

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)05-0054-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.05.011



胆木凝胶剂处方优化及异长春花苷内酰胺含量测定*

梁 辉, 符秀娟[△], 林丽珍, 谭林燕, 胡伟利, 陈俊波, 吴江森

(海南职业技术学院, 海南 海口 570216)

摘要:目的 优化胆木凝胶剂处方, 并建立测定其异长春花苷内酰胺含量的高效液相色谱法。方法 以卡波姆-940、甘油、丙二醇、聚山梨酯80的用量为考察因素, 以凝胶的外观、涂展性、成型性、离心性为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选处方。色谱柱为 Waters Symmetry ShieldTM RP C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 227 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 优选处方中, 卡波姆-940、甘油、丙二醇、聚山梨酯80的用量分别为 3.5, 7, 8, 3 g。异长春花苷内酰胺的进样量在 0.019 48~0.584 4 μg 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 1.000\ 0, n = 7$); 检测限为 0.35 μg/g, 定量限为 1.17 μg/g; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.40%; 平均加样回收率为 108.03%, RSD 为 3.29% ($n = 6$)。3 批样品中异长春花苷内酰胺的含量分别为 425.43, 435.90, 441.81 μg/g。结论 所建立的胆木凝胶剂的制备工艺简单, 各项指标均符合凝胶剂的质量要求; 含量测定方法准确可靠, 可用于制剂中异长春花苷内酰胺的含量测定。

关键词:胆木凝胶剂; $L_9(3^4)$ 正交试验法; 处方优化; 异长春花苷内酰胺; 含量测定

Optimization of Danmu Gel Prescription and Content Determination of Strictosamide

LIANG Hui, FU Xiujuan, LIN Lizhen, TAN Linyan, HU Weili, CHEN Junbo, WU Jiangsen

(Hainan College of Vocation and Technique, Haikou, Hainan, China 570216)

Abstract: Objective To optimize the prescription of Danmu Gel, and to establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of strictosamide. **Methods** The dosages of Carbom-940, glycerin, propylene glycol and polysorbate 80 were taken as the investigation factors, and the appearance, spread, formability and centrifugality of gel were taken as the evaluation indexes. The prescription was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test. The chromatographic column was Waters Symmetry ShieldTM RP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 227 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** In the optimal prescription, the dosages of Carbom-940, glycerin, propylene glycol and polysorbate 80 were 3.5, 7, 8, and 3 g, respectively. The linear range of strictosamide was 0.019 48 - 0.584 4 μg ($R^2 = 1.000\ 0, n = 7$). The limit of detection was 0.35 μg/g, and the limit of quantification was 1.17 μg/g. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 1.40%. The average recovery rate of strictosamide was 108.03%, with an RSD of 3.29% ($n = 6$). The content of strictosamide in the three batches of samples was 425.43, 435.90, and 441.81 μg/g, respectively. **Conclusion** The established preparation process of Danmu Gel is simple, and all the indexes meet the quality requirements of gel. The content determination method is accurate and reliable, which can be used for the content determination of strictosamide in the preparation.

Key words: Danmu Gel; $L_9(3^4)$ orthogonal test; prescription optimization; strictosamide; content determination

* 基金项目: 海南省自然科学基金[822MS087]。

第一作者: 梁辉, 男, 硕士, 讲师, 研究方向为南药技术开发, (电子信箱)470886917@qq.com。

[△]通信作者: 符秀娟, 女, 大学本科, 副教授, 研究方向为南药技术开发与天然药效物质基础, (电子信箱)hnzyjsxy5826@163.com。

- SM, et al. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 680-687.
- [29] STEFANINI L, LEE RH, PAUL DS, et al. Functional redundancy between RAP1 isoforms in murine platelet production and function[J]. Blood, 2018, 132(18): 1951-1962.
- [30] ZHANG G, XIANG B, YE S, et al. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin α IIb β 3 outside-in signaling[J]. J Biol Chem, 2011, 286(45): 39466-39477.
- [31] 刘胜杰. Rap1 信号通路对创伤性脑损伤后血脑屏障影响的研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2021.
- [32] VASEVA AV, YOHE ME. Targeting RAS in pediatric cancer: is it becoming a reality?[J]. Curr Opin Pediatr, 2020, 32(1): 48-56.
- [33] AKRAM AM, CHAUDHARY A, KAUSAR H, et al. Analysis of RAS gene mutations in cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia patients reveals some novel alterations[J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(7): 3735-3740.
- [34] 杨启舟, 付 睿, 王莉莉. 肿瘤相关脑梗死发病机制的研究进展[J]. 中国卒中杂志, 2021, 16(2): 124-129.

