

复黄片全方中药鉴别方法的研究

马欣¹, 德白啦¹, 潘一滨², 曹永清², 陆金根², 邱明丰^{1*}

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240

2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032

摘要: **目的** 建立复黄片全方 4 味中药的鉴别方法。**方法** 采用高效液相色谱 (HPLC) 法定性鉴定复黄片全方君药蒲黄炭中香蒲新苷和异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷和臣药槐角中槐角苷, 色谱条件为 Agilent TC-C₁₈ (2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相为乙腈-磷酸缓冲盐, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm; 酸水解-HPLC 法定性鉴别臣药地榆炭; 采用薄层色谱 (TLC) 法鉴别佐使药大黄。**结果** HPLC 法同步定性鉴别了君药蒲黄炭中的香蒲新苷、异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷和臣药槐角中的槐角苷, 酸水解-HPLC 法鉴别了臣药地榆炭, TLC 鉴别了佐使药大黄。**结论** 3 种鉴别方法简便易行、专属性强, 可鉴别全方 4 味中药。

关键词: 复黄片; 香蒲新苷; 异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷; 槐角苷; 酸水解-HPLC 法; 薄层色谱法

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)12-2878-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.021

Identification of all herb medicines in Fuhuang Tablet

MA Xin¹, DE Bai-la¹, PAN Yi-bin², CAO Yong-qing², LU Jin-gen², QIU Ming-feng¹

1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Abstract: Objective To establish the identification method of *Typha angustifolia* (stir-bake to black), *Sophora japonica*, *Sanguisorba officinalis* (stir-bake to black), and *Rheum palmatum* in Fuhuang tablets. **Methods** HPLC method were studied to identify typhaneoside and isorhamnetin-3-*O*-neoheptanoside in *T. angustifolia*, and sophoricoside in *S. japonica*. HPLC conditions were as follows: Agilent TC-C₁₈ (2) column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution at a temperature of 30 ℃; Phosphate buffer and acetonitrile were used as the mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min; The detection wavelength was 254 nm. The acid hydrolysis-HPLC method was explored to identify *S. officinalis* (stir-bake to black). TLC identification method was performed to identify *R. palmatum*. **Results** HPLC method can identify typhaneoside, isorhamnetin-3-*O*-neoheptanoside, and sophoricoside synchronously. Acid hydrolysis method can identify *S. officinalis* (stir-bake to black) by HPLC and TLC can identify *R. palmatum*. **Conclusion** The three methods are simple and accurate with high sensitivity and good specificity, which can be used to identify all herbal medicines in Fuhuang tablets.

Key words: Fuhuang Tablet; typhaneoside, isorhamnetin-3-*O*-neoheptanoside; sophoricoside; acid hydrolysis and HPLC method; TLC

复黄片是上海中医药大学附属龙华医院医院制剂基础上开发的 6 类新药, 由蒲黄炭、槐角、地榆炭及大黄组成, 可凉血止血、清热通便, 主治血热妄行之便血^[1-2]。因方中成分多、干扰大, 采用《中国药典》2015 年版鉴别方法均有干扰^[3]。因此, 本实验采用高效液相色谱法 (HPLC) 同步鉴别君药蒲黄炭和臣药槐角的方法, 探索了酸水解-HPLC 法鉴别地榆炭, 优化了薄层色谱法 (TLC) 鉴别大黄的方法^[4-10]。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 Series HPLC 仪 (Agilent 公司, 美国); DJ-02 型粉碎机 (上海淀久中药机械制造有限公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

蒲黄炭饮片 (上海信德中药公司饮片厂, 批号

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 上海市科学技术委员会生物医药领域支撑项目 (14401900100)

