

成都中医药大学

(药学院)

二〇一七届硕士研究生学位论文

古方乌发膏的药学研究

THE PHARMACEUTICAL RESEARCH OF CUBAN HAIR
CREAM

研究生姓名：王佳

指导教师：李希 教授

学科专业：药剂学

二〇一七年五月

学 位 论 文

古方乌发膏的药学研究

THE PHARMACEUTICAL RESEARCH OF CUBAN HAIR
CREAM

王佳

指导教师姓名： 李 希 教授
申请学位级别： 硕 士 专 业 名 称： 药 剂 学
论文提交时间： 2017 年 4 月 论文答辩时间： 2017 年 5 月

二〇一七年五月

中文摘要

本方来源于蒙药标准中的乌发涂剂，由诃子、西青果、木香、蔷薇茎皮、铁屑五味药材组成，用于治疗少年白发，疗效显著。本课题旨在中医药理论指导下，结合现代制剂技术，改善乌发涂剂制备耗时、用时反复剃发、不宜存储等不便性而制成乳膏剂，并对该制剂的制备工艺、质量标准及稳定性进行了实验研究。

根据处方的功能主治，结合方中各味药物的性质及实际生产，采用正交试验确定木香中挥发油、处方中没食子酸的提取工艺分别为：木香饮片 10 倍量水浸泡 1h，水蒸气蒸馏 8h，收集挥发油，保留药渣；处方中其他药材和木香药渣 10 倍量水 60℃ 下动态温浸两次，每次 3h。提取液经减压浓缩（60℃，真空度 -0.08~-0.09Mpa）至药液比 1:4 后加入乙醇使浓度达到 60%，静置 4h 除杂，再减压浓缩（60℃，真空度 -0.08~-0.09Mpa）至相对密度为 1.15~1.25（60℃）的清膏，回收乙醇。采用响应面法优选出古方乌发膏最佳基质处方：30mL 浓缩液（密度 1.2）、十六醇 20g、白凡士林 10g、十二烷基硫酸钠 0.5g、丙二醇 1.5%、氮酮 2.5%、尼泊金甲酯 0.05%。乳膏剂采用乳化法制备，即得。

制定古方乌发膏的质量标准，对方中诃子、西青果、木香、蔷薇茎皮四味药材进行了薄层鉴别，分离性良好，且阴性无干扰；对该制剂的指纹图谱进行研究，10 批样品的相似度>0.9，生成对照指纹图谱，对 17 个共有指纹峰分别进行归属，基本阐明该复方制剂的主要化学组成；采用 HPLC 法对制剂中挥发油成分木香烯内酯、去氢木香内酯及没食子酸进行了含量测定和方法学考察，拟定本品每克含木香烯内酯、去氢木香内酯的总量不得少于 4.21mg，每克含没食子酸不得少于 4.14mg。

对本制剂进行稳定性研究，分别进行 6 个月的加速试验和 12 个月的长期稳定性试验，结果各项检查项均符合规定，说明该制剂在包装良好的情况下，18 个月内质量稳定可靠。

关键词：古方乌发膏；制备工艺；质量标准；指纹图谱；稳定性。

Abstract

The prescription comes from the Mongolian medicine standard, Wufa Tuji. It consists of *Terminalia chebuLa* Retz, *Terminalia chebula*, Radix Auckladiæ, Rosa multiflora, Iron powder with a significant effect. The purpose of this project is to improve the preparation time, times of repeated shaving and the inconvenience of storage and so on, and to prepare the cream with the guidance of the theory of TCM under the guidance of traditional Chinese medicine theory. The preparation technology, quality standard and stability of the preparation were studied experimentally.

According to the prescription function, combined with the nature and actual production of each flavor drug, the orthogonal experiment was used to determine the extraction process of volatile oil and the gallic acid in the prescription. They were as follows: The optimized extraction technology was that water volume 10 times of crud drug, immersion time was selected as 1h and distillation time was 8h, retained the volatile oil and dregs. The optimized extraction of the prescription of other herbs and dregs was that extracted twice with 10 volumes of water at 60℃, each for 3h. The extract was concentrated under reduced pressure (60℃, vacuum -0.08 ~ 0.09Mpa) to the liquid ratio of 1: 4, then ethanol was added to the concentration of 60%, put it aside for 4h, then concentrated under reduced pressure (60℃, vacuum Degree -0.08 to 0.09 MPa) to a relative density of 1.15 to 1.25 (60℃). The optimum formulation of the prescription was obtained by response surface method, as follow: 30 mL of concentrated solution (density 1.2), cetyl alcohol 20 g, white petrolatum 10 g, sodium dodecyl sulfate 0.5g, propylene glycol 1.5%, azone 2.5%, methyl paraben 0.05%. Cuban Hair cream was prepared by emulsification method.

The quality standard of Cuban Hair cream was drawn up *Terminalia chebula*, *Terminalia chebuLa* Retz, Radix Auckladiæ, Rosa multiflora, were identified by thin layer identification with good separation and negative without interference. Fingerprints of the preparation were studied, the similarity of 10 batches of samples was >0.9, and the control fingerprint was generated and 17 common fingerprint peaks were assigned to respectively clarify the main components of the main chemical composition. The contents of volatile oils, such as costunolide, dehydrocostuslactone and gallic acid, were determined by HPLC, it was regulated that the total amount of costunolide and dehydrocostuslactone should not be less than 4.21mg/g and the gallic

acid should not be less than 4.14mg/g.

The stability studies of the formulations were carried out with a 6-month accelerated test and a 12-month long-term stability test, The results of the inspection items were in line with regulations, indicating that the quality of the preparation within one and a half year is stable and reliable in the case of good packaging.

Key words: Cuban Hair cream; preparation process; quality standard; fingerprint; stability

目录

中文摘要	I
Abstract	II
第一章 前言	1
1 引言	1
1.1 立题依据	1
1.1.1 西医研究现状	1
1.1.2 中医研究现状	2
1.1.3 中西医结合的必要性	3
2 处方研究	3
2.1 处方来源	3
2.2 处方组成	3
2.3 功能主治	3
2.4 方解	3
3 处方药物研究	4
3.1 西青果	4
3.1.1 化学成分	4
3.1.2 药理作用	4
3.2 诃子	4
3.2.1 化学成分	4
3.2.2 药理作用	5
3.3 木香	5
3.3.1 化学成分	5
3.3.2 药理作用	5
3.4 蔷薇茎皮	5
3.4.1 化学成分	5
3.4.2 药理作用	6
3.5 铁屑	6
3.5.1 药理作用	6
第二章 制备工艺研究	9
1 剂型的选择	9
2 工艺路线选择	9
3 工艺路线设计	10
4 提取工艺研究	10
4.1 药材鉴定与前处理	10
4.2 仪器与试药	11
4.2.1 仪器	11
4.2.2 试药	11
4.3 处方提取工艺研究	11
4.3.1 木香挥发油提取工艺研究	11
4.3.2 处方水提工艺研究	16
5 分离与纯化工艺研究	22
5.1 正交试验设计	22
5.2 正交试验设计方案及结果	22
5.3 验证试验	23
6 浓缩工艺研究	23
7 成型工艺研究	24
7.1 仪器与试药	24
7.1.1 仪器	24
7.1.2 试药	24

7.2 古方乌发膏基质的相关研究.....	25
7.3 方法与结果.....	25
7.3.1 古方乌发膏的制备工艺	25
7.3.2 乳膏剂的考察指标	25
7.3.3 基质种类的确定	26
7.3.4 响应面法优选古方乌发膏的基质组成	26
8 古方乌发膏制剂处方及工艺流程图	30
8.1 制剂处方	30
8.2 制备工艺流程图	31
9 中试研究	31
9.1 中试样品制备工艺验证	31
9.2 中试样品质量检查	32
第三章 蔷薇茎皮的质量标准	34
1 仪器与试药	34
2 鉴别	34
2.1 性状鉴别	34
2.2 显微鉴别	34
2.3 薄层鉴别	34
3 检查	35
3.1 水分	35
3.2 灰分	36
3.3 酸不溶性成分	36
3.4 测定结果	36
第四章 质量标准研究	37
1 仪器与试药	37
1.1 仪器	37
1.2 试药	37
2 饮片的来源及质量标准	37
3 成品质量标准	38
3.1 名称	38
3.2 性状	38
3.3 薄层鉴别	38
3.3.1 诃子、西青果的薄层鉴别	38
3.3.2 木香的薄层鉴别	39
3.3.3 蔷薇茎皮的薄层鉴别	39
3.4 检查	40
3.4.2 装量差异检查	40
3.4.3 铁盐检查	40
3.4.4 重金属检查	40
3.4.5 砷盐检查	40
3.4.6 pH 值测定	41
3.4.7 微生物限度检查	41
3.5 古方乌发膏的指纹图谱	41
3.5.1 方法	42
3.5.2 对照图谱的建立	44
3.5.3 指纹图谱相似度计算	45
3.5.4 特征指纹图谱分析	46
3.6 含量测定	46
3.6.1 木香烃内酯、去氢木香内酯的含量测定	46
3.6.2 没食子酸的含量测定	51
4 功能主治	55

5 用法用量	56
6 规格	56
7 贮藏	56
第五章 稳定性研究	57
1 试验方法	57
2 考察项目及结果	57
第六章 总结与讨论	64
1 总结	64
1.1 乳膏剂制备工艺	64
1.2 质量标准	64
1.3 稳定性试验	65
2 讨论	65
2.1 动态温浸提取工艺的选取	65
2.2 药材粒度的考察	65
2.3 没食子酸含量测定	65
2.3.1 检测波长的选择	65
2.3.2 供试品制备溶剂的选择	65
2.3.3 色谱条件的优化	66
2.4 响应面法筛选基质处方	66
2.4.1 基质处方评价指标的选定	66
2.4.2 促皮渗透剂的筛选	66
2.5 特征指纹图谱	67
2.6 创新点与不足之处	67
致谢	71
在读期间公开发表的学术论文	72
独创性声明及授权书	72

古方乌发膏的药学研究

第一章 前言

1 引言

1.1 立题依据

毛发早白是一种获得性疾病，常发生在儿童、青少年或中年人身上，表现为头发局部或完全变白^[1]，中国人以乌发为美，一头光泽柔顺的黑发给人以积极奋发、精神奕奕的感觉，使人看起来容光焕发、自信满满^[2]，可是少白头患者却有很大压力和诸多不便。目前大家急切想要治疗毛发早白，许多人掩盖白发通过经常染发的途径，但是染发不利于身体健康，不能从根本上解决问题，并能诱发多种疾病，如引起过敏、色素沉着、骨质疏松甚至癌变等^[3]，为了克服上述缺陷，根据中医药理论组方，对毛发早白的治疗进行研究。

1.1.1 西医研究现状

1.1.1.1 西医病因

世界各国对于毛发早白的的产生原因，还没有确定的报道和探索成果，很多人有种角度：酪氨酸循环障碍，减少了毛囊黑色素的生成，进而导致头发白化。尽管这种想法大家一致认为很合理，但是还不明确，也没有快速有用的治疗方法出现^[4]。依西医而论，寿命的缩短，可视为衰老的提前，即细胞老化、器官衰退、功能丧失、代谢减弱，也可能因遗传、慢性疾病、精神磨难、营养不良、微量元素及机体所需特殊物质匮乏所致^[5-11]。

1.1.1.2 西医治疗

(1) 按摩法

目按摩头皮能促进毛囊局部的血液循环，使毛乳头得到更多的营养，毛乳头、毛球部的色素细胞营养充足，活性增强，会分泌较多的黑色素，促进黑色素颗粒的形成，使头发变黑^[12]。

(2) 食疗

对于营养不良及微量元素所导致的头发早白，多采用食疗的方法^[13、14]。应多入食叶类蔬菜、鸡牛肉、粗粮类、含丰富维生素的食物等。

(3) 药物

米诺地尔搽剂可以促进头发生长^[15]，它刺激毛囊上皮细胞进行增殖^[16]，有

研究表明是改善 ERK/Akt/Bcl-2/Bax 的表达,增加了头发的生存期通过对毛乳头部位细胞促进增殖^[17-18]。多数临床试验验证,该药帮助白发转黑,可以使脱发区开始生发,并且使稀、细、软的头发生变浓密、变粗。

(4) 预防

第一,精神放松,避免经常忧虑。第二,多加锻炼,提高自身抵抗力。第三,加强营养,合理饮食。第四,头皮放松,增进头皮营养,可多梳理头发或按摩头皮。

1.1.2 中医研究现状

1.1.2.1 中医病因病机

中医认为:“肝主藏血,发为血之余”,“肾主藏精,其华在发”,“心主血脉”,“肺主皮毛”,“脾为气血生化之源”。若脏腑机能旺盛,阳气精血充盈,毛发得到充分濡养则黑润秀美,不易脱发。相反,若先天不足,后天失养,脏腑机能虚弱,气血阴阳亏虚,无以充养毛发则白发早生,稀疏易折。而其中与脾、肾、肝的关系更为密切。对于白发早生的病因,大致归为:气血不足、肝肾亏虚、血热偏盛、劳神情烦。

1.1.2.2 中医药治疗

现在用于白发早生的中医疗法主要有:

(1) 针灸法

中医利用针灸疗法,主要是通过改善阴阳偏盛状况,控制或诱使的方法治疗。针灸治疗具有以下几点功能作用:保健治疗、调节细胞和机体平衡、增强免疫力^[13]等。

(2) 中药治疗

口服药物多以以下几种法进行治疗:补肝肾法,如七宝美髯颗粒^[19]、童便枸杞豆^[20];气血疗法,如十全大补丸^[21]、人参归脾丸;疏肝解郁法,如逍遥丸、越鞠丸;清热凉血法,如女贞子膏、草还丹。

外用治疗白发多以清热、补虚药为主,有效中药方剂几百种,其中大多为民间验方。例如有生发功能的斑蝥溶液,通过外用涂抹使头皮充血;促生黑色头发的乌发汤,外用时需要除掉白发;还有诃子生发酊,也用来清热生发;乌发涂剂用时剃发,一日涂抹 2-3 次,用于少年重生乌发。