(收稿日期: 2023-12-06; 修回日期: 2024-10-09)

胆木来源于茜草科乌檀属植物乌檀 *Nauclea officinalis* Pierre ex Pitard. , 主产于我国海南地区, 在广西、湖南、广东等地也有分布^[1-2], 是我国仅有的一种乌檀属植物^[3]。《全国中草药汇编》记载^[4], 胆木的用药部位为枝、干、皮, 具有清热解毒、消肿止痛功效, 主治急性扁桃体炎、咽喉炎、乳腺炎、肠炎、菌痢、尿路感染、胆囊炎、下肢溃疡、脚癣感染、疖肿脓疡、皮炎湿疹等症, 疗效显著, 号称“植物抗生素”, 已被国家林业和草原局确认为重点保护的珍稀野生植物物种^[5-6]。由于具有较好的抗菌、抗炎活性, 胆木已被制成多种中药制剂, 主要产品为胆木浸膏糖浆^[7]、胆木浸膏片^[8]、胆木浸膏胶囊^[9]、胆木注射液^[10]等内服剂型。研究表明, 中药凝胶剂具有涂展性好、透皮吸收强、易于清洗等特点^[11-12], 可用于黏膜或皮肤给药, 达到抗菌抗病毒、消炎镇痛的疗效^[13-14]。鉴于胆木尚无外用制剂相关研究, 本课题组拟首次制备胆木凝胶剂, 采用正交试验设计优化其处方, 并建立测定凝胶剂中异长春花苷内酰胺含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); TLE204E 型电子天平(精度为 0.1 mg), MS205DU 型电子天平(精度为 0.01 mg), 均购自瑞士 Mettler Toledo 公司; KH-250DB 型超声仪(昆山禾创超声仪器有限公司, 功率为 100 W, 频率为 50 kHz)。

1.2 试药

胆木药材(产于海南), 经海南职业技术学院胡伟利教授鉴定为正品; 异长春花苷内酰胺对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 110785-202205, 含量为 97.2%); 卡波姆-940(江苏鸿诗生物科技有限公司, 批号为 HS20200510); 丙二醇(分析纯, 南京威尔化工有限公司, 批号为 20170901); 甘油(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司, 批号为 20131106); 聚山梨酯 80(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂, 批号为 20210301); 乙醇(分析纯, 西陇科学股份有限公司, 批号为 2303109); 磷酸(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号为 20180405); 甲醇(批号为 WXBD8011V), 乙腈(批号为 WXBD4062V), 均为色谱纯, 购自西格玛奥德里奇贸易有限公司; 水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 胆木浸膏提取

取胆木药材, 粉碎成粗粉, 取粗粉 25 g, 用 80% 乙醇 500 mL 加热回流提取 3 次, 每次提取 1 h, 合并提取液^[15]。提取液过滤、回收乙醇后浓缩至相对密度为

1.32 ~ 1.35 的稠膏, 备用。

2.2 凝胶剂评价指标

凝胶剂应均匀、细腻, 常温时保持胶状, 不干涸或液化^[16]。以凝胶剂的外观、涂展性、成型性、离心性为评价指标^[17-18], 评分标准见表 1。

表 1 凝胶剂制备工艺评分标准

Tab. 1 Scoring criteria of the gel preparation process				
评价指标	20~25 分	10~19 分	3~9 分	0~2 分
外观	光滑透明且均匀	透明但有细小颗粒	略透明但颗粒较多	模糊且颗粒多
涂展性	易于涂布	可涂布但细腻度较差	可涂开但涂布性差	黏性大不易涂开
成型性	易成型	成型	大概成型	不易成型
离心性	均匀外观不变	无分层现象	表面有微小颗粒	分层

2.3 凝胶基质制备

取处方量的卡波姆-940, 均匀分散于 100 mL 蒸馏水中, 充分溶胀至糊状, 将甘油、丙二醇、聚山梨酯 80 与 10 mL 乙醇混匀, 缓慢加入卡波姆-940 中, 制成凝胶基质。