作者简介: 马欣 (1993—), 女, 硕士研究生。Tel: 18817776550。

*通信作者 邱明丰, 男, 副教授, 研究方向为中药新制剂与新剂型。Tel: (021)34205052 E-mail: mfqiu@sjtu.edu.cn

14071404)、槐角饮片(上海华浦中药饮片厂有限公司,批号 2016041802)、地榆炭饮片(上海雷允上中药饮片厂,批号 LY1604140)、大黄饮片(上海雷允上中药饮片厂,批号 1706058);以上饮片经上海交通大学药学院王梦月副教授分别鉴定为蒲黄炭 *Typhae Pollen* (stir-bake to black)、槐角 *Sophora japonica* L.、地榆炭 *Sanguisorba Radix* (stir-bake to black)、大黄 *Rheum palmatum* L.;对照药材地榆(批号 121286-200402)、大黄(批号 120984-201202)均购自中国食品药品检定研究院,经上海交通大学药学院王梦月副教授分别鉴定为地榆 *Sanguisorba officinalis* L.、大黄 *Rheum palmatum* L.;对照品槐角苷(批号 11695-201703)、香蒲新苷(批号 111573-201405)、异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷(批号 111571-201205)均购自中国食品药品检定研究院,质量分数大于 98%。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 复黄片及阴性颗粒的制备

2.1.1 复黄片的制备 取蒲黄炭 55.5 g、槐角 55.5 g、地榆炭 166.5 g、大黄 18.5 g,以上 4 味药材煎煮 2 次,第 1 次加 12 倍量水,浸泡 0.5 h,煮沸后再煎煮 1 h,滤过;第 2 次加 10 倍量水,煮沸后再煎煮 1 h,滤过;滤液在 70 ℃ 以下浓缩至相对密度为 1.06~1.08(50~60 ℃)的清膏,冷至室温,加 95%乙醇至含醇量为 70%,静置 24 h,取上清液在 70 ℃ 以下减压回收乙醇至稠膏的相对密度为 1.28~1.32(50~60 ℃),加入稠膏质量 0.1 倍量的淀粉,混匀,80 ℃ 以下减压干燥,粉碎,过 80 目筛,加适量淀粉,混匀,用 80%药用乙醇制粒,过 16 目筛,80 ℃ 以下干燥,整粒,加入干燥颗粒质量 1%的硬脂酸镁,混匀,压片,用胃溶型薄膜包衣预混剂包薄膜衣,即得复黄片(批号 1711001、1711002、1711003)。

2.1.2 阴性颗粒的制备 取材料中相应药材或饮片,按“2.1.1”项下同法操作,制备复黄片阴性(缺槐角)颗粒(批号 20171225)、复黄片阴性(缺蒲黄炭)颗粒(批号 20171225)、复黄片阴性(缺地榆炭)颗粒(批号 20171225)、复黄片阴性(缺大黄)颗粒(批号 20171225)。

2.2 HPLC 法同步定性鉴别蒲黄炭和槐角

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取香蒲新苷及异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷对照品各约 10 mg,精密称定,制备得混合对照品储备液 100 mL;再加甲醇稀释 10 倍,即得混合对照品溶液。取槐角苷对照品约 10 mg,精密称定,加甲醇配制成储备液 100 mL;

再加甲醇稀释 10 倍,即得槐角苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取复黄片 20 片,研成细粉,取约 0.2 g,精密称定,精密加入 25 mL 甲醇超声 30 min (100 Hz),摇匀,滤过,即得。

2.2.3 复黄片加标供试品溶液制备 取复黄片细粉约 0.2 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,精密加入对照品溶液 5.0 mL,加甲醇溶液定容至刻度,超声 30 min (100 Hz),摇匀,滤过,即得。

2.2.4 复黄片阴性对照溶液制备 取复黄片阴性(缺蒲黄炭)颗粒 0.2 g,精密称定,按照“2.2.2”项方法制备得复黄片阴性(缺蒲黄炭)溶液。取复黄片阴性(缺槐角)颗粒 0.2 g,精密称定,按“2.2.2”项方法制备即得复黄片阴性(缺槐角)溶液。

2.2.5 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-磷酸缓冲盐(15 mmol/L, pH 2.5, B),进行梯度洗脱程序,见表 1,体积流量为 1 mL/min,进样量 10 μL,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃。

表 1 梯度洗脱方法

Table 1 Gradient method of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~5	10~15	90~85
5~24	15~17	85~83
24~35	17~21	83~79
35~40	21~25	79~75
40~45	25~40	75~60
45~60	40	60

2.2.6 专属性考察 分别取混合对照品溶液、槐角苷对照品溶液、复黄片供试品溶液、复黄片加标供试品溶液、复黄片阴性(缺蒲黄炭)对照溶液以及复黄片阴性(缺槐角)对照溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,按“2.2.5”项下方法测定。结果表明,各供试品色谱在 3 个对照品对应位置均有色谱峰,达到基线分离,阴性无干扰,说明该方法专属性良好(图 1)。