1.1.3 中西医结合的必要性

关于毛发早白的病因以及诱发机制尚未有明确的研究结果，目前西医用于治疗白发早生的方法并不能从根本上得到解决，在治疗效果上作用也很迟缓。然而中医更容易于被青睐，是通过传统辨证施治。所以，中西医结合治疗毛发早白是目前较为优越的治疗方法，具有疗效好、操作简单等优点，值得临床研究开展。因此开发研究治疗须发早白的中药很有必要。

毛发早白的治疗在我国古代经典名方和少数民族验方中均有记载，疗效确切，但由于古代制剂技术水平、制剂辅料有限，导致使用不方便，吸收差等缺点，因此本研究以这些名方验方为基础，运用现代制剂手段和方法进行研究，增强其疗效，使之符合现代临床运用的需要并为广大患者所接受。

治疗毛发早白的外用有效方剂中，乌发涂剂疗效显著，收于蒙药标准，为该药的开发研究提供了参考依据。本项目旨在将乌发涂剂在物质基础保持不变的情况下，运用现代制剂工艺和方法，制成使用更方便、更易吸收的乌发膏，以期达到良好的治疗效果。

2 处方研究

2.1 处方来源

古方乌发膏来源于蒙药标准中的乌发涂剂，治疗白发疗效显著。在中医药理论指导下，结合现代制剂技术，制成乳膏剂，可改善原乌发涂剂诸多不便性，首先可保持患者外观不必剃发，并易于存储、随时可用，且工艺更为合理可操作。

2.2 处方组成

诃子 西青果 木香 蔷薇茎皮 铁屑

2.3 功能主治

本方清热活血、益髓乌发。用来治疗血热偏盛、精亏血虚造成的水不涵木、发失濡养所导致的白发病。

2.4 方解

本方由诃子、西青果、木香、蔷薇茎皮、铁屑组成，主要用于治疗血热偏盛、精虚血弱所导致的白发早生之症。水不涵木，肝旺血燥，毛根不养皆因血热偏盛、情绪波动；肾亏不能化生阴血，阴血欠缺，毛发就失去营养，所以变白，治疗应

该清热活血，益髓乌发。方中诃子味酸、苦、涩，性平，归肺、大肠经，功善收敛，又降上焦之火，《药性论》道“令鬓发白者变黑”；西青果微寒，清热解毒，与诃子同为君药；蔷薇茎皮苦、涩、寒，归脾、胃、肾经，功善清热解毒、活血固精，《本草纲目拾遗》云：“妇人秃发，用蔷薇嫩枝，同猴姜煎汁刷之”，为臣药；木香理气，通三焦，畅调气机，为佐药，徐锴注道：“道家谓青木香为五香，亦云五木”，《修养书》云：“正月一日取五木煮汤以浴，令人至老须发黑”；《证类本草》云：“铁能安五脏，能黑鬓发”，发为血之余，肝主血，铁屑辛平入肝，坚骨髓，益髓生发，为使药。全方五味药味相辅相成，共收清热凉血，益髓生发之功。

3 处方药物研究

3.1 西青果

西青果，或称“藏青果”，是使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz.的干燥幼果。西青果始记于《图经本草》，原来称为随风子^[22]。《中华本草》^[23]谓其：“味苦、涩、微甘，性凉。归肺、大肠经。清热生津、利咽解毒”。

3.1.1 化学成分

经查阅文献^[24]，西青果中主要有三萜类、酚酸类和鞣质类^[25-26]。例如有甲酚、茨烯、橙花醇（nerol）、龙牛儿醇（geraniol）、S-杜松烯（S-cadinene）、 β -石竹烯（ β -caryophyllene）、 α -烯（ α -copaene）、橄榄醇（elemol）。

3.1.2 药理作用

现代研究具有抑菌、消炎、清热、降血糖等药理作用^[27]。其酚酸成分可抗菌抗病毒、抗脂质过氧化、清除自由基等^[28-30]。

3.2 诃子

诃子，为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Ret.或绒毛诃子 *Terminalia chebula* Retz.var.tomentella Kurt.的干燥成熟果实^[31]。味苦、酸、涩，性平。归肺、大肠经。《药性论》记载：“味苦、甘。通利津液，破胸膈结气，止水道，黑鬓发。”

3.2.1 化学成分

诃子中含有大量物质成分，可分为诃子酸、没食子酸、并没食子酸、诃黎勒

酸、1、3、6-三没食子酰葡萄糖、原诃子酸、葡萄糖没食子鞣苷。其中主要活性成分为鞣质类、酚酸类、三萜类、黄酮类、挥发油^[32]。

3.2.2 药理作用

据了解^[36]，诃子的各类提取物具有较强的抗氧化活性，能够清除自由基、影响脂质过氧化过程^[33]；诃子的粗提物和炮制品多见具有保肝、抗菌、抗病毒、降糖活性；诃子具有抗肿瘤活性，其活性成分诃子酸、鞣质酸和鞣花酸是主要抗肿瘤活性物^[34]，另外研究表明还具有抗突变、抗辐射、抗衰老、化学预防和免疫调节等药理活性；张荣^[34]、王璞^[35]等通过诃子乌头配伍，研究解毒活性，发现诃子中的鞣质类成分可能是降低乌头碱含量的基础物质。

3.3 木香

木香，为菊科植物木香（*Radix Auckladiæ*）的干燥根。味辛、苦，性温。归脾、大肠、三焦经。具有行气止痛、健脾消食、温中和胃之功效^[36-37]。

3.3.1 化学成分

主要成分有挥发油、萜类、蒽醌、黄酮、生物碱类^[38]。其中含挥发油约 0.3-3%，油中含 α -紫罗兰酮、木香酸、棕榈酸、二氢脱氢木香内酯、树脂、菊糖、22 种氨基酸及胆胺、甾醇类等。

3.3.2 药理作用

经了解，木香的主要活性成分为倍半萜类^[38]；参考相关文献^[39]，木香对多种癌细胞具有破坏作用；中药临床上常使用木香或其他药材配伍用于治疗消化系统疾病，包括消化不良、胃炎、胆结石等，也有相关研究表明木香的利胆^[40-41]、促胃动力^[42-43]、抗胃溃疡作用^[44]等。木香挥发油既有明显的血管扩张作用^[45]，可促进头皮血液循环，加强毛囊细胞营养吸收，濡养头皮，又可促进药物头皮吸收，另外木香中含有绿原酸，具有抗氧化和清除自由基的作用^[46]。

3.4 蔷薇茎皮

蔷薇茎皮为蔷薇科植物野蔷薇（*Rosa multiflora*）的干燥茎皮。野蔷薇根最早收载于《名医别录》，具有清热解毒、祛风除湿、活血、调经、固精缩尿之功效等^[47]。

3.4.1 化学成分

主要含三萜类、鞣质、黄酮苷及甾醇苷类^[48]，含 β -谷甾醇(β -sitosterol)、委

陵菜酸(tormentic acid), 即 2 α -二羟基熊果酸(2 α , 19 α -dihydroxyursolic acid), 野蔷薇葡萄糖酯(rosamultin)、齐墩果酸、熊果酸等。

3.4.2 药理作用

现代药理实验研究表明蔷薇茎皮可抗血栓、降血脂、抗动脉粥样硬化作用、抗实验性心肌梗死^[49-50], 乌苏酸、齐墩果酸作为蔷薇的活性物质, 具有明显的抗炎、抗肿瘤及抗艾滋作用^[51-54], 蔷薇茎皮中所含的皂苷类物质和多酚类均具有抗氧化、清除自由基等作用^[55-56], 且有研究表明黄酮苷对黑素的生成有一定的促进作用^[57]。

3.5 铁屑

铁屑, 按中国药典 2010 年版一部附录 III 成方制剂中本版药典未收载的药材和饮片中铁屑(诃子制)的制备方法制成。铁粉《本草求真》谓:“气辛、性平、入肝”。《开宝本草》中记载:“安心神, 坚骨髓, 润肌肤”。

3.5.1 药理作用

现代药理研究表明, 铁屑具有生血、补血等功效。铁粉经以亚铁盐形式吸收入体后, 能刺激造血器官并提供制造血色素的原料, 故能促进红细胞新生和增加血色素的数值而有补血作用。

参考文献:

- [1]. 赵明川, 张 玉, 周春英, 等. 毛发早白的病因病机与治疗概况[J]. 山东中医杂志, 2012, 31(2): 150-151.
- [2]. 董苡余, 夏锴. 中医治疗白发病研究进展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(29): 147-148.
- [3]. 李星彩. 染发剂烫发剂中的化学成分及其对人体的危害[J]. 微量元素与健康研究, 2006, 1(23): 47-48.
- [4]. 蒋华聪. 乌发延寿方药研究与疗效验证[J]. 中医药学报, 2001, 29(1).
- [5]. Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. J Natl Cancer Inst, 1993, 85: 365-376.
- [6]. de Haes JC, van Knippenberg FC, Neijt JP. Measuring psychological and physical distress in cancer patients. structure and application of the Rotterdam symptom checklist. Br J Cancer, 1990, 62: 1034-1038.
- [7]. 沈铿, 郎景和. 妇科肿瘤面临的问题和挑战[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 88-96.
- [8]. 曹卉, 郭卫东, 徐霞, 等. 少年白发患者发中微量元素分析[J]. 河南医科大学学报, 1999, 34(4): 65-66.
- [9]. 王晓伟, 陈莎, 曹莹, 等. 居住环境中微量元素与白发现象的关系研究[J]. 安全与环境学报, 2007, 7(6): 19-21.
- [10]. 姜秀梅, 王琳琳. 青少年白发与发中微量元素关系研究[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22(6): 13-14.

- [11].潘子奇.山西省中学生少白头形成的影响因素调查[J].中国初级卫生保健,2013,27(2):69-71.
- [12].云翔.少白头的来龙去脉[J].饭店现代化,1997,5:50-51.
- [13].方彦华,徐依依.青少年白发的病因及其治疗、预防[J].医学与社会,2005,18(7):27-29.
- [14].李志强.少年白发多忧愁[J].家庭医学,2007,8:24-25.
- [15].Messenger AG,Rundegren J.Minoxidil:mechanisms of action on hair growth[J].Br J Dermatol,2004,150:186—194.
- [16]. Boyera N,Galey I,Bernard BA.Biphasic effects of minoxidil on the proliferation and differentiation of normal human keratinocytes[J].Skin Pharmacol, 1997,10:206—220.
- [17].Han JH, Kwon OS,Chung JH, et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle [J].J Dermatol Sci,2004,34:91—98.
- [18].Yano K,Brown LF, Detmar M.Control of hair growth and follicle size by VEGF—mediated angiogenesis [J].J Clin Invest, 2001,107:409.
- [19].中华人民共和国药典委员会,中华人民共和国药典一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:30.
- [20].李留记,陈克忠.童便枸杞豆治疗少白头[J].四川中医,1991,3:14、15.
- [21].中华人民共和国药典委员会,中华人民共和国药典一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:419-420.
- [22].周磊.探析青果与西青果的不同及合理使用[J].首都医药,2014,3(2):51.
- [23].张鑫.西青果化学成分的研究[J].解放军广州医高专学报,1998,21(2):100-101.
- [24].王建设,谢雨洮,韩平,等.青果西青果及诃子的鉴别与临床应用[J].西部医学,2010,22(11):2147—2149.
- [25].刘玉梅,宋宝安,杨松,等.诃子化学成分与生物活性的研究进展[J].贵州大学学报(自然科学版),2007,24(2):208-212.
- [26].蔡小华,谢兵,杜海军,等.诃子化学成分及药理作用的研究进展[J].药学进展,2008,32(5):212-215.
- [27].颜玉贞,谢培山,宋立飞,等.西青果药材及提取物液相指纹图谱的应用研究[J].中成药,2004,26(8):603-607.
- [28].吕海宁,张克诚,崔增杰,等.核桃青皮体外抑菌活性的研究[J].华西药学杂志,2011,26(2):150-152.
- [29].孙达旺.植物单宁化学[M].北京:中国林业出版社,1992:1-32.
- [30].苏鑫.姜黄中姜黄素类抗癌活性成分识别与成分配伍研究[D].天津:天津大学,2013.
- [31].赵小霞,邱丽君,李存保,等.蒙药金诃子低温提取物鞣质成分和含量的测定[J].现代中药研究与实践,2015,29(4):27-30.
- [32].张秀娟,何丽娟,芦清,等.民族药诃子药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(4):619-623.
- [33].Chogsom M A,胡亚玲,文先,等.诃子果实活性成分提取及抗氧化活性研究[J].食品安全质量检测学报,2014,5(3):942.
- [34].张荣,李晓波,段美美,等.不同比例甘草诃子配伍制草乌对其次乌头碱含量的影响[J].时珍国医国药,2013,24(8):2025.
- [35].王璞,王嘉伦,王亚旭,等.藏药处方使用诃子乌头配伍的概况及减毒机理分析[J].世界中医药,2015,10(2):301.
- [36].中国科学院中国植物志编委会.中国植物志.第78卷.第1册[M].北京:科学出版社,1999:141.
- [37].江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1995:295.
- [38].魏华,彭勇,马国需,等.木香有效成分及药理作用研究进展[J].中草药,2012,43(3):613-620.
- [39].王绪颖,贾晓斌,陈彦.木香类药材的研究进展[J].中药材,2010,33(1):153-157.
- [40].邵芸,黄芳,王强,等.木香醇提取物的抗炎利胆作用[J].江苏药学与临床研究

究,2005,13(4):5-6.

[41]. 刘敬军,郑长青,周卓,等.广金钱草、木香对犬胆囊运动及血浆 CCK 含量影响的实验研究 [J].四川中医,2008,26(4):31-32.

[42]. 陈少夫,李宇权,何凤云,等.木香对胃酸分泌、胃排空及胃泌素、生长抑素、胃动素水平的影响[J].中国中西医结合杂志,1994,14(7): 406-408.

[43]. 周晓棉, 张利民, 曹颖林,等.木香动力胶囊内容物对小鼠胃排空的影响[J].沈阳药科大学学报,2003,20(3): 207-210.

[44]. 王小英. 木香对大鼠实验性急性胃粘膜损伤的影响 [J]. 中医研究,2004,17(2):21-22.

[45]. 陈大舜,易发银,邓常青,等.健脾消导中药对消化道功能影响的初步筛选研究 [J].湖南中医学院学报,1996,16(2):41-43.

