

小儿退热合剂定性定量研究

王 迅 邹恺平 周琴妹 张 源

(南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

摘 要 目的:建立小儿退热合剂的定性定量方法。方法:采用薄层色谱法(TLC)对小儿退热合剂中的黄柏和钩藤进行定性鉴别,以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品为对照,测定制剂中5种成分的含量。结果:薄层色谱法鉴定专属性强,阴性无干扰。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的线性范围分别为1.10~35.29mg/mL ($r=0.9999$)、2.28~72.88mg/mL ($r=0.9999$)、1.01~32.42mg/mL ($r=0.9999$)、1.51~48.47mg/mL ($r=0.9999$)、0.34~10.93mg/mL ($r=0.9999$),平均回收率分别为98.31% ($RSD=1.27\%$)、103.01% ($RSD=1.28\%$)、102.46% ($RSD=1.39\%$)、96.80% ($RSD=0.56\%$)、97.56% ($RSD=1.65\%$)。结论:方法可靠,重复性好,可用于小儿退热合剂的质量控制。

关键词 小儿退热合剂 大黄 薄层鉴别 含量测定

中图分类号 R289.54 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)10-0068-04

小儿退热合剂为江苏省中医院儿科用药,由荆芥、防风、黄柏、钩藤、大黄等中药组成,功效辛凉解表、祛风退热,用于上呼吸道感染、流行性感冒之发热症^[1-2],作为江苏省中医院特色医疗机构制剂,临床疗效十分显著。为进一步提高制剂的质量标准和稳定性,本实验在小儿退热合剂原质量标准的基础上,对方中黄柏和钩藤进行了薄层定性鉴别研究,并对大黄中5种蒽醌类成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进行了含量测定研究,现将结果报道如下。

1 材料

1.1 药材与试剂 黄柏对照药材(批号:121510-201105),盐酸黄柏碱对照品(批号:111895-201202),异构藤碱对照品(批号:111927-201102),芦荟大黄素对照品(批号:110795-201007),大黄酸对照品(批号:110757-200206),大黄素对照品(批号:110756-200110),大黄酚对照品(批号:110796-201118),大黄素甲醚对照品(批号:110758-201013),均购自中国食品药品检定研究院。荆芥(批号:140202),防风(批号:131016),黄柏(批号:131122),石膏(批号:131210),钩藤(批号:140225),薄荷(批号:140312),大黄(批号:131116),以上饮片均购自南京松龄中药饮片有限公司。小儿退热合剂(批号:1601001、1601002、1601003),由江苏省中医院制剂部生产。

1.2 主要仪器 高效液相色谱仪(1260S型,美国Agilent公司);凝胶成像分析仪(型号WD-9413A,

北京市六一仪器厂);电热恒温鼓风干燥箱(型号DHG-9123A,上海精宏实验设备仪器厂);医用超声波清洗仪(型号KQ-1000E,昆山市超声仪器有限公司);万分之一电子天平(AX224ZH/E,美国OHAUS Corp);十万分之一电子天平(AR2140型,美国OHAUS Corp);HH-2型数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 黄柏的薄层鉴别 供试品溶液制备:取小儿退热合剂10mL,蒸干,加1%醋酸甲醇溶液50mL,于60℃超声处理20min,滤过,滤液浓缩至2mL作为供试品溶液。阴性供试品溶液制备:制备不含黄柏的小儿退热合剂,同供试品溶液制备方法制备阴性供试品溶液。对照品溶液制备:取盐酸黄柏碱对照品,加甲醇制成每1mL含0.5mg的溶液作为对照品溶液。对照药材溶液制备:取黄柏对照药材0.1g,加1%醋酸甲醇20mL于60℃超声处理20min,滤过,滤液浓缩至2mL作为对照药材溶液。按照薄层色谱法试验,吸取上述4种试液各3~5μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(30:15:4)的下层溶液为展开剂,置于氨蒸汽饱和展开缸展开,取出,晾干,喷稀碘化铋钾试液。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,结果见图1。

2.1.2 黄柏鉴别方法的耐用性考察 取上述供试品溶液、对照品溶液各5μL,分别同时点于两硅胶板

上,按建立的薄层鉴别条件,分别在温度10℃、湿度32%和温度35℃、湿度72%条件下展开,取出,晾干,显色。结果显示,分离度较好,重现性好,见图1。

2.1.3 钩藤的薄层鉴别 供试品溶液制备:取小儿退热合剂30mL,加浓氨试液15mL和三氯甲烷50mL,加热回流2h,放冷静置,取三氯甲烷层,水浴蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,即得。阴性供试品溶液制备:制备不含钩藤的小儿退热合剂,同供试品溶液制备方法制得阴性供试品溶液。对照品溶液制备:取异钩藤碱对照品,加甲醇制成每1mL含0.5mg的溶液作为对照品溶液。按照薄层色谱法试验,吸取供试品及阴性供试品溶液各10~30μL,对照品溶液5μL分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-丙酮(6:4)为展开剂,展开,取出,晾干,喷稀碘化铍钾试液。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,结果见图2。

