7214	0.6867	1.4088	100.10		
4.0872	0.7372	0.8829	1.6361	101.81		
4.022	0.7254	0.8393	1.5512	98.39		
3.9985	0.7212	0.8644	1.5860	100.05		

2.2.11 样品测定

分别精密吸取对照品溶液(0.0436mg/mL)与供试品溶液各 $10\mu\text{L}$, 按照外标一点法计算 3 批样品芥子碱硫氰酸盐的含量为 $0.1821, 0.1854, 0.1736\text{mg/g}$ 。

3 讨论

3.1 TLC 方法建立

在对组方中麻黄及延胡索进行薄层鉴别的过

程中,除了对专属性及重现性进行考察外,还通过对比不同厂家薄层板(青岛海洋化工有限公司;烟台市化学工业研究所)、不同温度(6℃、30℃)及湿度(38%、80%)下的展开效果进行耐用性的考察,结果显示所建立的相应薄层鉴别方法专属性、重现性等良好,且阴性均无干扰,适宜于该方麻黄与延胡索的薄层定性鉴别。

3.2 HPLC 方法建立

在样品前处理时,还对样品提取方式进行筛选,参考文献[11,14-15],以芥子碱硫氰酸盐含量为指标,对超声提取与加热回流两种方式进行考察,结果显示后者稍高于前者,但无明显差异。考虑到超声提取方式具有快速、简便的优点,且适用于药检部门和企业生产的质量管理,最终选择超声处理。另外,参考文献[11,14-15]对方中具有刺鼻辛辣味及刺激作用,能使皮肤发红甚至发泡的芥子碱硫氰酸盐进行 HPLC 测定及一系列方法学考察后,发现其线性关系良好,重现性好,回收率好,专属性强,且在 24h 内较为稳定,可作为我院“冬病夏治”的三伏贴凝胶膏剂质量控制检测方法之一。为了更有效并全面的控制其质量,后期我们还将对其制剂的稳定性进行跟踪考察,同时对其进行皮肤安全性等探索,以期寻求反应可控、方便经济且疗效更佳的三伏贴新剂型,为临床安全用药提供有力的科学依据。

参考文献:

- [1] 李丽萍,包烨华,楚佳梅,等. 冬病夏治穴位贴敷防治支气管哮喘 130 例临床观察[J]. 中医杂志,2012,53(4):307-310.
- [2] 巴艳东,魏瑞仙,吕虎军,等. 三伏贴引起皮肤严重水泡反

应的多种因素分析[J]. 针灸临床杂志,2015,31(10):55-58.

- [3] 崔淑华,邢燕军,李娜,等. 白芥子穴位贴敷治疗哮喘的研究概况 [J]. 现代中西医结合杂志,2014,23 (28):3181-3184.
- [4] 邓红,区洁雯,张蜀,等. 复方白芥子巴布剂的质量标准研究[J]. 中成药,2010,32(5):886-888.
- [5] 胡月华,何阳子. 张氏涂法在虚寒性疾病中的应用[J]. 时珍国医国药,2007,18(3):714-715.
- [6] 徐丹,高振,李凤森,等. 穴位敷贴治疗哮喘进展[J]. 实用中医药杂志,2010,26(7):514-517.
- [7] 郭金梅. 中药三伏贴引起皮肤过敏的原因分析与护理干预[J]. 中医临床研究,2012,4(6):105.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:320.
- [9] 李馨,刘爽,王金宏,等. 哮喘片中麻黄的薄层色谱研究 [J]. 黑龙江医药,2009,22(5):628-629.
- [10] 霍务贞,吴燕红,袁旭江,等. 喘平复方制剂麻黄药材质量筛选分析[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1402-1403.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:139,160.
- [12] 孙爱萍,谢晓梅,周瑾. 延胡索的薄层色谱鉴别研究[J]. 安徽医药,2008,12(3):224-226.
- [13] 魏友霞,石会丽,姚鸿瓶,等. 前列癔痛液的质量控制[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(24):2118-2120.
- [14] 赵杰余,刘金来,李笑慧,等. HPLC 法测定“冬病夏治”贴膏中芥子碱硫氰酸盐含量 [J]. 海峡药学,2013,25(8):78-80.
- [15] 尹琨,王宏,曾祖平,等. HPLC 法测定喘宁巴布剂中芥子碱硫氰酸盐的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):21-22.

(编辑:徐建平)

The Study on Quality Standard of Dog-days Paste Cataplast

LIU Jun, WANG Yinjie, LI Wenjing, ZHAO Jintao, LIU Qian
(Yinchuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750001, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish the quality standard of dog-days paste cataplast. **Methods** Qualitative identification of Ephedra, Corydalis Rhizoma in the formula was carried out by thin-layer chromatography (TLC). High performance liquid phase chromatography (HPLC) was used for the content of sinapine thiocyanate in the preparation. **Results** TLC spots were clear and well-separated without negative interference, the line range of sinapine thiocyanate was 0.0109~0.0872mg/mL, respectively, with good linear relationship with the peak area integral value($r=1.0000$), the average recovery rate was 98.33%, RSD was 2.01%. **Conclusion** The qualitative and quantitative method with good resolution and was simple, convenient, and reliable with good precision, It can be used for the quality control of dog-days paste cataplast.

KEY WORDS: dog-days paste; cataplast; quality standard; sinapine thiocyanate