[46]. Jeong G, Pae H, Jeong S, et al. The alpha-methylene-gamma-butyrolactone moiety in dehydrocostus lactone is responsible for cytoprotective heme oxygenase-1 expression through activation of the nuclear factor E2-related factor 2 in HepG2 cells [J]. Eur J Pharmacol,2007, 565(1/3): 37-44.

[47]. 刘士侠,丛者福.新疆蔷薇[M].新疆:新疆科技卫生出版社,2000.27—28.

[48]. 张萍,肖新月,张南平,等.蔷薇科根类药材化学成分及药理作用研究进展[J].中国药事,2008,22(8):721-726.

[49]. 陈武,熊筱娟,李开泉,等.乌苏酸抗肝炎的实验和临床研究[J].宜春学院学报自然科学,2001, 23(2):11.

[50]. 熊筱娟,陈武,李开泉,等.乌苏酸防治大鼠实验性肝损伤作用的研究[J].宜春医学学报,2001,13 (2):1261.

[51]. 张新全,赵艳玲,山丽梅,等.蕨麻素对化学性肝损伤保护作用机制的研究[J].解放军药学报, 2004,(4):2591.

[52]. Kashiwada Y, Wang H K, Nagao T, et al. Ant-i aids Agents1301Ant-i HIV activity of Oleanolic acid and structurally related triterpenoids [J]. Nat Prod,1998,61(9):10901.

[53]. 鞠建华,周亮,林耕,等.枇杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J].中国药学杂志,2003,38(10):7521.

[54]. 王德才,高允生,李珂,等.仙鹤草乙醇提取物抗炎镇痛作用的实验研究[J].泰山医学院学报,2004,25(1):71.

[55]. 其买古丽 阿沙木.野蔷薇根总皂苷的提取纯化及活性研究[D].新疆:新疆师范大学,2015.

[56]. 其买古丽 阿沙木,米丽班 霍加艾合买提,阿吾提·艾买尔,等.野蔷薇果皮多酚的提取与抗氧化和抑菌作用研究[J].华中师范大学学报 (自然科学版),2014,48(6):850-855.

[57]. 朱宇,王晓蓉,曲莉颖,等.中药棚皮素对皮肤增色作用的动物实验研究[J].中国皮肤性病杂志,2007,21(4):242-244.

第二章 制备工艺研究

1 剂型的选择

蒙药标准中的乌发涂剂是以诃子、西青果、木香、蔷薇茎皮组成，制时将以上四味药物混合粉碎，加水置铁制容器中温热浸泡数日至呈深褐色即得，用时剃光头取本品适量涂抹，一日 3-4 次，待一周后再剃光头涂抹，用来乌发，用于少年白发。其制备耗时、量大、用时剃发、不宜存储，故本研究在中医药理论指导下，结合现代制剂技术，为改善乌发涂剂的各种不便，处方经提取后加入适宜基质制成乳膏剂。乌发涂剂乳膏剂因加入的促皮渗透剂等基质，比原始使用方法更快发挥疗效，给药途径是从皮肤直接到达病灶，往往比口服疗效快而直接，还具有不伤及胃肠道和内脏器官，不影响口服药使用，不限疗程，一旦不适可随时停药的优点。

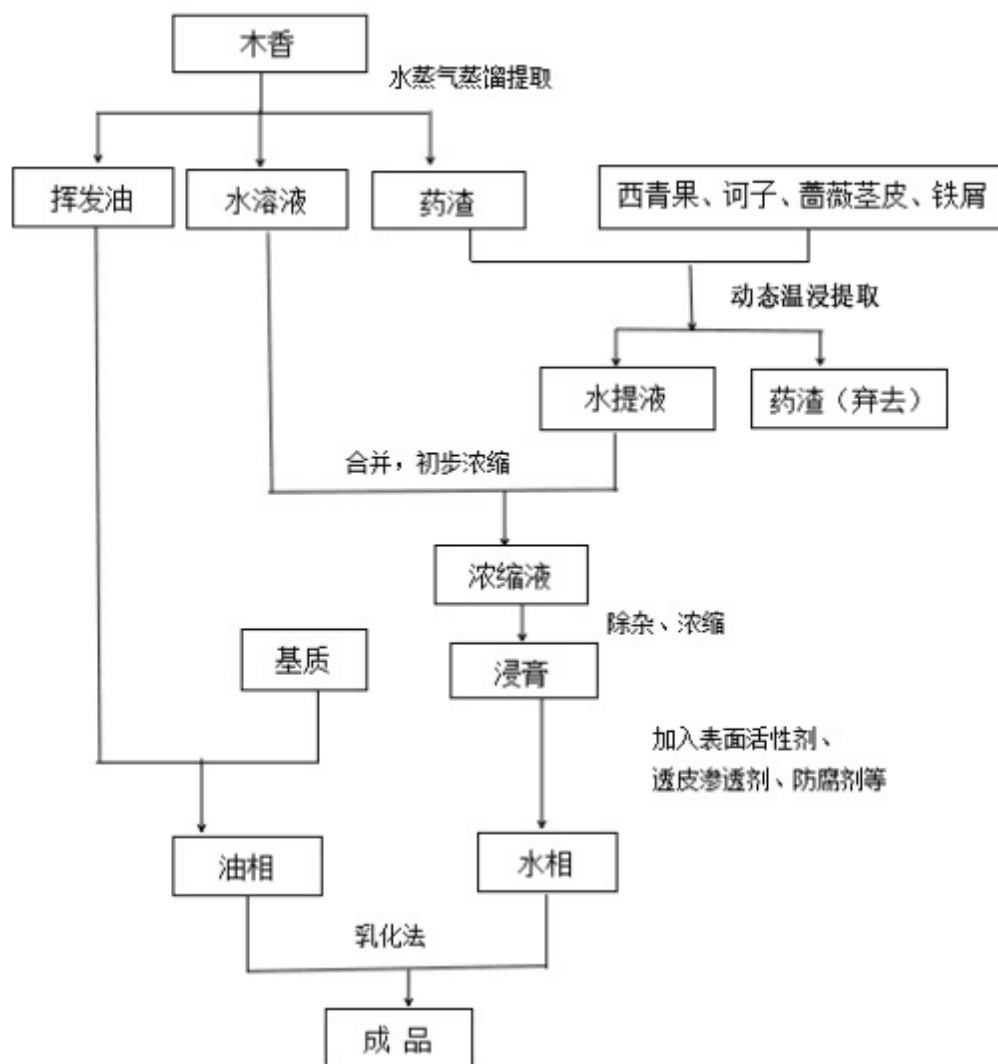
2 工艺路线选择

根据处方的功能主治，结合处方中各药物的理化性质以及实际生产的可操作性制定合理的工艺路线。

诃子、西青果为方中君药，主要含有鞣质类成分，蔷薇茎皮中也含有此类成分^[1-2]，该成分是多酚类，构造复杂，具水溶性^[3]。鞣质类成分具有抗氧化、抗病毒、抗菌等作用^[4-9]，课题把没食子酸作为这两味药物指标性成分之一，是因为其在鞣质类中举足轻重，既可以溶于水、又可以溶于醇^[10-12]，故结合原方的提取操作，采用水提法。木香的有用成分主要为萜类，另有蒽醌、黄酮等其他类^[13]，此中木香炔内酯与去氢木香内酯是主要作用成分^[14]。原方乌发涂剂运用的是温浸数日制备，本方在不改变物质基础同时高溶出效率的情况下采用动态温浸法，故最终本处方先水蒸气蒸馏法提取木香挥发油，再把其他药粉与木香药渣采用动态温浸工艺进行提取，这样一来提高温浸效率，二来又避免高温提取造成的挥发油成分的损失。

按照处方中各药物成分的理化性质，制定本方的工艺为：木香饮片通过水蒸气蒸馏法提取其挥发油组分，收集挥发油、水溶液和木香药渣，药渣和方中西青果、诃子等其余 4 味药粉采用动态温浸工艺提取，水提液过滤，合并木香水溶液，初步浓缩后醇沉除杂，再减压浓缩至一定密度，合并乳膏剂中的水相，把挥发油加入油相，油相同法加热，乳化法制成乳膏剂，即得。

3 工艺路线设计



4 提取工艺研究

4.1 药材鉴定与前处理

诃子：照 2015 年版《中国药典》一部规定，对诃子进行全检，结果符合规定。本品呈长圆形或卵圆形。薄层鉴别：在紫外灯下，供试品色谱与对照药材色谱相应位置呈相同颜色的斑点。经测定没食子酸含量为 1.62%。

西青果：照《中国药典》2015 年版一部规定，对西青果进行全检，结果符合规定。本品呈长卵形。薄层鉴别：在紫外灯下，供试品色谱与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点。经测定没食子酸含量为 1.71%。

木香：照《中国药典》2015 年版一部规定，对木香进行全检，结果符合规定，木香烯内酯和去氢木香内酯的总量为 3.48%。木香饮片为类圆形或不规则

厚片。

蔷薇茎皮：照自拟蔷薇茎皮质量标准进行检查（见第三章蔷薇茎皮的质量标准研究），结果符合规定。

铁屑：照中国药典 2010 年版一部附录Ⅲ成方制剂中本版药典未收载的药材和饮片中铁屑（诃子制）的制备方法制成。

4.2 仪器与试药

4.2.1 仪器

仪器	型号	厂家
高效液相色谱仪	Agilent 1260	美国安捷伦科技有限公司
数控超声波清洗器	KQ-300DE	昆山市超声仪器有限公司
电子天平	FA2004B	上海平轩科学仪器有限公司
	BT-125D	赛多利斯科学仪器北京有限公司
电热鼓风干燥箱	CS101	重庆实验设备厂制造
摇摆式高速中药粉碎机	LK-1000A500g	浙江温岭市创力药材器械厂制造
电热恒温水浴锅	XMTD-4000	北京市永光明医疗仪器有限公司
摩尔基因型超纯水器	1810a	重庆摩尔水处理设备有限公司

4.2.2 试药

对照品/药材	批号	药品来源
没食子酸对照品(GA)	110831-201204	中国食品药品检定研究院
木香烃内酯对照品	111524-201208	中国食品药品检定研究院
去氢木香内酯对照品	111525-201209	中国食品药品检定研究院
熊果酸对照品	110742-201220	中国食品药品检定研究院
甲醇	色谱级	美国 Fisher 公司
乙腈	色谱级	天津科密欧化学试剂有限公司

水为超纯水（实验室自制），其余试剂均为分析纯

4.3 处方提取工艺研究

4.3.1 木香挥发油提取工艺研究

4.3.1.1 木香烃内酯、去氢木香内酯含量测定

色谱条件及系统适应性试验：色谱柱为(Agilent Eclipse plus C₁₈, 5 μm, 4.6

mm×250 mm), 流动相为甲醇-水 (65:35), 流速为 1mL/min; 检测波长 225nm; 柱温 25℃; 理论塔板数按木香烃内酯峰计算不低于 3000。

对照品溶液的制备: 精密称取木香烃内酯、去氢木香内酯对照品各 5.005、5.375 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别从中精密量取 1 mL 至 5 mL 容量瓶中, 摇匀, 即得每 1 mL 各含 0.1001、0.1075 mg 木香烃内酯、去氢木香内酯的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备: 木香饮片水蒸气蒸馏提取挥发油, 精密量取一定体积木香挥发油 (相当于原药材 0.3g), 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。

木香烃内酯标准曲线绘制: 分别精密吸取木香烃内酯对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mL, 分别置于 5mL 的容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度依次为 0.02002、0.04004、0.06006、0.08008、0.1001、0.2002 mg/mL 的木香烃内酯对照品溶液。进样 10 μ L, 测定, 结果见表 2-1。以木香烃内酯对照品的进样量 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 进行线性回归, 见图 2-1。

表 2-1 木香烃内酯线性关系的考察

进样量 (μ g)	0.2002	0.4004	0.6006	0.8008	1.0001	2.002
峰面积	837.16	1678.84	2502.37	3389.73	4172.12	8204.19

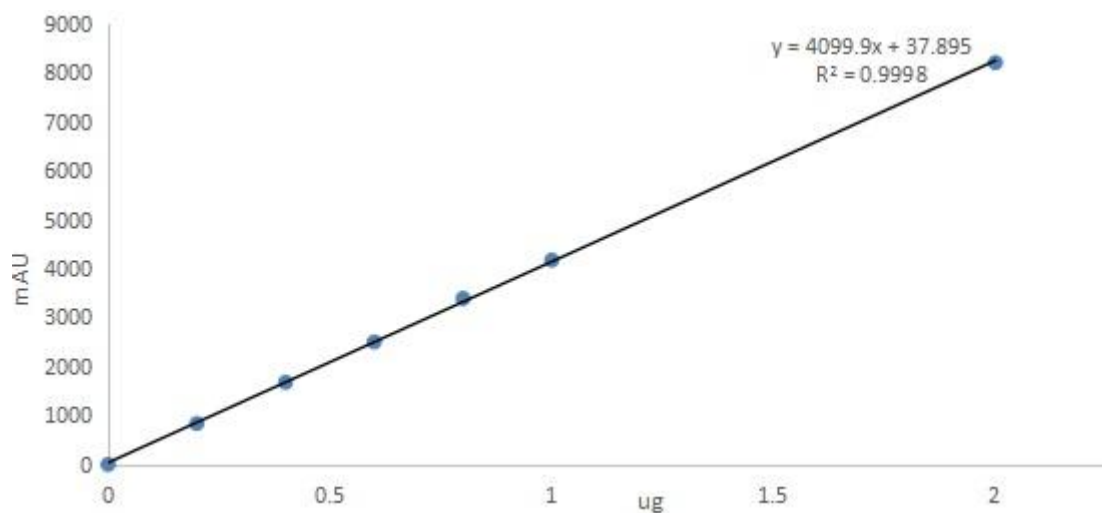


图 2-1 木香烃内酯标准曲线

结果表明: 在 0.02002~0.2002 mg/mL 范围内, 木香烃内酯内酯的峰面积与进样量的线性关系良好。

去氢木香内酯标准曲线绘制: 同木香烃内酯标准曲线绘制各对照品溶液的配制, 得到浓度依次为 0.0215、0.0430、0.0645、0.0860、0.1075、0.2150 mg/mL