2.1.4 钩藤鉴别方法的耐用性考察 取上述供试品溶液15μL、对照品溶液5μL,分别同时点于两硅胶板上,按建立的薄层鉴别条件,分别在温度10℃、湿度32%和温度35℃、湿度72%条件下展开,取出,晾干,显色。结果显示,分离度较好,重现性好,见图2。

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1mL含芦荟大黄素352.9μg、大黄酸728.8μg、大黄素324.2μg、大黄酚484.7μg、大黄素甲醚109.3μg的溶液,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液与阴性供试品溶液制备 取本品1mL置具塞锥形瓶中,加8%盐酸溶液10mL,超声(功率280W,频率50kHz)10min,加入三氯甲烷10mL,加热回流1h,放冷,转移至分液漏斗,再加三氯甲烷10mL,振摇提取3次,合并三氯甲烷液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,转移至10mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。同法制备阴性样品。

2.2.3 色谱条件及专属性考察 色谱柱:Hypersil C₁₈(4.6mm×250mm,5μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(83:17);流速:1.0mL/min;柱温:30℃;进样量:10μL;检测波长:254nm。结果见图3,被测成分色谱峰分离度良好,阴性无干扰。

2.2.4 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,制成含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的浓度分别为35.29、72.88、32.42、48.47、10.93μg/mL的混合对照品溶液,依次稀释2、4、8、16、32倍。精密吸取上述溶液10μL,按照“2.2.3”项下的色谱条件进行测定,记录峰面积。以峰面积值为纵坐标,对照品浓度为横坐标,得5种对照品的线性回归方程,结果见表1。

2.2.5 精密度考察 精密吸取“2.2.4”项下混合对照品溶液,连续进样6次,计算5种成分对照品的RSD分别为0.13%、0.20%、0.48%、0.24%、0.79%,RSD均小于5%,结果表明仪器精密度良好。

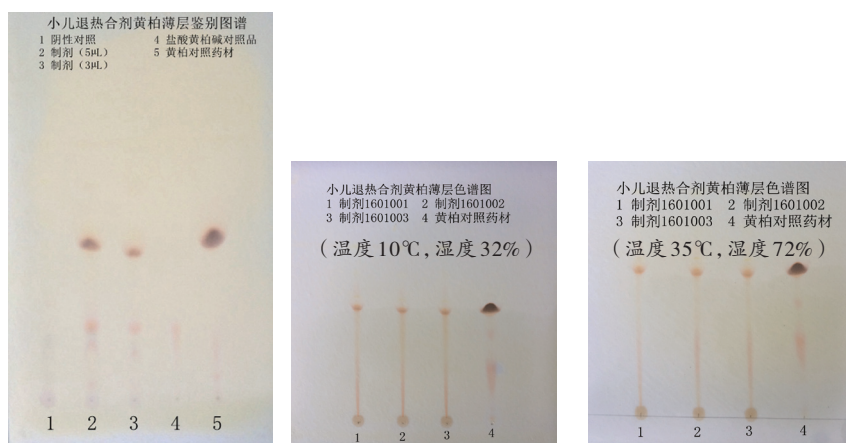


图1 小儿退热合剂黄柏鉴别及温湿度耐用性薄层图谱

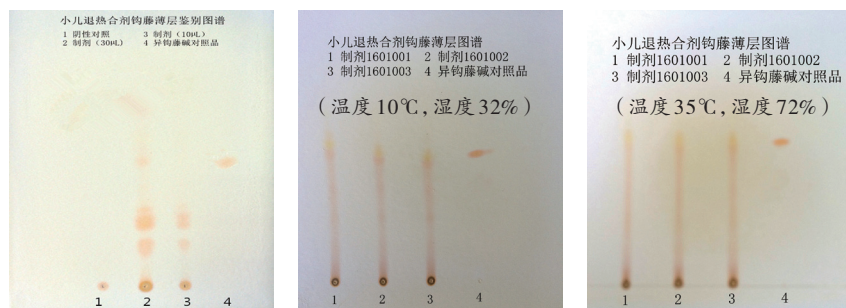


图2 小儿退热合剂钩藤的鉴别及温湿度耐用性薄层图谱

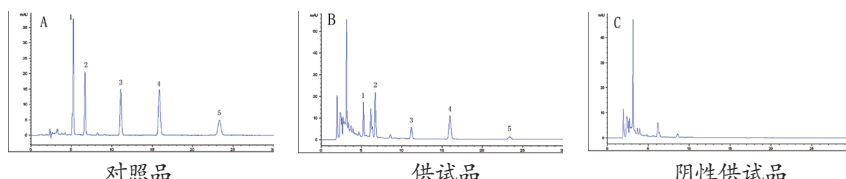


图3 HPLC色谱图

(1.芦荟大黄素;2.大黄酸;3.大黄素;4.大黄酚;5.大黄素甲醚)