2.4 单因素试验

卡波姆-940 用量: 在预试验中, 固定其他组分(丙二醇 5 g, 甘油 6 g, 聚山梨酯 80 1 g), 考察卡波姆-940 的用量(2.0, 3.5, 5.0, 7.0 g)。结果卡波姆-940 用量为 3.5 g 时, 凝胶基质的评分最高, 故其用量选择 3.5 g。

丙二醇用量: 固定其他组分(卡波姆-940 2.0 g, 甘油 6 g, 聚山梨酯 80 1 g), 考察丙二醇的用量(3, 5, 7, 9 g)。结果丙二醇用量为 7 g 时, 凝胶基质的评分最高, 故其用量选择 7 g。

甘油用量: 固定其他组分(卡波姆-940 2.0 g, 丙二醇 5 g, 聚山梨酯 80 1 g), 考察甘油用量(4, 6, 8, 10 g)。结果甘油用量为 8 g 时, 凝胶基质的评分最高, 故其用量选择 8 g。

聚山梨酯 80 用量: 固定其他组分(卡波姆-940 2.0 g, 丙二醇 5 g, 甘油 6 g), 考察聚山梨酯 80 的用量(1, 2, 3, 4 g)。结果聚山梨酯 80 用量为 2 g 时, 凝胶基质的整体评价最佳, 故其用量选择 2 g。

2.5 正交试验^[19-22]

在单因素试验基础上, 以卡波姆-940(因素 A)、丙二醇(因素 B)、甘油(因素 C)、聚山梨酯 80(因素 D)的用量为考察因素, 以外观、涂展性、成型性、离心性为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选处方。因素与水平见表 2, 试验设计与结果见表 3。

表 2 因素与水平(g)

Tab. 2 Factors and their levels (g)				
水平	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D
1	2.0	5	6	1
2	3.5	7	8	2
3	5.0	9	10	3

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果
Tab. 3 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	因素A	因素B	因素C	因素D	外观 (分)	涂展性 (分)	成型性 (分)	离心性 (分)	综合评 分(分)
1	1	1	1	1	20	18	10	11	59
2	1	2	2	2	21	19	13	9	62
3	1	3	3	3	22	20	15	6	63
4	2	1	2	3	21	21	22	20	84
5	2	2	3	1	22	18	19	19	78
6	2	3	1	2	22	20	20	15	77
7	3	1	3	2	12	14	10	17	53
8	3	2	1	3	15	17	6	22	60
9	3	3	2	1	14	12	9	18	53
K_1	61.333	65.333	65.333	63.333					
K_2	79.667	66.667	66.333	64.000					
K_3	55.333	64.333	64.667	69.000					
R	24.334	2.334	1.666	5.667					

由方差分析结果可知,各因素对凝胶质量均无显著影响。详见表4。结合正交试验结果可知,各基质因素对胆木凝胶剂的影响程度大小顺序为 $A > D > B > C$,且以 $A_2B_2C_2D_3$ 为最佳,即卡波姆-940 3.5 g、丙二醇 7 g、甘油 8 g、聚山梨酯 80 3 g。

2.6 验证试验

为验证上述试验结果的准确性,取优选处方量的卡波姆-940 均匀分散于 100 mL 蒸馏水中,充分溶胀至糊状,将甘油、丙二醇、聚山梨酯 80 与 10 mL 乙醇混匀,缓慢加入卡波姆-940 中,制成凝胶基质,加入 2.1 项下稠膏,搅拌均匀,平行制备 3 批胆木凝胶剂,测定各因素的含量,并对评价指标进行评分。结果 3 批胆木凝胶剂的综合评分分别为 85 分、84 分、87 分,表明优选处方及工艺稳定、可行,可达到预期要求。详见表 5。

2.7 含量测定

2.7.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry ShieldTM RP C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液

表 4 方差分析结果

因素	离差平方和	自由度	F 值	P
A	964.222	2	3.729	> 0.05
B	8.222	2	0.032	> 0.05
C	4.222	2	0.016	> 0.05
D	57.556	2	0.223	> 0.05
误差	1 034.22	8		