的去氢木香内酯对照品溶液。进样 10 μL ，测定，结果见表 2-2。以木香烯内酯对照品的进样量 (X) 为横坐标，峰面积 (Y) 为纵坐标，进行线性回归，见图 2-2。

表 2-2 去氢木香内酯线性关系的考察

进样量 (μg)	0.2150	0.4300	0.6450	0.8600	1.075	2.150
峰面积	240.72	499.51	704.44	942.85	1197.31	2340.19

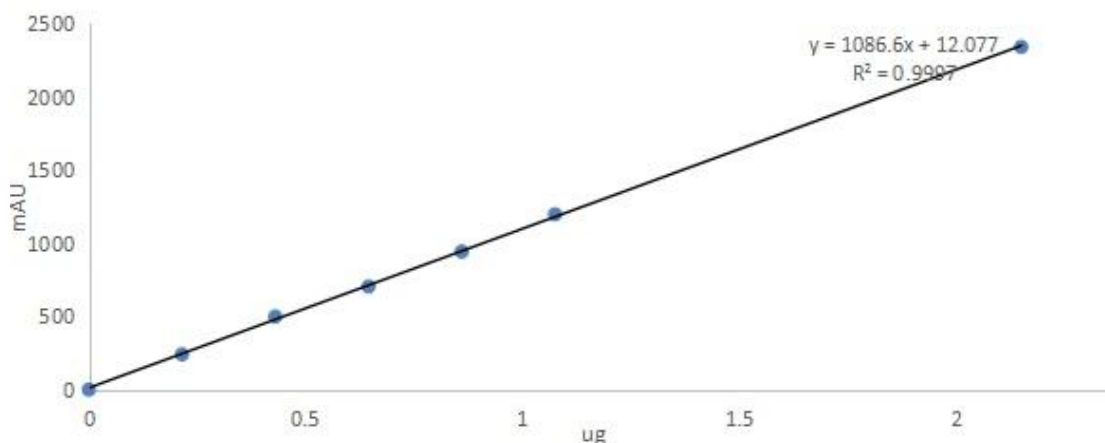


图 2-2 去氢木香内酯标准曲线

结果表明：在 0.0215~0.2150 mg/mL 的范围内，去氢木香内酯的峰面积与其进样量的线性关系良好。

对照品溶液、供试品溶液依次进样，因只有木香一味药材，故无阴性对照，木香烯内酯、去氢木香内酯混合对照品、单味木香药材的液相色谱图见图 2-3、2-4。

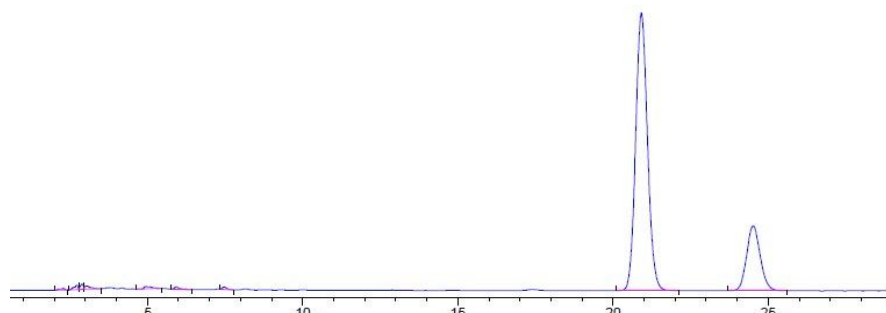


图 2-3 木香混合对照品溶液的色谱图

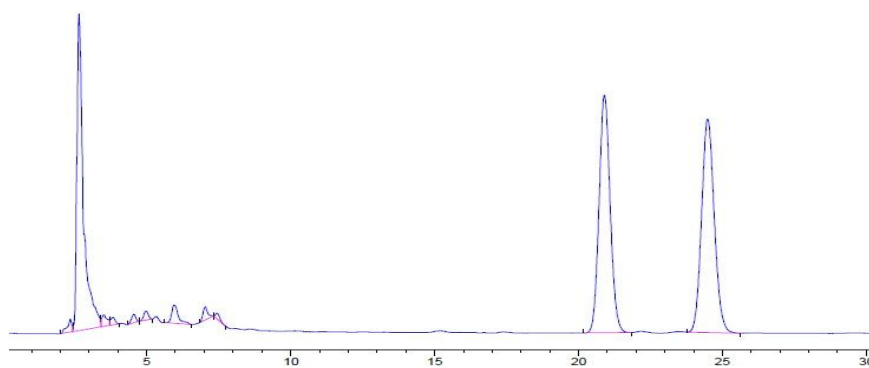


图 2-4 木香供试品溶液的色谱图

由图 2-3、图 2-4 可知，木香烯内酯、去氢木香内酯出峰时间分别在 21、24min 左右，且两个目标峰的峰形、分离度均良好、无干扰。

精密度试验：分别吸取 0.1001、0.1075 mg/mL 的木香烯内酯、去氢木香内酯对照品混合溶液，按照上述方法测其峰面积，连续测定 6 次，结果见表 2-3，木香烯内酯、去氢木香内酯峰面积的 *RSD* 值分别为 0.12、0.36%，表明仪器精密性良好。

表 2-3 精密度试验

次数	1	2	3	4	5	6	<i>RSD</i> (%)
木香烯内酯							
峰面积 (mAU)	4175.23	4176.91	4173.44	4165.27	4179.35	4170.35	0.12
去氢木香内酯							
酯峰面积 (mAU)	1198.11	1192.43	1191.72	1185.64	1189.32	1194.75	0.36

重复性试验：取同一批样品 6 份，按照供试品溶液制备，测定，结果见表 2-4，两者含量的 *RSD* 分别为 0.84、0.77%，表明该试验重复性良好。

表 2-4 重复性试验

次数	1	2	3	4	5	6	<i>RSD</i> (%)
木香烯内酯							
含量 (mg/g)	5.0662	5.0712	5.0954	5.0271	5.0134	4.9808	0.84
去氢木香内酯							
含量 (mg/g)	20.1341	20.0632	19.9729	20.1659	19.9049	19.7583	0.77

稳定性试验：取供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 测定其木香烯内酯、去氢木香内酯的峰面积，*RSD* 分别为 0.90、0.56%，表明该溶液在 48

h 内稳定。

表 2-5 稳定性试验

时间 (h)	0	2	4	8	12	24	48	RSD (%)
木香烃内酯峰面积 (mAU)	1294.13	1284.28	1292.39	1272.54	1271.19	1287.46	1264.36	0.90
去氢木香内酯峰面积 (mAU)	1326.74	1320.12	1317.27	1324.83	1320.19	1313.17	1304.78	0.56

4.3.1.2 收油率的测定

精密称定正交试验项下提取的挥发油, 可得木香挥发油的重量, 收油率即为其与木香原药材重量的比值。

4.3.1.3 正交试验优选木香挥发油最佳提取工艺

称取 100 g 木香原药材, 采用水蒸气蒸馏法提取木香挥发油, 工艺研究中对料液比, 浸泡时间、提取时间等进行考察, 采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验优选工艺参数, 确定最佳提取工艺。因素水平表见表 2-6。

表 2-6 正交试验因素水平表

水平	A 料液比	B 浸泡时间 (h)	C 提取时间 (h)	D 空白
1	1:6	0	4	/
2	1:8	0.5	6	/
3	1:10	1	8	/

以 100g 木香原药材中木香烃内酯、去氢木香内酯的总含量和收油率作为评价指标, 其权重系数分别为 0.6、0.4, 进行综合评分。正交试验结果及方差分析见表 2-7、表 2-8。

表 2-7 正交试验设计方案及结果

试验号	A	B	C	D	收油率 (%)	目标成分总含量 (mg/g)	综合评分
1	1	1	1	1	0.38	8.7829	35.90
2	1	2	2	2	0.53	12.0453	49.58
3	1	3	3	3	0.92	24.1259	93.75
4	2	1	2	3	0.54	12.0453	49.97
5	2	2	3	1	0.75	20.2480	77.82
6	2	3	1	2	0.73	19.5848	75.45
7	3	1	3	2	1.02	25.0989	100.00
8	3	2	1	3	0.84	23.1094	88.19

9	3	3	2	1	0.81	23.1045	87.00
K1	179.23	185.87	199.53	200.71			
K2	203.23	215.58	186.55	225.02			
K3	275.18	256.20	271.57	231.91			
R	95.95	70.33	85.02	31.20			

表 2-8 方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	方差 MS	F 值	F 临界值	显著性
A	1662.4	2	831.2	9.299	$F_{0.1}(2,2)=9$	显著
B	830.973	2	415.487	4.64	$F_{0.05}(2,2)=19$	不显著
C	1398.385	2	699.193	7.810		不显著
D (误差)	179.014	2	89.507	1.000		

根据直观分析可知,各因素对两者的提取效果的影响程度依次为 $A>C>B>D$ 。以 D 因素为误差项进行方差分析,表明 A 因素对目标成分的提取影响明显,从有效成分含量及方便提取考虑,故确定最优提取方案为 A3B3C3,即木香挥发油提取的最佳工艺为:10 倍量水浸泡 1h,水蒸气蒸馏 8 h。

4.3.1.4 验证试验

为保证所筛选工艺的稳定性,依据最佳提取条件,对此进行验证,结果见表 2-9。

表 2-9 验证试验结果

试验号	收油率 (%)	目标成分含量 (mg/g)
1	1.10	26.7342
2	1.08	25.8456
3	1.12	26.9475
平均值	1.10	26.5091

由上述结果可知,100g 木香饮片 10 倍量水浸泡 1h,水蒸气蒸馏 8h,得到收油率平均为 1.10%,木香烃内酯和去氢木香内酯总含量的平均值为 26.5091mg/g,表明所筛选的水蒸气蒸馏法提取木香挥发油的工艺稳定可行。

4.3.2 处方水提工艺研究

4.3.2.1 粒度的单因素考察

分别取处方中药材饮片、粗粉、中粉 3 种规格,每份 100g,分别加 10 倍量水 60℃ 下动态温浸提取两次,每次 3,过滤得到滤液,滤液减压浓缩(60℃,真空度 -0.08~-0.09Mpa)至 500 mL,取 1 mL 置 50 mL 容量瓶中,50%CH₃OH 定容,振摇,滤过,滤液即得。以没食子酸的含量为指标成分筛选最佳粒度,结果见表

2-10, 综合考虑提取过程中有效成分的溶出, 故应选择粗粉。

表 2-10 粒度考察

粒度规格	没食子酸含量 (mg/g)
饮片	9.3164
粗粉	13.8324
中粉	7.6253

4.3.2.2 西青果、诃子、木香、蔷薇茎皮吸水率考察

称取西青果、诃子、木香、蔷薇茎皮药材粗粉共 100 g, 共三份, 加 10 倍水浸泡过夜, 过滤, 称重, 计算药材的吸水率, 结果见表 2-11。

表 2-11 吸水率考察

编号	药材重 (g)	吸水后重 (g)	吸水率 (%)	平均吸水率 (%)
1	100	185.7	85.70	86.13
2	100	186.2	86.20	
3	100	186.5	86.50	

由表可知, 西青果、诃子、木香、蔷薇茎皮药材粗粉的平均吸水率为 86.13%, 故在首次进行提取时应额外加入 0.9 倍的水。

4.3.2.3 评价指标的选择

古方乌发膏以诃子、西青果、木香等五味药物组成, 其中没食子酸是处方的主要有效成分, 没食子酸又名鞣酸、五倍子酸, 存在于西青果、诃子、牡丹皮、山茱萸、五倍子、虎耳草等中药及其复方制剂 (如双丹口服液等) 中, 亦是葡萄和红茶中重要的多酚类化合物^[15-16], 具有抑菌、抗炎、抗氧化等作用^[15]。西青果及诃子来源基本相同, 都含有鞣质没食子酸类成分, 另外处方中木香、蔷薇茎皮中也均含有该类成分, 故没食子酸作为处方的指标成分。通过正交试验设计, 以没食子酸的含量和出膏率为指标, 优化处方的最佳提取工艺。

4.3.2.4 没食子酸含量测定

色谱条件及系统适应性试验^[17]: 色谱柱为(Inertsil® ODS-3, 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 流动相为 0.05% 磷酸的甲醇液 (A) -0.05% 磷酸水溶液 (B), 条件如下:

时间 (min)	A (0.05% 磷酸的甲醇液)	B (0.05% 磷酸水溶液)
0-7	10→5	90→95
7-15	5→18	95→82
15-20	18	82

检测波长为 272 nm，柱温为 25 ℃，流速为 1.0 mL/min，进样量为 10 μL。理论塔板数按没食子酸峰计算不低于 6000。

对照品溶液的制备：精密称取没食子酸对照品 5.175 mg，置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液。从中精密量取 1 mL 至 25 mL 容量瓶中，加 50% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，即得每 1 mL 含 0.0207 mg 没食子酸的对照品溶液。

供试品溶液的制备^[18]：称取处方中适量药材粗粉，加 10 倍量水 60℃ 下动态温浸提取两次，每次 3h，过滤得到滤液，滤液减压浓缩（60℃，真空度 -0.08~0.09Mpa）至 500 mL，取 1 mL 置 50 mL 容量瓶中，用 50%CH₃OH 定容，振摇，滤过，滤液即得。