2.2.7 样品鉴别 取 3 批复黄片细粉各约 0.2 g,按“2.2.2”项下方法制备,分别取混合对照品溶液、槐角苷对照品溶液及 3 批复黄片供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,按“2.2.5”项下方法测定。结果表明,供试品色谱在 3 个对照品对应位置有对应色谱峰,说明该方法准确可靠,重现性好(图 2)。

2.3 酸水解-HPLC 法鉴别地榆炭的研究

2.3.1 地榆对照药材溶液制备 取地榆对照药材约 0.1 g,精密称定,加 50%甲醇约 40 mL,超声处理 30 min (100 Hz),定容至 50 mL。

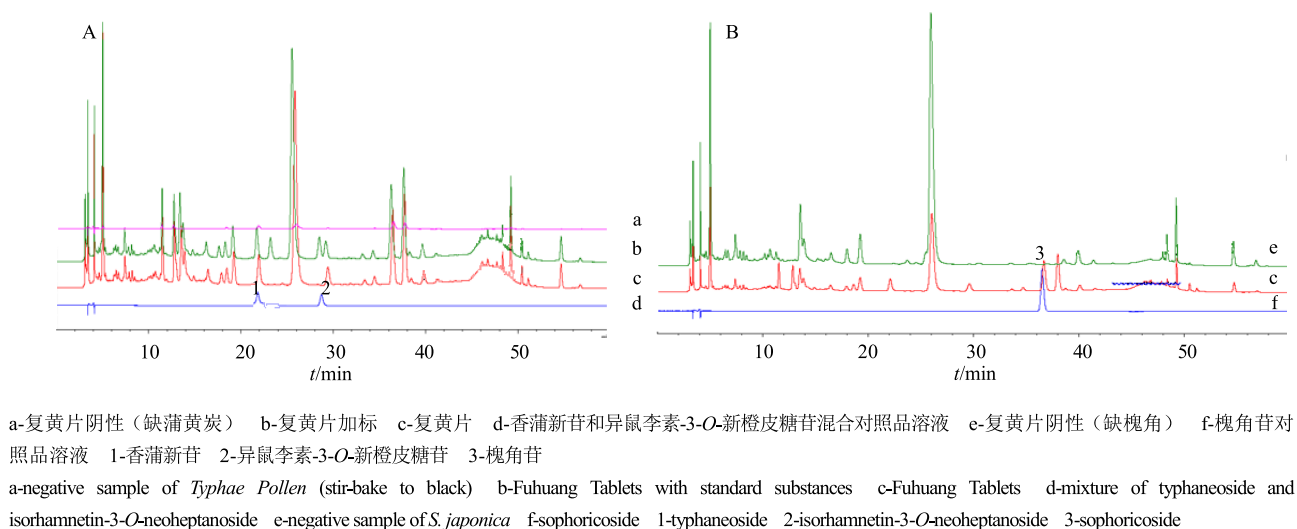


图 1 复黄片中鉴别蒲黄炭 (A) 和槐角 (B) 的 HPLC 图

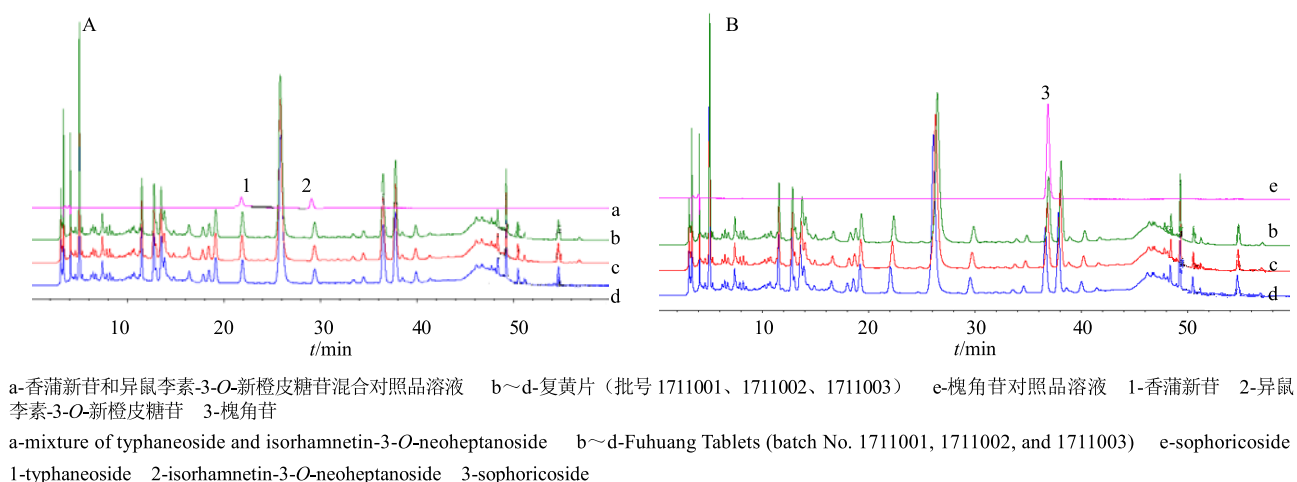
Fig. 1 HPLC identification chromatogram of *Typhae Pollen* (stir-bake to black) (A) and *Sophora japonica* (B) in Fuhuang Tablets