表 5 验证试验结果

序号	因素A (g)	因素B (g)	因素C (g)	因素D (g)	外观 (分)	涂展性 (分)	成型性 (分)	离心性 (分)	综合评 分(分)
1	3.502 1	7.024 5	8.032 4	3.054 3	20	22	21	22	85
2	3.511 3	7.043 8	8.108 3	3.098 4	21	22	22	19	84
3	3.500 8	7.011 4	8.065 8	3.074 31	23	24	20	20	87

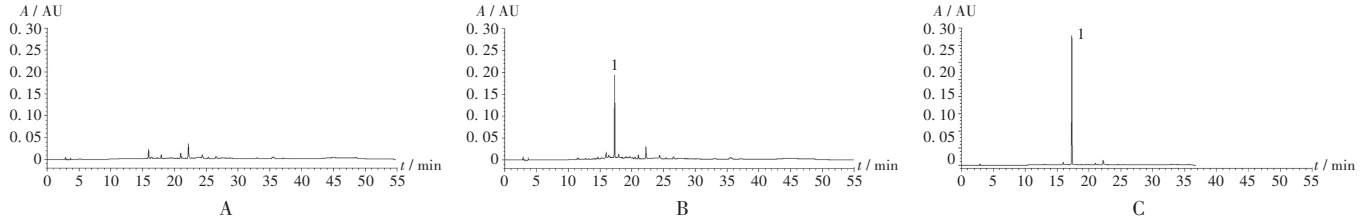
(B),梯度洗脱(0~5 min 时 5%A,5~12 min 时 5%A $\rightarrow$ 30%A,12~16 min 时 30%A $\rightarrow$ 55%A,16~20 min 时 55%A $\rightarrow$ 80%A,20~40 min 时 80%A,40~45 min 时 80%A $\rightarrow$ 5%A,45~55 min 时 5%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:227 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.7.2 溶液制备

取异长春花苷内酰胺对照品 10.25 mg,精密称定,加甲醇溶解并制成每 1 mL 含异长春花苷内酰胺 19.48 μ g 的对照品溶液。取胆木凝胶剂 4 g,精密称定,置 250 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 100 mL,称定质量,超声处理 40 min,放冷,再称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,离心(转速为 6 000 r/min)5 min,取上清液,用 0.45 μ m 有机滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。同法制备不加胆木浸膏的空白基质溶液。

2.7.3 方法学考察

专属性试验:取 2.7.2 项下 3 种溶液各适量,按 2.7.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且空白基质无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图 1。



1. 异长春花苷内酰胺
A. 空白基质溶液 B. 供试品溶液 C. 对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Strictosamide
A. Blank matrix solution B. Test solution C. Reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察与检测限确定:精密吸取异长春花苷内酰胺对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 μL , 按 2. 7. 1 项下色谱条件分别进样测定, 以进样量为横坐标(X , μg)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程 $Y = 4\,625\,349.32 X - 7\,414.68 (R^2 = 1.000\,0, n = 7)$ 。结果表明, 异长春花苷内酰胺的进样量在 0. 019 48 ~ 0. 584 4 μg 范围内与峰面积线性关系良好。以信噪比 (S/N) 分别为 3:1 和 10:1 时对应的对照品进样量作为仪器的检测限和定量限。结果检测限为 0. 35 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 1. 17 $\mu\text{g/g}$ 。

精密度试验:取 2. 7. 2 项下对照品溶液适量, 按 2. 7. 1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0. 93% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验:取胆木凝胶剂适量, 按 2. 7. 2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2. 7. 1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果的 RSD 为 1. 39% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验:取胆木凝胶剂适量, 按 2. 7. 2 项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0, 1, 2, 4, 8 h 时按 2. 7. 1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0. 19% ($n = 5$), 表明供试品溶液放置 8 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取胆木凝胶剂 2 g, 精密称定, 平行 6 份, 置 250 mL 锥形瓶中, 分别精密加入异长春花苷内酰胺对照品溶液(质量浓度为 97. 38 $\mu\text{g/mL}$) 10 mL、甲醇 90 mL, 按 2. 7. 2 项下方法制备供试品溶液, 按 2. 7. 1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算回收率。结果见表 6。

表 6 加样回收试验结果 ($n = 6$)
Tab. 6 Results of the recovery rate ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
2. 290 1	998. 25	973. 80	2 083. 61	111. 46	108. 03	3. 29
2. 214 7	965. 39	973. 80	2 069. 17	113. 35		
1. 959 3	854. 06	973. 80	1 883. 39	105. 70		
2. 024 9	882. 65	973. 80	1 906. 78	105. 17		
1. 958 4	853. 67	973. 80	1 900. 31	107. 48		
2. 093 1	912. 38	973. 80	1 934. 87	105. 00		