阴性溶液的制备：除去西青果、诃子外，称取处方适量药材粗粉，按照供试品溶液制备项下进行制备。

阴性溶液干扰考察：取对照品、供试品以及阴性样品溶液各 10 μL，按照上述色谱条件进行测定，色谱图见图 2-5。

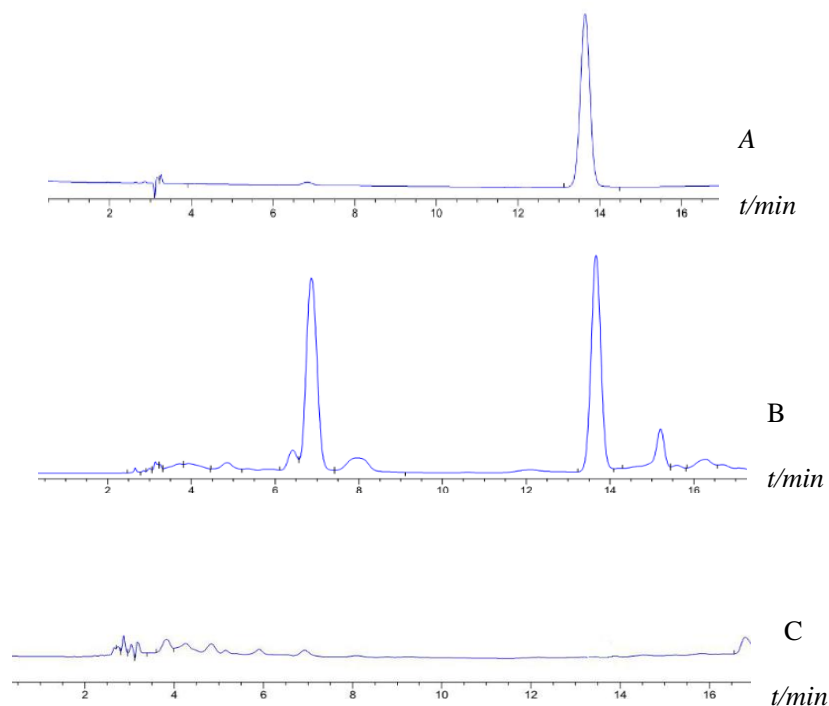


图 2-5 阴性干扰考察

A 对照品溶液；B 供试品溶液；C 阴性溶液

从以上结果可以看出，供试品溶液在上述色谱条件下出峰时间 13min-14min，且目标峰分离情况良好，且阴性样品溶液无干扰。

标准曲线的绘制：取上述没食子酸对照品母液，分别吸取 2.5、1.25、1、0.75、0.5、0.25 mL 用 50% 甲醇溶液稀释至 10 mL 容量瓶中，依次得到浓度为 0.1294，0.0647，0.0518，0.0388，0.0259，0.0129 mg/mL 的一系列对照品溶液，精密吸取各浓度对照品溶液 10 μ L，分别注入高效液相色谱仪，按照上述色谱条件测定峰面积，以峰面积（Y）为坐标，以没食子酸对照品的进样量（X）为横坐标，绘制标准曲线，结果见表 2-12、图 2-6。

表 2-12 没食子酸线性关系的考察

进样量（ μ g）	0.1294	0.2588	0.3881	0.5175	0.6469	1.2938
峰面积	349.53	702.54	1059.63	1364.27	1741.08	3500.57

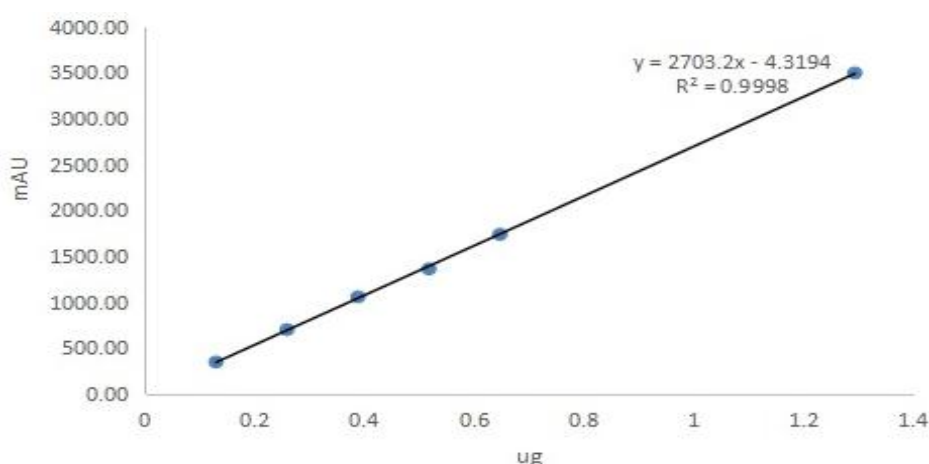


图 2-6 没食子酸标准曲线

结果表明：在 0.0129~0.1294 mg/mL 浓度范围内，没食子酸的峰面积与其进样量的线性关系良好。

精密度试验：取 0.0647 mg/mL 没食子酸对照品溶液，按照上述方法测其峰面积，连续测定 6 次，计算得没食子酸的峰面积平均值为 1751.29，RSD 为 0.25%，表明仪器精密度良好，结果见表 2-13。

表 2-13 精密度试验

试验次数	1	2	3	4	5	6
没食子酸峰面积（mAU）	1748.67	1751.47	1753.44	1758.72	1748.19	1747.22

RSD (%)

0.25

重复性试验：取 6 份同一批样品，按上述供试品溶液制备，测得没食子酸的含量平均值为 13.748mg/g，RSD 为 0.47%，表明仪器重复性良好，结果见表 2-14。

表 2-14 重复性试验

试验次数	1	2	3	4	5	6
没食子酸含量 (mg/g)	13.8224	13.7871	13.7936	13.7291	13.7074	13.6482
RSD (%)	0.47					

稳定性试验：取上述供试品溶液一份，分别于 0、2、4、8、12、16、24 h 测定其没食子酸峰面积，RSD 为 0.62%，表明该溶液在 24 h 内稳定，结果见表 2-15。

表 2-15 稳定性试验

时间 (h)	0	2	4	8	12	16	24
没食子酸峰面积 (mAU)	2512.28	2503.47	2500.46	2487.74	2509.75	2494.03	2467.27
RSD (%)	0.62						

4.3.2.5 干膏率的测定

精密量取相当于原药材 1g 的提取液，放置于已恒重的蒸发皿中，在 100 ℃ 水浴上挥干，将蒸发皿置烘箱中，于 105 ℃ 干燥至恒重，计算出膏率。

4.3.2.6 正交试验设计及结果

根据原方制备方式及相关文献^[19-20]，为提高有效成分的溶出，本实验在温浸的基础上选择动态温浸作为主要提取方式，每小时搅动一次。工艺研究中对加水量，温浸温度、温浸时间、次数等进行考察，采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验优选工艺参数，确定最佳提取工艺。因素水平表见表 2-16。

表 2-16 正交试验因素水平表

水平	A 溶剂用量 (倍)	B 温浸温度 (℃)	C 提取时间 (h)	D 提取次数
1	6	40	1	1
2	8	60	2	2
3	10	80	3	3

以没食子酸的含量和出膏率为评价指标。总分 100 分，将两者的权重系数分别拟定为 0.8、0.2，进行综合评分。正交试验结果及方差分析见表 2-17、表 2-18。

表 2-17 正交试验设计方案及结果

试验号	A	B	C	D	出膏率	没食子酸	综合
-----	---	---	---	---	-----	------	----

					(%)	含量 (mg/g)	评分
1	1	1	1	1	23.09	6.3785	46.17
2	1	2	2	2	24.41	6.6868	48.48
3	1	3	3	3	39.83	11.1151	80.29
4	2	1	2	3	24.89	6.8905	49.85
5	2	2	3	1	36.08	9.9671	72.14
6	2	3	1	2	35.55	9.7992	70.96
7	3	1	3	2	49.78	13.8316	100
8	3	2	1	3	38.89	10.7283	77.68
9	3	3	2	1	38.32	10.6075	76.75
K1	174.94	198.33	194.81	195.06			
K2	192.95	354.16	175.08	219.44			
K3	254.43	228	252.43	207.82			
R	79.49	29.7	77.35	24.38			

表 2-18 方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	方差 MS	F 值	F 临界值	显著性
A	1187.416	2	579.045	12.956	$F_{0.1(2,2)}=9$	显著
B	225.163	2	106.112	2.457	$F_{0.05(2,2)}=19$	不显著
C	1057.058	2	538.465	11.533		显著
D (误差)	91.65	2	49.568	1.000		

根据直观分析可知,各因素的影响程度依次为 $A>C>B>D$ 。以 D 因素为误差项进行方差分析,结果 A、C 因素对没食子酸的提取影响显著,从有效成分含量以及时间角度考虑,选择 A3B2C3D2,即古方乌发膏提取的最佳工艺为:10 倍量水 60℃ 下动态温浸提取两次,每次 3 h。

4.3.2.7 验证试验

为保证所筛选工艺的稳定性,依据最佳提取工艺参数,对此进行验证,结果见表 2-19。

表 2-19 验证试验结果

试验号	没食子酸含量 (mg/g)	出膏率 (%)
1	13.3198	48.35
2	12.9329	46.57
3	13.4261	48.06
平均	13.2263	47.66

RSD %

1.96%

2.00%

由上述结果可知，没食子酸平均含量为 13.2263 mg/g，RSD 为 1.96%；出膏率平均为 47.66%，RSD 为 2.0%，表明所筛选的提取工艺稳定可行。

5 分离与纯化工艺研究

中药提取液一般来说有体积大，杂质多的特点，为提高疗效，常需进一步分离和精制。本研究主要采用水提法，且主要目标成分为没食子酸，其既可溶于水，又溶于不同浓度的乙醇，故除杂方法选用常用的水提醇沉法。本试验采用正交设计，以没食子酸含量优选水提醇沉工艺。

5.1 正交试验设计

工艺研究中以没食子酸含量为指标对料液比、醇沉浓度、醇沉时间进行考察，采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验优选工艺参数，确定最佳醇沉工艺。因素水平表见表 2-20。

表 2-20 正交试验因素水平表

水平	A 料液比 (g/mL)	B 醇沉浓度 (%)	C 醇沉时间 (h)	D 空白
1	1:2	60	2	/
2	1:4	70	4	/
3	1:6	80	6	/

5.2 正交试验设计方案及结果

按照正交试验设计分别称取处方中药材粗粉，10 倍量水 60℃ 下动态温浸提取两次，每次 3 h，合并滤液，滤液初步减压浓缩（60℃，真空度 -0.08~0.09Mpa）至试验设计要求，然后边加入 95% 的乙醇边搅动，使达到要求的醇沉浓度，再依次静置至规定时间，过滤，取 1 mL 滤液置 50 mL 容量瓶中，用 50%CH₃OH 定容，振摇，滤过，滤液即得。正交试验结果及方差分析见表 2-21、表 2-22。

表 2-21 正交试验设计方案及结果

试验号	A	B	C	D	没食子酸含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	12.1124
2	1	2	2	2	11.3055
3	1	3	3	3	10.2843
4	2	1	2	3	13.8477
5	2	2	3	1	13.1462
6	2	3	1	2	12.3041

7	3	1	3	2	12.2054
8	3	2	1	3	13.0027
9	3	3	2	1	12.3845
K1	33.7022	38.1655	37.4192	37.6431	
K2	39.298	37.4544	37.5377	35.815	
K3	37.5926	34.9729	35.6359	37.1347	
R	5.5958	3.1926	1.9018	1.8281	

表 2-22 方差分析表

方差来源	偏差平方和	方差 <i>MS</i>	自由度	<i>F</i> 值	<i>F</i> 临界值	显著性
A	5.317	2.659	2	9.865	$F_{0.1(2,2)}=9$	显著
B	1.906	0.953	2	3.536	$F_{0.05(2,2)}=19$	不显著
C	0.794	0.397	2	1.473		不显著
D (误差)	0.54	0.27	2	1.000		

根据直观分析可知,各因素的影响程度依次为 $A>B>C>D$ 。以 D 因素为误差项进行方差分析,结果 A 因素对没食子酸的提取影响明显,确定最优提取方案为 A2B1C2D1,即古方乌发膏分离除杂的最佳工艺为:料液比 1:4,加入乙醇使含乙醇量达到 60%,静置 4 h 去除沉淀。

5.3 验证试验

为保证所筛选醇沉工艺的稳定性,对此进行验证,结果见表 2-23。

表 2-23 验证试验结果

试验号	没食子酸含量 (mg/g)
1	13.3124
2	12.9315
3	13.3269
平均	13.1903
RSD %	1.70%

由上述结果可知,没食子酸平均含量为 13.1903 mg/g, RSD 为 1.70%,表明所筛选的除杂工艺稳定可行。

6 浓缩工艺研究

平行提取 3 份古方乌发膏,水提液初步减压浓缩 (60℃,真空度 -0.08~0.09Mpa) 至 500 mL,经醇沉后,减压浓缩 (60℃,真空度 -0.08~0.09Mpa) 至相对密度 1.15~1.25 (60℃) 的清膏,回收乙醇,通过测定浓缩前后有效成分

的变化来计算有效成分的保有率。结果见表 2-24。

表 2-24 浓缩前后有效成分含量的变化

试验号	浓缩前没食子酸含量 (mg/g)	浓缩后没食子酸含量 (mg/g)	没食子酸保有 率 (%)
1	13.1248	12.2793	93.56
2	12.9731	11.0284	85.01
3	13.4367	12.4345	92.54
平均保有率		90.37%	

结果表明，浓缩前后有效成分的含量变化没有较大差异，说明该浓缩工艺稳定可行。

7 成型工艺研究

本研究的成型工艺是将水提浓缩液和挥发油组分以及乳膏剂基质乳化制成古方乌发膏剂。

7.1 仪器与试药

7.1.1 仪器

仪器	型号	厂家
高效液相色谱仪	Agilent 1260	美国安捷伦科技有限公司
数控超声波清洗器	KQ-300DE	昆山市超声仪器有限公司
电子天平	FA2004B	上海平轩科学仪器有限公司
	BT-125D	赛多利斯科学仪器北京有限公司
电热鼓风干燥箱	CS101	重庆实验设备厂制造
摇摆式高速中药粉碎机	LK-1000A500g	浙江温岭市创力药材器械厂制造
电热恒温水浴锅	XMTD-4000	北京市永光明医疗仪器有限公司
摩尔基因型超纯水器	1810a	重庆摩尔水处理设备有限公司

7.1.2 试药

试药	厂家
没食子酸对照品（批号：110831-201204）	中国食品药品检定研究院
西青果、诃子等	四川省中药饮片有限责任公司
十六醇	北京化工厂
白凡士林、十二烷基硫酸钠、尼泊金甲酯、	成都科龙化工试剂厂

丙二醇、氮酮

甲醇

美国 Fisher 公司

SPF 级雄性小鼠

成都达硕实验动物有限公司

水为超纯水（实验室自制），其余试剂均为分析纯。

7.2 古方乌发膏基质的相关研究

基质的筛选是乳膏剂研究的核心内容，在处方中不仅是赋形剂，也是药物的载体^[21]，基质种类的选择以及用量比例是影响乳膏剂质量优劣和疗效发挥的关键点。因此，就本方药物性质对乳膏基质配方进行优选，包括水相、油相、乳化剂、表面活性剂、透皮促渗剂等。