2.2.6 稳定性考察 取同一份供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24h进样,测定峰面积值。结果显示5种成分的RSD分别为1.16%、1.00%、1.86%、1.42%、1.96%,均小于5%,结果表明供试品溶液在24h内稳定良好。

2.2.7 重复性考察 精密吸取同一批号(1601001)样品1mL,共6份,按照“2.2.2”项下供试品溶液制备方法进行制备,进样,测定峰面积值。结果显示5种成分的RSD分别为0.91%、0.73%、0.77%、0.38%、1.09%,表明重复性良好。

2.2.8 加样回收试验 精密吸取已知含量的样品(批号1601001)1mL,共6份,精密加入一定量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品,按照“2.2.2”项下供试品溶液制备方法进行制备,进样,测定峰面积值,计算,结果见表2。

2.2.9 3批样品含量测定 取3批样品,按照“2.2.2”项下供试品溶液制备方法进行制备,测定,计算,结果见表3。

3 讨论

3.1 定性鉴别 小儿退热合剂的原标准中仅有理化鉴别项,本研究参考药典及文献的方法,对小儿退热合剂中的黄柏和钩藤进行了薄层定性鉴别研究^[3-4]。实验所得到的薄层色谱图斑点清晰,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性未见干扰。在此基

础上,本研究还对两种方法进行了不同温湿度的耐用性考察,结果显示方法的重现性好。因此,可以考虑将上述薄层定性鉴别方法列入质量标准。

本实验在薄层鉴别的过程中考察了不同点样量及不同对照品(化学对照品和对照药材)在薄层色谱图上的效果,最终选择了相对合适的点样量和对照品进行实验。

3.2 含量测定 本研究的含量测定选用小儿退热合剂中大黄的5种蒽醌类成分作为指标成分,实验中考察

表1 大黄中5种成分的线性关系表

成分	线性方程	相关系数(r)	线性范围(μg/mL)
芦荟大黄素	y=42.549x+7.3846	r=0.9999	1.10~35.29
大黄酸	y=39.355x+17.408	r=0.9999	2.28~72.88
大黄素	y=31.828x+5.6526	r=0.9999	1.01~32.42
大黄酚	y=51.842x+13.326	r=0.9999	1.51~48.47
大黄素甲醚	y=40.561x+4.4057	r=0.9999	0.34~10.93

表2 5种成分加样回收率

成分	供试品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
芦荟大黄素	23.44	22.05	45.01	97.95	98.31	1.27
	23.44	22.05	45.08	98.26		
	23.44	22.05	45.41	99.66		
	23.44	22.05	45.46	99.86		
	23.44	22.05	44.71	96.65		
	23.44	22.05	44.89	97.45		
大黄酸	41.03	45.55	88.37	104.37	103.01	1.28
	41.03	45.55	88.09	103.69		
	41.03	45.55	87.76	102.88		
	41.03	45.55	87.41	102.02		
	41.03	45.55	86.98	100.96		
	41.03	45.55	88.27	104.12		
大黄素	19.40	20.25	40.26	103.16	102.46	1.39
	19.40	20.25	39.76	100.57		
	19.40	20.25	39.98	101.70		
	19.40	20.25	40.51	104.45		
	19.40	20.25	39.95	101.54		
	19.40	20.25	40.29	103.32		
大黄酚	32.98	30.30	62.11	96.44	96.80	0.56
	32.98	30.30	62.38	97.26		
	32.98	30.30	62.03	96.21		
	32.98	30.30	62.45	97.50		
	32.98	30.30	62.32	97.09		
	32.98	30.30	62.07	96.33		
大黄素甲醚	7.47	6.85	14.15	97.73	97.56	1.65
	7.47	6.85	14.25	99.05		
	7.47	6.85	14.10	97.07		
	7.47	6.85	14.30	99.71		
	7.47	6.85	14.05	96.41		
	7.47	6.85	13.98	95.42		

表3 3批样品中5种成分的含量测定 μg/mL

批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
1601001	23.44	41.03	19.40	32.98	7.47
1601002	21.20	34.38	17.17	29.62	6.38
1601003	18.83	31.33	15.79	24.51	5.45