2. 7. 4 样品含量测定

取 2. 6 项下制备的 3 批胆木凝胶剂, 按 2. 7. 2 项下方法制备供试品溶液, 按 2. 7. 1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 按外标法计算含量。结果样品中异长春花苷内酰胺的含量分别为 435. 90, 425. 43, 441. 81 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

胆木的主要成分为以短小舌根草苷为代表的喹啉类生物碱及以异长春花苷内酰胺为代表的吲哚类生物碱, 其也是胆木发挥疗效的主要药效组分, 具有较好的

抗菌、抗病毒活性^[23-24]。本研究中参考杜迎翔等^[15]的胆木提取工艺, 收集以生物碱为主的胆木浸膏制成涂于皮肤表面的凝胶剂, 凝胶骨架基质选择了具有优良流变学性质的卡波姆, 其是丙烯基蔗糖与丙烯酸交联的高分子聚合物, 具有润滑和增湿能力强、皮肤涂展性好、无刺激性的特点^[25-27], 能有效控制碱性药物的溶出速率, 且涂于皮肤表面可吸收组织渗出液, 适用于酒渣鼻、痤疮等^[28]皮肤病的治疗。由正交试验结果可知, 胆木凝胶剂各基质的最优配比为卡波姆 - 940 3. 5 g、甘油 8 g、丙二醇 7 g、聚山梨酯 80 3 g。由方差分析结果可知, 各因素对凝胶质量均无显著影响, 这可能需要优化多因素多水平的选择, 后续将进一步开展相关研究。

为有效控制该制剂中胆木的质量, 有必要建立其含量测定方法, 定量指标选择了具有代表性的吲哚类生物碱异长春花苷内酰胺。异长春花苷内酰胺易溶于甲醇^[24], 故以甲醇作为样品的提取溶剂, 且超声提取 40 min 后, 该成分已提取完全。流动相考察了甲醇 - 0. 1% 磷酸溶液、乙腈 - 0. 1% 磷酸溶液、甲醇 - 0. 3% 磷酸溶液 3 种系统, 发现流动相为乙腈 - 0. 1% 磷酸溶液时的目标峰对称、稳定, 与相邻峰的分度大于 2. 0, 故选择其为流动相。采用二极管阵列检测器(DAD)对异长春花苷内酰胺对照品在 190 ~ 400 nm 波长范围内的光谱进行扫描, 发现异长春花苷内酰胺在 227 nm 波长处有最大吸收, 故选择其为检测波长。

本研究中建立的胆木凝胶剂的制备工艺简单, 各项指标均符合凝胶剂的质量要求; 含量测定方法准确可靠, 可用于制剂中异长春花苷内酰胺的含量测定。

参考文献

[1] 彭 警, 樊箫雨, 王迪磊, 等. 基于成分定量和指纹图谱的化学模式识别法评价胆木不同部位的差异性[J]. 中草药, 2023, 54(10): 3281 - 3291.

[2] 刘爱霞, 周明艳, 李湘怡, 等. 不同采收期胆木茎干 HPLC 指纹图谱研究[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(7): 488 - 494.

[3] 杨 婷, 黄圣卓, 陈惠琴, 等. 胆木木质部中一个新的酚酸苷[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(9): 1499 - 1506.

[4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 624.

[5] 刘 腾, 常艳璐, 王 斌. 胆木浸膏糖浆的药理作用与临床应用研究进展[J]. 药品评价, 2020, 17(16): 14 - 17.

[6] 麦世瑛, 王怡然, 李永辉, 等. 胆木化学成分对 HUVEC 细胞活性氧和通透性的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(1): 47 - 50.

[7] 刘 欢, 于鑫森, 王 月, 等. 胆木浸膏糖浆的 HPLC 指纹图谱研究和 9 种成分的含量测定[J]. 中国药房, 2019, 30(14): 1940 - 1945.

[8] 邱和声, 吴 涛, 廖 莉, 等. 胆木浸膏片联合头孢克肟治疗上呼吸道感染的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(4): 1016 - 1019.