7.3 方法与结果

7.3.1 古方乌发膏的制备工艺

称取处方中木香药材饮片，水蒸气蒸馏法提取挥发油，收集挥发油和水溶液，药渣与处方中其他药材粗粉采用动态温浸法进行提取，加 10 倍量水 60℃ 下动态温浸提取两次，每次 3h，过滤得到滤液，滤液合并木香水溶液，浓缩至相对密度为 1.20（60℃），作为乳膏剂的水相。取适量相对密度为 1.20（60℃）的药液，加入一定量的表面活性剂、透皮渗透剂、防腐剂加热至 80℃，缓慢加入加热至相同温度的油相（木香挥发油和油相基质），边加边随一个方向搅动，直到乳化凝结，乳膏即得。

7.3.2 乳膏剂的考察指标

本部分通过综合评分法，将外观性状和小鼠真皮层内所含没食子酸含量为指标。大多数情况下透皮吸收性试验均使用扩散池法，研究目的是有效成份吸收入血的程度，而本试验以真皮层没食子酸的含量为指标，是因为古方乌发膏为外用制剂，主要作用于头皮层。通常毛囊根部的毛乳头提供头皮营养，并加速黑色素颗粒合成，当黑色素颗粒在毛囊内产生形成障碍，不能够及时传入毛发中，从而头发变白，本方旨在促进皮层血液循环，促进黑色素生成，使有效成分作用于毛囊，从而长出黑发，故头皮的真皮层为主要作用部位。所以选择以下实验方法测定真皮层没食子酸的含量。

外观评价^[22]：把外观性状分为四个级别：外观光滑细腻、富有光泽、没有砂砾感、容易涂布，评分 100；外观光滑细腻、富有光泽、没有砂砾感、涂布情

况情况一般，评分 80；外观光滑细腻、没有明显光泽、有些许砂砾感、些许油腻感，评分 60；外观光滑细腻、没有明显光泽、有些许砂砾感、油腻感严重，评分 40。可根据实验对评分进行增减，用以区别质量优劣。

真皮层没食子酸的含量：取实验用小鼠，选择毛量最丰富的背部作为药物作用部位，剪毛，将一定量乳膏均匀涂抹在剪毛部位，分别于 1 h 后将药膏冲洗干净，小鼠托颈处死，分离背部皮肤，用工具小心清除皮下的脂肪组织及粘连物，为清除角质层，可用透明胶带反复粘取皮肤表面^[23]，取单位面积的皮肤组织，经组织破碎器破碎后 5 mL50% 甲醇超声，滤过，滤液经 0.45 μ m 滤膜滤过后，按照正交试验确定提取工艺项下没食子酸的色谱条件进行 HPLC 测定。

7.3.3 基质种类的确定

油相的筛选：以外观性状为指标，制备乳膏剂，考察硬脂酸、液体石蜡、十六醇^[21、24、25]，结果见表 2-24。

表 2-24 不同油相乳膏的评分

试验号	油相	外观评分
1	硬脂酸	64
2	液体石蜡	58
3	十六醇	80

促皮渗透剂的筛选：以单位面积小鼠真皮层没食子酸的含量考察氮酮与丙二醇、氮酮、丙二醇^[26-28]，结果见表 2-25。

表 2-25 不同油相乳膏的评分

试验号	油相	没食子酸含量/ μ g
1	丙二醇	9.57
2	氮酮	8.48
3	丙二醇与氮酮	13.49

结合实验室条件和从经济角度考虑，本处方选择十二烷基硫酸钠作为乳化剂，尼泊金甲酯作为防腐剂，因白凡士林可与大多数药物配伍且能调节基质的稠度，故将白凡士林与十六醇合用，古方乌发膏的基质组成如下：白凡士林、十六醇、十二烷基硫酸钠、丙二醇、氮酮、尼泊金甲酯。

7.3.4 响应面法优选古方乌发膏的基质组成

单因素试验对基质处方中十六醇、十二烷基硫酸钠的用量，促渗剂丙二醇和氮酮的用量比进行考察，其中外观性状作为筛选十六醇、十二烷基硫酸钠用量的

评价指标,鼠皮真皮层中没食子酸的含量作为筛选促渗剂丙二醇、氮酮用量比的评价指标。为确定成型工艺,现采用响应面筛选乳膏剂的基质组成,该试验采用多指标综合评分法,其中外观性状和没食子酸的含量二者的权重系数分别为0.2、0.8,总分10分。

7.3.4.1 单因素试验考察

经过前期实验,根据古方乌发膏的综合评分,固定相对密度1.20(60℃)的提取液用量是30 mL,丙二醇和氮酮总和为处方的4%。

十六醇、十二烷基硫酸钠的用量:根据固定处方,其中丙二醇2%、氮酮2%、十二烷基硫酸钠1 g,十六醇分别为15、20、25 g,按照7.2项下制备3份乳膏,经多人多次评价,乳膏的外观评分分别为75、90、85,故选择20 g作为十六醇的用量。同样固定十六醇用量20 g,其他不变,十二烷基硫酸钠的用量分别为0.5、1、1.5 g,按照上述操作,发现乳膏剂的外观性状评分随着十二烷基硫酸钠用量的增加先增后降,因此选择十二烷基硫酸钠的用量为1 g。

促渗剂丙二醇和氮酮的用量比:依据处方量,其中十二烷基硫酸钠1 g,十六醇20 g,丙二醇和氮酮的用量比分别为1.5:2.5、2:2、2.5:1.5,按照7.3.1项下制备3份乳膏,取3只实验用小鼠,按照没食子酸含量测定项下进行操作,测得单位面积鼠皮真皮层中没食子酸的含量分别为23.63、26.25、15.60 μg ,故选择丙二醇和氮酮的用量比为2:2。

7.3.4.2 响应面实验优化最佳基质处方^[29]

在单因素实验的基础之上,选择十六醇、十二烷基硫酸钠、丙二醇和氮酮的用量比为自变量,综合评分R作为因变量,进行Box-Behnken设计^[30]。根据上述试验方法制作17份乳膏,进行外观评价和没食子酸含量测定,试验设计及结果见表2-26。

表2-26 古方乌发膏基质处方Box-Behnken试验分析

No.	A 十六醇 /g	B 十二烷基 硫酸钠/g	C 丙二醇、 氮酮用量比	外观性状 评分/分	没食子酸 含量/ μg	R 综合 评分/分
1	20	1.5	1.4	67	19.59	7.26
2	25	0.5	1	62	13.81	5.43
3	15	0.5	1	75	17.87	6.92
4	15	1.5	1	80	18.75	7.28
5	20	1	1	79	19.18	7.39

6	20	0.5	1.4	96	21.32	8.38
7	20	1	1	83	15.13	6.26
8	15	1	0.6	53	26.73	9.1
9	20	1	1	67	19.29	7.17
10	25	1	1.4	83	22.25	8.39
11	20	1	1	64	14.7	5.73
12	15	1	1.4	67	23.68	8.48
13	20	1	1	92	21.28	8.29
14	25	1.5	1	60	23.41	8.26
15	20	0.5	0.6	68	17.05	6.51
16	20	1	1.4	86	15.74	6.5
17	20	1.5	1.4	70	15.65	6.14

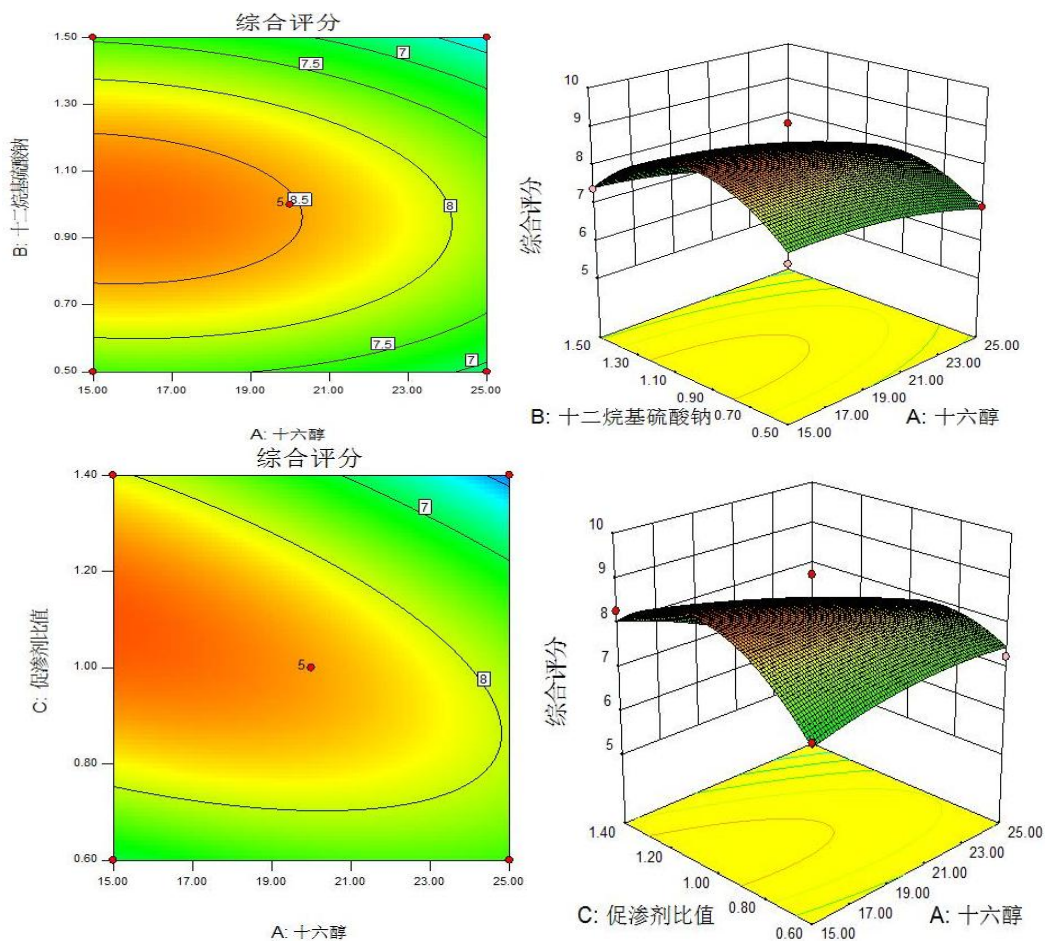
通过 Design-Expert 软件对试验结果进行响应面分析,得到多元二次回归式:
 $Y=0.6641A+11.363B+21.4875C-0.052AB-0.33125AC-0.5875BC-9.34\times 10^{-3}A^2-5.054B^2-7.35C^2-1.3218$ ($r=0.9590$), 说明该模型能解释 95.9%的响应值变化, 回归方程拟合较好, 对试验结果进行分析可靠。对回归方程进行方差分析, A、AC、 B^2 、 C^2 对综合评分影响极显著; 三个自变量对乳膏的综合评分的影响程度为 $A>B>C$ 。由模型项 $P=0.0005<0.05$, 可知该模型显著, 失拟项 $P=0.0005>0.05$, 影响不显著, 表明该回归模型的拟合情况良好, 回归方程的代表性较好, 误差主要为随机误差, 能准确预测实际情况, 方差分析见表 2-27。

表 2-27 响应面模型方差分析

方差来源	<i>SS</i>	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	17.92	9	1.99	18.18	0.0005
A	1.72	1	1.72	15.71	0.0054
B	0.28	1	0.28	2.53	0.1555
C	0.23	1	0.23	2.11	0.1896
AB	0.068	1	0.068	0.62	0.4578
AC	1.76	1	1.76	16.03	0.0052
BC	0.055	1	0.055	0.5	0.5006
A^2	0.23	1	0.23	2.1	0.1909
B^2	6.72	1	6.72	61.37	0.0001
C^2	5.82	1	5.82	53.17	0.0002
残差	0.77	7	0.11		
失拟项	0.32	3	0.11	0.98	0.4863

纯误差	0.44	4	0.11
总和	18.69	16	

由模拟方程绘制响应面等高图和 3D 图，见图 2-7。由图可知，当十六醇的用量固定时，随着十二烷基硫酸钠的增加，乳膏的综合评分呈现先增加后骤减，变化幅度不大，两因素交互作用不显著；另外十六醇用量固定，随着促渗剂丙二醇和氮酮二者比值的增加，乳膏的综合评分先增后减，但变化程度较大，根据等高线为椭圆形，说明两因素交互作用显著；当十二烷基硫酸钠用量固定，随着促渗剂用量比的增加，乳膏的综合评分先增后减，根据等高线为圆形，说明两因素交互作用不显著。



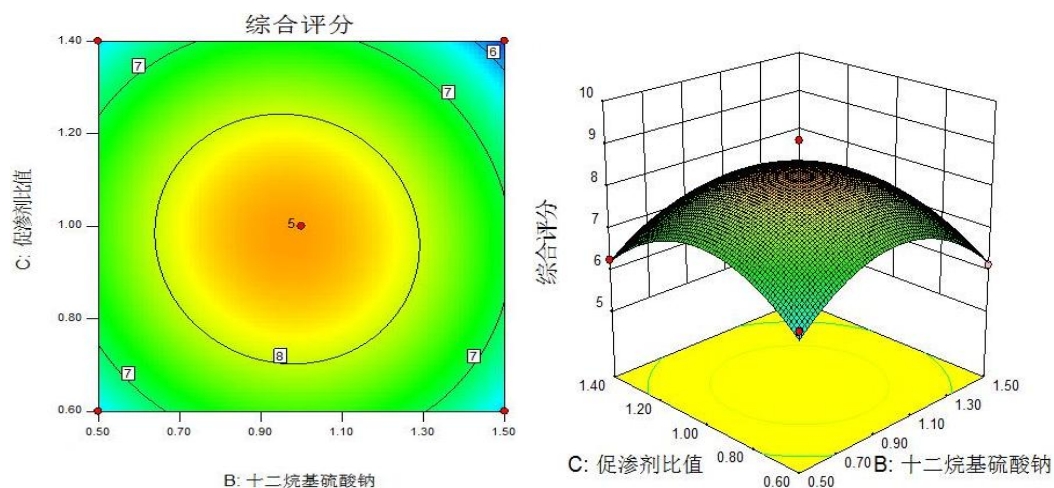


图 2-7 十六醇、十二烷基硫酸钠、丙二醇和氮酮的用量比对乳膏质量影响的响应面图

通过响应面法优化，得到古方乌发膏最佳基质处方为十六醇 20g、十二烷基硫酸钠 0.5g、丙二醇和氮酮的比值为 0.6，即丙二醇 1.5%、氮酮 2.5%。

7.3.4.3 验证试验

为保证所筛选基质的稳定性，依据最佳基质组成，以单位面积鼠皮真皮层中没食子酸的含量和外观性状的总能够和评分对此进行验证，结果见表 2-28。

表 2-28 验证试验结果

试验号	外观性状评分/分	没食子酸含量/ μg	R 综合评分/分
1	94	19.59	9.92
2	93	18.81	9.58
3	98	18.97	9.75
平均	95.00	19.12	9.75