图 2 3 批复黄片 HPLC 鉴别图谱

Fig. 2 HPLC identification chromatogram of three batches of Fuhuang tablets

2.3.2 地榆炭对照药材溶液的制备 取地榆炭饮片粉(80目)约0.1g,精密称定,同“2.3.1”项方法制备。

2.3.3 复黄片供试品溶液的制备 取复黄片20片,研成细粉,取约0.1g,精密称定,同“2.2.2”项方法制备。

2.3.4 复黄片阴性(缺地榆炭)对照溶液制备 取复黄片阴性(缺地榆炭)对照颗粒0.1g,精密称定,同“2.2.2”项方法制备。

2.3.5 酸水解地榆对照药材溶液制备 取地榆对照药材约0.2g,精密称定,置100mL锥形瓶中,加水20mL、浓盐酸1mL,摇匀,水浴回流2h。冷至室温,10%NaOH溶液调pH至中性,加甲醇30mL,

摇匀,滤过,取续滤液,50%甲醇溶液稀释2倍。

2.3.6 酸水解地榆炭药材溶液制备 取地榆炭饮片粉(80目),取约0.2g,精密称定,同“2.3.5”项下方法制备。

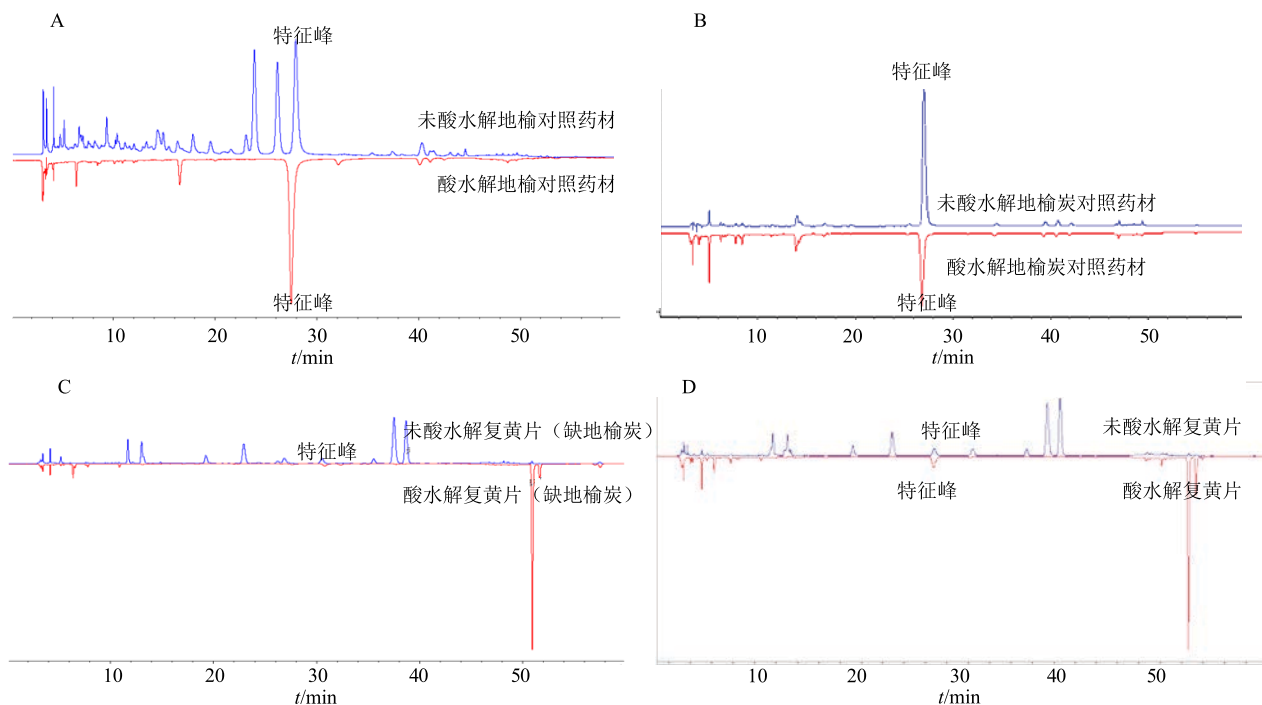
2.3.7 酸水解复黄片供试品溶液制备 取复黄片20片,研成细粉,取约0.2g,精密称定,同“2.3.5”项下方法制备。