了不同有机相(甲醇和乙腈)以及不同比例的流动相的分离效果^[5-7],最终选择了甲醇-0.1%磷酸溶液(83:17)的流动相比比例,该条件下各峰分离度良好,且在较短时间内(30min)全部出峰,可以较好地进行测定。

“平喘汤”对哮喘大鼠肺组织 EOS 凋亡及 Bax 蛋白表达的影响研究

冯高华^{1,2} 刘美秀¹ 惠晓丹² 刘臻² 朱晓舟² 朱虹²

(1.张家港市中医医院,江苏张家港 215600; 2.扬州大学医学院,江苏扬州 225000)

摘要 目的:观察平喘汤对哮喘大鼠肺组织嗜酸性粒细胞(EOS)凋亡及Bax蛋白表达的影响,探讨平喘汤治疗哮喘的相关机制。方法:SD大鼠随机分为模型组、地塞米松组、正常组和平喘汤低、中、高剂量组。除正常组,其余各组大鼠以卵清蛋白(OVA)致敏、激发制备哮喘大鼠模型。于第1次哮喘激发(造模第21天)开始各组连续灌胃给予相应药物或生理盐水14d。观察各组大鼠一般状况、肺组织病理形态,DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL)测定肺组织EOS原位表达;免疫组化法(Western blot)检测Bax蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠肺组织有明显的病理变化,肺组织EOS呈强阳性表达($P<0.01$),Bax蛋白表达量明显减少($P<0.01$)。经药物干预后,各治疗组哮喘症状有所减轻,肺组织病理变化呈不同程度的改善。各治疗组大鼠肺组织EOS表达明显低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),Bax蛋白表达明显高于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),其中平喘汤高剂量与地塞米松改善效果更为明显,且其改善效果相当。结论:平喘汤能够通过促进Bax蛋白表达,诱导EOS凋亡以减少肺组织炎性细胞浸润,进而缓解哮喘气道炎症。

关键词 平喘汤 哮喘 EOS凋亡 Bax蛋白 肺 大鼠 实验研究

中图分类号 R562.250.5

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2018)10-0071-04

基金项目 江苏省中医药局科技项目(YB2015106)

支气管哮喘(哮喘)是由多种炎性细胞和炎性介质参与的气道慢性炎症性疾病。调查显示,目前全球哮喘人数已超过5%,且患病率与病死率均有持续上升的趋势,严重影响患者的身心健康^[1]。吸入性皮质类固醇激素和 β -2激动剂常作为哮喘患者的

一线治疗药物^[2],但存在价格较高、治疗周期长、副作用明显或停药后症状加重等问题^[3]。平喘汤为临床经验方,是以三子养亲汤为基础,配合宣肺、平喘等药物加减而成。既往的临床研究表明,本方可以改善支气管哮喘患者急性发作期的肺功能^[4]。本实

综上所述,本实验在小儿退热合剂原质量标准基础上建立了黄柏和钩藤的薄层色谱鉴别方法及大黄中5种蒽醌类成分的HPLC含量测定方法。建立的方法经3批样品验证考察,专属性强,阴性无干扰,灵敏度高,重现性好。今后的研究将进一步建立黄柏、钩藤等饮片成分同时测定的方法,可以更科学、更合理、更全面地进行质量评价。

参考文献

- [1] 崔华,杨祥正.中药退热合剂灌肠治疗小儿急性上呼吸道感染发热82例[J].中国中医药信息杂志,2007,14(3):60.
- [2] 胡晓丹,解玲芳.小儿退热滴肠液治疗小儿外感高热42例[J].山东中医杂志,2011,30(7):478.
- [3] 张丁丁,隋军,郭春梅.医院制剂降糖丸的鉴别研究[J].黑龙江医药,2011,24(3):362.
- [4] 张庆莲,黄娟,皮凤娟,等.硝矾洗剂薄层色谱鉴别及微生物

限度检查法的建立[J].西北药学杂志,2017,32(6):722.

- [5] 凌勇,汪艳艳,陈广通,等.高效液相色谱法测定连花清瘟胶囊中大黄5种成分的含量[J].中医学报,2012,27(9):1157.
- [6] 许乾丽,茅向军,宋晓宁,等.HPLC法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J].药物分析杂志,2010,30(10):1841.
- [7] 张子龙,魏刚,刘东辉,等.大黄及其醇提液HPLC特征图谱相关性研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):69.

第一作者:王迅(1980—),男,本科学历,副主任中医师,从事中药制剂质量标准研究。

通讯作者:张源,本科学历,主任中医师。
2217764733@qq.com

收稿日期:2018-05-04

编辑:吴宁