由上述结果可知，按照筛选的基质处方制备的乳膏剂外观性状良好，透皮渗透性稳定，综合评分高，表明该处方的基质组成和制备工艺稳定可行。

8 古方乌发膏制剂处方及工艺流程图

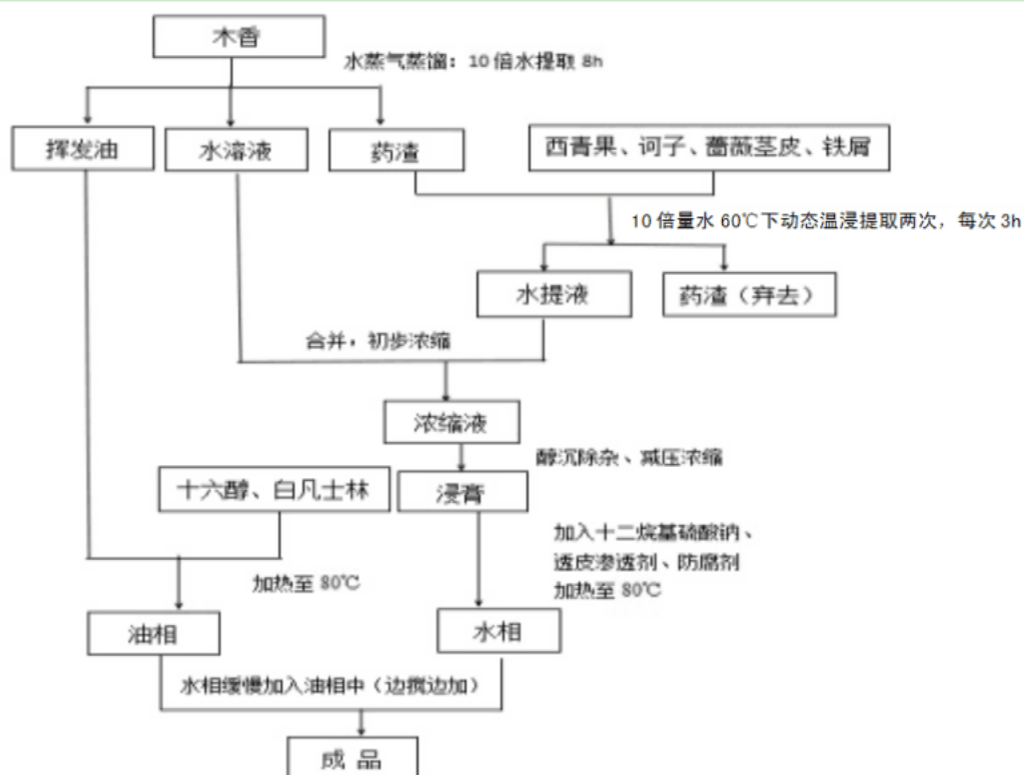
8.1 制剂处方

西青果	300g	十六醇	333.3g
诃子	300g	白凡士林	166.7g
木香	300g	十二烷基硫酸钠	8.3g
蔷薇茎皮	300g	丙二醇	15ml
铁屑	0.028g	氮酮	25ml
尼泊金甲酯	0.5g		

制成 1000g 乳膏

称取处方中木香饮片加 10 倍量水，浸泡 1h 后，水蒸气蒸馏 8 h，收集挥发油，保留水溶液和药渣，药渣与西青果、诃子、蔷薇茎皮、铁屑粗粉 10 倍量水 60℃ 下动态温浸提取两次，每次 3h，过滤得到滤液，滤液合并水溶液经减压浓缩至料液比 1:4，加入 95% 的乙醇使浓度至 60%，静置 4h 后，过滤，滤液再减压浓缩至相对密度为 1.20（60℃），作为乳膏剂的水相，加入十二烷基硫酸钠、丙二醇、氮酮、尼泊金甲酯加热至 80℃，缓慢加入加热至相同温度的油相（挥发油、十六醇、白凡士林），边加边随一个方向搅动，直到乳化凝结，乳膏即得。

8.2 制备工艺流程图



9 中试研究

9.1 中试样品制备工艺验证

将处方扩大 10 倍，按照上文所述操作制备工艺，制备 3 批古方乌发膏中试样品，结果表明，三批成品率均大于 95%，说明该制备工艺稳定可行，见表 2-29。

表 2-29 中试样品制备结果

	批号		
	160101	160102	160103
投料量/Kg	12	12	12

浸膏量/Kg	4.82	4.79	4.75
挥发油量/mL	27.7	26.8	29.2
十六醇量/g	3213.6	3195.2	3168.9
白凡士林量/g	1606.8	1597.6	1584.5
十二烷基硫酸钠量/g	80.3	79.9	79.2
促皮渗透剂/mL	40	40	40
防腐剂量/g	5	5	5
理论产量/g	10000	10000	10000
实际产量/g	9670	9610	9520
成品率/%	96.7	96.1	95.2

9.2 中试样品质量检查

对三批样品进行检查，结果见表 2-30，表明该工艺条件稳定可行。

表 2-30 中试样品检查结果

批号		160101	160102	160103
性状		本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏
薄层鉴别	应检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点
	应检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯
	应检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸
检查	铁盐含量 $\leq 105.00 \mu\text{g/g}$	85.07	85.37	85.48
	重金属含量 $< 20\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定
	砷盐含量 $< 4\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定
	pH 值	6.83	6.84	6.85
微生物限度	需氧菌总数 $\leq 100\text{cfu/g}$	30	20	20
	霉菌和酵母菌数 $\leq 10\text{cfu/g}$	< 10	< 10	< 10
	不得检出金黄色葡萄球菌	未检出	未检出	未检出
	不得检出铜绿假单胞菌	未检出	未检出	未检出
特征图谱	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
含量测定	每克含木香烃内酯、去氢木香内酯总量 mg	5.2461	5.2645	5.2654
	每克含没食子酸含量 mg	5.1824	5.1625	5.1629

参考文献:

- [1]朱其买古丽·阿沙木,米丽班·霍加艾合买提,阿吾提·艾买尔,等.野蔷薇果皮多酚的提取与抗氧化和抑菌作用研究[J].华中师范大学学报(自然科学版),2014,48(6):850-855.
- [2]古丽美克热依·吐尼亚孜,古力齐曼·阿布力孜,努尔皮达·阿卜拉江,等.响应面法优化新疆野蔷薇根中总鞣质的提取工艺[J].新疆师范大学学报(自然科学版),2015,34(4):11-17.
- [3]朱磊,侯莹莹.对中药材中鞣质的研究[J].内蒙古中医药,2012,22:104-105.
- [4]冯卫生.鞣质类化合物的生物活性研究进展[J].中国医药情报,1996,2(4):220.
- [5]杜国成.中药鞣质成分的药理作用探析[J].中国医药科学,2011,1(16):2.
- [6]石碧,狄炎.鞣质的药理活性[J].中草药,1998,29(7):487.
- [7]王瑞斌,薛成虎.国内鞣质生理活性研究进展[J].榆林学院学报,2010,20(2):47-49.
- [8]王宗伟.植物鞣质的药理作用及结构特征[J].国外医学中医中药分册,1997,19(2):22.
- [9]吴谦,金哲雄.药用植物中鞣质的生理活性[J].黑龙江医药,1995,8(4):236.
- [10]钟振国,梁红,钟益宁,等.余甘子叶提取成分没食子酸的体外抗肿瘤实验研究[J].时珍国医国药,2001,20(8):1954-1955.
- [11]李肖玲,崔岚,祝德秋,等.没食子酸生物学作用的研究进展[J].中国药师,2004,7(10):767-769.
- [12]高雅,李骅,王四旺,等.没食子酸的药理作用及药物代谢动力学研究进展[J].西北药学杂志,2014,29(4):435-438.
- [13]魏华,彭勇,马国需,等.木香有效成分及药理作用研究进展[J].中草药,2012,43(3):613-620.
- [14]钱伟,徐溢,王昌瑞,等.木香药材活性成分及其结构修饰研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24:1857-1865,1874.
- [15]张丽,冯锋,柳文媛,等.HPLC法测定不同产地虎耳草中没食子酸、原儿茶酸和虎耳草素的含量[J].西北药学杂志,2011,26(2):88-90.
- [16]李骅,谢艳华,张邦乐,等.RP-HPLC法同时测定双丹口服液中没食子酸、丹参素和原儿茶醛的含量[J].中国医药导报,2012,9(5):117-122.
- [17]国家药典委员会.中国药典2015年版[S].一部.北京:中国中医药出版社,2015.
- [18]常丽敏.诃子四柱散中没食子酸的含量测定[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(11):12-13.
- [19]郭增军,孙启,龙丽辉,等.九牛造中总鞣质提取方法和没食子酸含量测定研究[J].中药材,2007,30(11):1398-1401.
- [20]赵小霞,邱丽君,李存保,等.蒙药金诃子低温提取物鞣质成分和含量的测定[J].现代中药研究与实践,2015,29(4):27-30.
- [21]邱洪,唐旭东,代兵强,等.复方冰甲乳膏的配方与制剂工艺研究[J].中国药房,2015,26(22):3134-3136.
- [22]梁健钦,邓家刚,吴玉强,等.芒果苷乳膏制备工艺的研究[J].华西药学杂志,2012,27(2):165-167.
- [23]李楠.阻滞剂在皮肤局部给药系统中的效果评价[D].天津:天津大学,2012.
- [24]聂阳,廖玮,姚万龙,等.复方痘座清乳膏的处方优化及药理作用研究[J].中成药,2014,36(5):1056-1059.
- [25]丁志军,许时贵,罗美兰,等.复方维生素E乳膏制备工艺改进[J].中国医药工业杂志,2016,47(2):188-191.
- [26]黄秋霞,潘超,国大亮,等.不同促渗剂对京万红中没食子酸透皮吸收的影响[J].天津中医药,2013,30(4):242-244.
- [27]黄晓晨,宿树兰,钱大伟.不同促渗剂对少腹逐瘀方外用贴剂中效应成分群体外透皮吸收的影响[J].中草药,2014,45(21):3074-3080.
- [28]范彬,石晓峰,李爽,等.不同透皮促进剂对祖师麻体外透皮吸收的影响[J].中成药,2014,36(3):631-634.
- [29]田昊,包海鹰,图力古尔,等.响应面法优化祛风止痛膏基质组方及其皮肤安全性试验[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(23):1-6.
- [30]杨俊,徐应淑,徐小婷,等.应用Box-Behnken设计优选虎耳草软膏剂成型工艺[J].遵义医学院学报,2016,39(1):81-84.

第三章 蔷薇茎皮的质量标准

1 仪器与试药

仪器与试药	型号	厂家
高效液相色谱仪	Agilent 1260	美国安捷伦科技有限公司
数控超声波清洗器	KQ-300DE	昆山市超声仪器有限公司
电子天平	FA2004B	上海平轩科学仪器有限公司
	BT-125D	赛多利斯科学仪器北京有限公司
电热鼓风干燥箱	CS101	重庆实验设备厂制造
摇摆式高速中药粉碎机	LK-1000A500g	浙江温岭市创力药材器械厂制造
电热恒温水浴锅	XMTD-4000	北京市永光明医疗仪器有限公司
摩尔基因型超纯水器	1810a	重庆摩尔水处理设备有限公司
试药：蔷薇茎皮；其他试剂均为成都科龙化工试剂厂产。		

2 鉴别

2.1 性状鉴别

取蔷薇科植物野蔷薇 (*Rosa multiflora*) 的干燥茎皮，于夏、秋两季剥取，晒干或低温干燥，见皮片向内弯曲至两侧，呈管状或筒状，厚 0.5-1.5mm。外表面灰绿色或灰褐色，粗糙，带刺。内表面呈同样颜色，较外表面平滑。体轻，质软，不易折断，断面不平坦，有纤维状物或刺状物突出。气微，味苦。

2.2 显微鉴别

将不同产地的蔷薇茎皮药材置粉碎机中粉碎过 4 号筛，分别取少量粉末置载玻片上，加水合氯醛透化后加甘油 1 滴，盖上载玻片，置显微镜下观察。茎皮横切面：木栓层由多列细胞组成，皮层散有石细胞群，韧皮纤维众多，单个散在或数个相连，薄壁细胞中含有多数淀粉粒，另含草酸钙砂晶。粉末：呈棕褐色。石细胞众多；木栓细胞呈多角形壁稍厚；淀粉粒众多，单粒呈类球形或多面形，复粒由多个复形成；可见少数草酸钙砂晶，见图 3-1。

2.3 薄层鉴别

对照品溶液的制备：取熊果酸对照品 1mg，加无水乙醇制成每 1 ml 含 1mg

的熊果酸对照品溶液。

供试品溶液的制备：取本品粉末 1g，加无水乙醇 20 mL，超声处理 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣加无水乙醇 5mL 使溶解，作为供试品溶液。

薄层层析条件：硅胶 G 薄层板（0.4%CMC-Na 的水溶液为黏合剂）。

点样量：对照品溶液、对照药材和供试品溶液各 5 μ L。

展开剂：甲苯-乙酸乙酯-甲酸（20:4:0.5），展开前饱和 15min。

检视：上行展开，展距 12~14cm，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，105℃加热至斑点显色清晰，分别置日光和紫外光灯光(365 nm)下检视。