2.3.8 酸水解复黄片阴性(缺地榆炭)对照溶液制备 取复黄片阴性(缺地榆炭)对照颗粒0.2g,精密称定,同“2.3.5”项下方法制备。

2.3.9 色谱条件 同“2.2.5”项下条件。

2.3.10 专属性考察 取各对照药材溶液、复黄片阴性(缺地榆炭)对照溶液、复黄片供试品溶液各

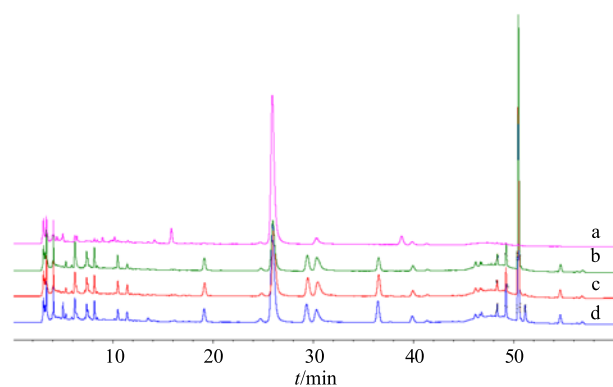
10 μ L 进样, 按“2.2.5”项下色谱方法测定(图3)。由图3-A、B可见, 地榆对照药材及地榆炭对照药材溶液色谱图中, 在27 min左右存在一特征峰; 从图3-C可见, 复黄片阴性(缺地榆炭)对照溶液色谱图中, 在27 min左右也存在一色谱峰, 但水解后该峰和其他主要色谱峰消失; 从图3-D可见, 复黄片供试品溶液色谱图中, 在27 min左右也存在一色谱峰。



A-地榆对照药材 B-地榆炭对照药材 C-复黄片阴性(缺地榆炭)对照 D-复黄片
A-*S. officinalis* B-*Sanguisorba Radix* (stir-bake to black) C-negative sample of *Sanguisorba Radix* (stir-bake to black) D-Fuhuang Tablets

图3 酸水解前、后 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC before and after acid hydrolysis



a-地榆对照药材 b~d-复黄片(批号 1711001、1711002、1711003)酸水解
a-*S. officinalis* b~d-Fuhuang Tablets (batch No. 1711001, 1711002, and 1711003) after acid hydrolysis

图4 3批复黄片酸水解-HPLC法地榆炭鉴别图谱
Fig. 4 HPLC identification chromatogram of three batches of Fuhuang Tablets with acid hydrolysis method

2.3.11 样品鉴别 分别取3批复黄片(批号1711001、1711002、1711003)细粉约0.2 g, 与“2.3.7”项下的酸水解复黄片供试品溶液同法制备, 分别取酸水解地榆对照药材溶液、3批酸水解复黄片供试品溶液各10 μ L注入液相色谱仪, 按“2.2.5”项测定, 结果表明, 供试品色谱在地榆对照药材对应位置有对应色谱峰, 说明该方法准确可靠、重现性好(图4)。

2.4 TLC 鉴别大黄

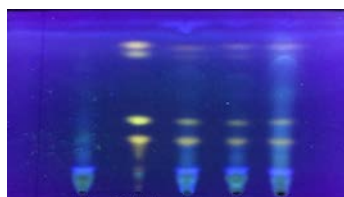
2.4.1 大黄对照药材溶液制备 取大黄对照药材0.1 g, 按《中国药典》2015年版大黄TLC项方法制备^[3]。

2.4.2 复黄片供试品溶液制备 取复黄片20片, 研成细粉, 取约0.5 g, 同“2.4.1”项下方法制备。

2.4.3 复黄片阴性(缺大黄)对照溶液的制备 取复黄片阴性(缺大黄)对照颗粒0.5 g, 同“2.4.1”项下方法制备。

2.4.4 色谱条件 按《中国药典》2015年版大黄TLC项下方法, 以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-丙酮-甲酸(400:80:3)为展开剂, 2次展开, 取出晾干, 紫外灯(365 nm)下检视^[3]。

2.4.5 样品鉴别 复黄片供试液色谱中, 在与对照药材色谱相应位置上, 显5个相同橙黄色荧光主斑点, 阴性对照溶液无斑点(图5)。



阴性 大黄对照 1 2 3

1~3-复黄片 (批号 1711001、1711002、1711003)

1~3-Fuhuang Tablets (batch No. 1711001, 1711002, 1711003)

图 5 大黄 TLC 图谱

Fig. 5 TLC of *R. palmatum*

3 讨论

3.1 HPLC 法同步定性鉴别蒲黄炭和槐角的研究

复黄片成分多、干扰严重,鉴别时挑战极大,HPLC 色谱柱类型、流动相体系种类与比例等是影响分离效果的关键因素。研究中以香蒲新苷、异鼠李素-3-*O*-新橙皮糖苷及槐角苷为对照品,以峰形、分离度为评价指标,对色谱条件进行了系统筛选,尝试了 10 种类型的色谱柱、5 种流动相、50 多种比例交叉实验,最终采用 Agilent TC-C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、乙腈-磷酸盐缓冲液为流动相体系,及优化的梯度洗脱条件,实现了 3 种成分的基线分离。据此建立了 2 味中药、3 个成分的鉴别方法,解决了这一 HPLC 鉴别难题。

3.2 酸水解-HPLC 法鉴别地榆炭 HPLC 的探索

地榆炭鉴别方法建立过程中,曾尝试 TLC,分别以没食子酸、地榆皂苷-I、地榆对照药材等为对照,进行了大量色谱条件筛选试验,因专属性不够、干扰大,没有找到特征斑点,阴性干扰也无法排除。

采用 HPLC 也未找到特征峰。最后,探索了酸水解-HPLC 法,发现经酸水解后的地榆对照药材、地榆炭药材有一强特征峰 (t_R 约 27 min),复黄片供试品有峰而阴性无干扰,据此解决了地榆炭鉴别方法的难题。

参考文献

- [1] 韩向晖,陆金根,曹永清,等. 复黄片防治痔疮的药效学研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(5): 59-62.
- [2] 王誉洁. 复黄片的研究 [M]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [3] 中国药典 [S] 一部. 2015.
- [4] 胡立宏,房士明,刘虹,等. 蒲黄的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2016, 35(2): 136-140.
- [5] Chung J G, Li Y C, Lee Y M, *et al.* Aloe-emodin inhibited *N*-acetylation and DNA adduct of 2-aminofluorene and arylamine *N*-acetyltransferase gene expression in mouse leukemia L 1210 cells [J]. *Leukemia Res*, 2003, 27(9): 831-840.
- [6] 韦华梅,王剑波. 中药槐角的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2010, 6(3): 115-119.
- [7] 曹爱民,张东方,沙明,等. 地榆中皂苷类化合物分离、鉴定及其含量测定 [J]. 中草药, 2003, 34(5): 16-18.
- [8] 张向阳,魏红,郑海萍,等. 地榆炭的研究进展 [J]. 环球医药, 2014, 7(2): 158-160.
- [9] 陈哲妮,黄婉锋. 地榆炭配方颗粒的质量控制研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(2): 66-68.
- [10] 迟玉霞. 多指标优化提取地榆有效成分工艺研究 [J]. 中国林副特产, 2012, 116(1): 26-28.