结果：供试品色谱与对照品色谱峰相应的位置上，有相同颜色的斑点，并且斑点显色清晰，Rf 值适中，故收入标准，见图 3-2。

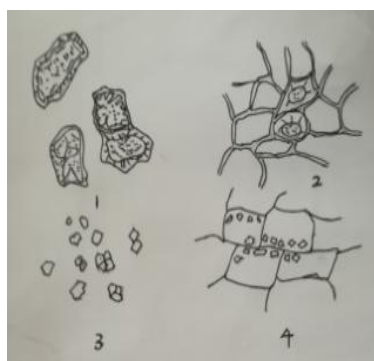


图 3-1 蔷薇茎皮粉末显微鉴别图

- 1、石细胞 2、木栓细胞 3、淀粉粒
4、草酸钙砂晶



图 3-2 蔷薇茎皮 TLC 薄层鉴别图

- 1、熊果酸 2、3、4、供试品

3 检查

3.1 水分

分别取不同产地的蔷薇茎皮粉末约 2.0g，精密称定，参考《中国药典》2015 年版通则 0832 第二法进行测定。

3.2 灰分

分别取不同产地的蔷薇茎皮粉末约 3.5g，精密称定，参照《中国药典》2015 年版通则 2302 进行测定。

3.3 酸不溶性成分

分别取不同产地的蔷薇茎皮约 4.0g，精密称定，参照《中国药典》2015 年版通则 2302 进行测定。

3.4 测定结果

根据测定结果和地方标准，暂定水分 $\leq 11.0\%$ ，总灰分 $\leq 11\%$ ，酸不溶性成分 $\leq 3.0\%$ ，结果见表 3-1。

表 3-1 不同产地蔷薇茎皮水分、灰分、浸出物测定结果

产地	水分/%	总灰分/%	醇不溶性成分/%
四川	9.09	10.23	2.15
四川	10.31	10.94	2.53
四川	9.94	10.55	2.67
江苏	10.35	8.94	2.36
江苏	10.07	9.28	2.83
江苏	10/86	9.75	2.78
河南	9.94	10.43	2.55
河南	8.68	9.85	2.03
河南	8.49	10.16	2.68

第四章 质量标准研究

1 仪器与试药

1.1 仪器

仪器	型号	厂家
高效液相色谱仪	Agilent 1260	美国安捷伦科技有限公司
数控超声波清洗器	KQ-300DE	昆山市超声仪器有限公司
电子天平	FA2004B	上海平轩科学仪器有限公司
	BT-125D	赛多利斯科学仪器北京有限公司
循环水式真空泵	SHZ-D(III)	Marni 仪器
薄层色谱成像系统	Goodlook-1000	上海科哲
电热鼓风干燥箱	CS101	重庆实验设备厂制造
电热恒温水浴锅	XMTD-4000	北京市永光明医疗仪器有限公司
摩尔基因型超纯水器	1810a	重庆摩尔水处理设备有限公司

1.2 试药

对照品/药材	批号	药品来源
没食子酸对照品(GA)	110831-201204	中国食品药品检定研究院
木香烃内酯对照品	111524-201208	中国食品药品检定研究院
去氢木香内酯对照品	111525-201209	中国食品药品检定研究院
熊果酸对照品	110742-201220	中国食品药品检定研究院
诃子对照药材	121015-201004	中国食品药品检定研究院
古方乌发膏	160101,160102,160103	自制
甲醇	色谱级	美国 Fisher 公司
乙腈	色谱级	天津科密欧化学试剂有限公司
水为超纯水(实验室自制), 其余试剂均为分析纯		

2 饮片的来源及质量标准

本方中的西青果为使君子科植物诃子(*Terminalia chebula Retz.*)的干燥幼果。符合 2015 版《中国药典》一部 130 页饮片项下的规定, 含没食子酸 1.78%, 该品呈长卵形; 紫外灯下, 供试品与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点。

本方中的诃子为使君子科植物诃子(*Terminalia chebula Retz.*)的干燥成熟果实。符合 2015 版《中国药典》一部 187 页饮片项下的规定, 含没食子酸 1.54%, 该本品呈长圆形或卵圆形; 紫外灯下, 供试品与对照药材色谱相应位置显相同颜

色的斑点。

本方中的木香为菊科植物木香 (*Aucklandia lappa* Decne) 的干燥根。符合 2015 版《中国药典》一部 62 页饮片项下的规定, 该品呈类圆形或不规则厚片, 经检测木香烃内酯和去氢木香内酯的总量为 3.47%。

本方中的蔷薇茎皮为蔷薇科植物野蔷薇 (*Rosa multiflora*) 的茎皮。符合自拟蔷薇茎皮质量标准项下的规定。

3 成品质量标准

3.1 名称

古方乌发膏 汉语拼音: Gufang Wufagao。

3.2 性状

本品为银灰色乳膏剂, 气微香。

3.3 薄层鉴别

3.3.1 诃子、西青果的薄层鉴别

供试品溶液的制备: 称取古方乌发膏 10 g 于圆底烧瓶中, 加入 4 mol/L 盐酸溶液 100 mL, 称定重量, 水浴加热 3.5 小时, 放冷, 补重, 滤过。滤液蒸干, 加甲醇定容至 5ml, 即得供试品溶液。

对照药材溶液的制备: 取诃子对照药材粉末 0.5g, 加无水乙醇 30ml, 加热回流 30 分钟, 滤过, 滤液蒸干, 残渣用甲醇 5ml 溶解, 加在中性氧化铝柱 (100~200 目, 5g, 内径为 2cm) 上, 用稀乙醇 50ml 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用水 5ml 溶解后通过 C18 固相萃取小柱, 以 30% 甲醇 10ml 洗脱, 弃去 30% 甲醇溶液, 再用甲醇 10ml 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。

阴性对照溶液的制备: 取缺诃子、西青果的古方乌发膏, 按照供试品溶液制备方法进行制备, 即得阴性对照溶液。

薄层层析条件: 硅胶 G 薄层板 (0.3% CMC-Na 的水溶液为黏合剂)。

点样量: 对照药材溶液、供试品溶液各 4 μ L。

展开剂: I 甲苯-冰醋酸-水 (12: 10: 0.4)

II 氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (8: 18: 5: 5)

检视:展开剂 I 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰。展开剂 II 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 热风吹至斑点显色清晰。

结果:供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

其中展开剂 I 更好, 斑点显色清晰, Rf 值适中, 用以验证三批样品重现性好, 故收入标准, 见附图 4-1、4-2。

3.3.2 木香的薄层鉴别

供试品溶液的制备: 称取古方乌发膏 10 g 于圆底烧瓶中, 加入 4 mol/L 盐酸溶液 100 mL, 称定重量, 水浴加热 3.5 小时, 放冷, 补重, 滤过。滤液蒸干, 加甲醇定容至 5ml, 即得供试品溶液。

对照品溶液的制备: 取去氢木香内酯对照品、木香烃内酯对照品, 加甲醇分别制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。

阴性对照溶液的制备: 取缺木香的古方乌发膏, 按供试品溶液的制备方法制成木香阴性对照溶液。

薄层层析条件: 硅胶 G 薄层板 (0.4% CMC-Na 的水溶液为黏合剂)。

点样量: 对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液液各 5 μ L。

展开剂: I 环己烷-甲酸乙酯-甲酸 (15:5:1) 的上层溶液为展开剂

II 环己烷-丙酮 (10:3)

检视: 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰。

结果: 供试品色谱与对照药材和对照品色谱峰相应的位置上, 有相同颜色的斑点, 而阴性对照液色谱中没有相应斑点。其中展开剂 I 更好, 斑点显色清晰, Rf 值适中, 用以验证三批样品重现性好, 故收入标准, 见附图 4-3、4-4。

3.3.3 蔷薇茎皮的薄层鉴别

供试品溶液的制备: 称取古方乌发膏 10 g 于圆底烧瓶中, 加入 4 mol/L 盐酸溶液 100 mL, 称定重量, 水浴加热 3.5 小时, 放冷, 补重, 滤过。滤液蒸干, 加无水乙醇定容至 5ml, 即得供试品溶液。

对照品溶液的制备: 取熊果酸对照品\对照品适量, 加无水乙醇制成每 1 ml 含 1mg 的熊果酸对照品溶液。

阴性对照溶液的制备: 取缺蔷薇茎皮的古方乌发膏, 按供试品溶液的制备方法制成蔷薇茎皮阴性对照溶液。

薄层层析条件：硅胶 G 薄层板（0.4%CMC-Na 的水溶液为黏合剂）。

点样量：对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液液各 5 μ L。

展开剂：I 甲苯-乙酸乙酯-甲酸（20:4:0.5）

II 环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸（20:5:8:0.5）

检视：喷以 10%硫酸乙醇溶液，105℃加热至斑点显色清晰，置日光下检视。

结果：供试品色谱与对照品色谱峰相应的位置上，有相同颜色的斑点，而阴性对照液色谱中没有相应斑点。其中展开剂 I 更好，斑点显色清晰，Rf 值适中，用以验证三批样品重现性好，故收入标准，见附图 4-5、4-6。

3.4 检查

3.4.1 装量差异检查

每批次古方乌发膏（批号为 160101、160102、160103）取 3 个，参照《中国药典》2015 版四部乳膏剂最低装量检查法（通则 0942）项下检查，应符合药典规定，结果见表 4-1。

表 4-1 装量差异检查

批号	160101	160102	160103
要求（每个容器装量不少于标示装量的 97%）	符合规定	符合规定	符合规定

3.4.2 铁盐检查

取本品 1.0g，精密称定，加水溶解使呈 25 mL，按照《中国药典》2015 年版四部通则 0807 铁盐检查法进行检查，三批中试样品所含铁盐（以硫酸亚铁计）平均为 85.31 μ g/g，结果见表 4-2，以该数值的 120%为上限值，设定古方乌发膏的铁盐含量最高不得超过 102.00 μ g/g。

表 4-2 铁盐含量检查

批号	160101	160102	160103
铁盐含量 μ g/g	85.07	85.37	85.48
平均值 μ g/g	85.31		

3.4.3 重金属检查

取本品 0.5g，精密称定，缓缓炽灼至完全炭化，放冷，加硫酸 1mL，低温挥去硫酸，放冷，加硝酸 0.5ml 加热使氧化氮除尽，于 560℃左右灼烧 5 小时使完全灰化，取出，放冷，加盐酸 2ml，水浴蒸干，加水 15ml，滴加酚酞 1 滴，

再加氨试液至显中性，加入醋酸盐缓冲溶液（pH3.5）2ml，微热溶解，玻砂漏斗滤过，收集滤液于钠氏比色管中，加水稀释至 25ml。另取标准铅溶液 1ml、2ml、3ml，按照《中国药典》2015 年版四部通则 0821 重金属检查法项下第二法进行检查，三批中试样品所含重金属 < 10ppm，故规定样品中重金属含量应 < 20ppm。

3.4.4 砷盐检查

分别取本品 0.5g，加无水氢氧化钙 1.0g，加水少许，干燥后，先用小火灼烧使炭化，再在 600℃ 左右炽灼使完全灰化，放冷，加盐酸 5ml 与水 23ml，依照《中国药典》2015 年版四部通则 0822 砷盐检查法项下古蔡氏法进行检查，经检查取样 0.5g，砷盐含量 < 2ppm。故规定三批中试样品所含砷盐 < 4ppm。

3.4.5 pH 值测定

参照洗发膏标准 GB/T 29679-2013，对本乳膏剂进行 pH 值测定，取 1g 样品加入 10ml 纯水中，搅拌均匀，过滤^[1-2]，使用 pH 计按照《中国药典》2015 年版四部通则 0631 项下 pH 值测定法进行测定，三批中试样品结果见表 4-3，故规定该乳膏剂的 pH 在 6.0-8.0 之间。

表 4-3 pH 值测定结果

批号	160101	160102	160103
pH 值	6.83	6.84	6.85
平均值	6.84		

3.4.6 微生物限度检查

参照《中国药典》2015 版四部，照非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法（通则 1105）、控制菌检查法（通则 1106）及非无菌药品微生物限度标准（通则 1107）检查，结果见表 4-4。

表 4-4 微生物限度检查结果

检查项目	标准规定	160101	160102	160103
需氧菌总数（cfu/g）	≤100	30	20	20
霉菌数、酵母菌数（cfu/g）	≤10	<10	<10	<10
金黄色葡萄球菌	不得检出	未检出	未检出	未检出
铜绿假单胞菌	不得检出	未检出	未检出	未检出

结果可知，3 批样品古方乌发膏均符合微生物限度要求，方法稳定可靠。

3.5 古方乌发膏的指纹图谱

乌发早白^[3]是一种多见疾病，乌发涂剂用于少年白发，具有明显作用，其追溯于蒙药标准，本试验将其制成古方乌发膏，是为了改善原方不方便性，如剃掉头发。西青果、诃子、木香、蔷薇茎皮、铁屑是古方乌发膏的组成药物，经提取、分离、精制浓缩后制成了乳膏，日前中药制剂通过 TLC 鉴别和含量测定来进行质量控制，而中药指纹图谱是应用较广的一种评价方式^[4-5]，可以提升质量标准，故参照已有对复方中药制剂的研究^[6-8]，本试验通过 HPLC-DAD 法建立古方乌发膏的指纹图谱，对没食子酸、木香烃内酯、去氢木香内酯化合物进行指认，从而为该乳膏剂的质量标准制定提供更全面的参考依据。

3.5.1 方法

3.5.1.1 色谱条件

色谱柱为(Inertsil® ODS-3, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm)，流动相为 0.05% 磷酸的甲醇液 (A) -0.05% 磷酸水溶液 (B)，梯度洗脱(1 ~ 60 min, 10% ~ 100% A; 60 ~ 70 min, 100% A)，检测波长为 220 nm，柱温为 25 $^{\circ}$ C，流速为 1.0 mL/min，进样量为 10 μ L。

3.5.1.2 溶液的制备

3.5.1.2.1 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸、木香烃内酯、去氢木香内酯各对照品适量，加 50% 甲醇溶解分别得到浓度为 0.02、0.107、0.215 mg/mL 的对照品溶液。

3.5.1.2.2 供试品溶液的制备^[9]

精密称取自制古方乌发膏 10 g 于圆底烧瓶中，加入 4 mol/L 盐酸溶液 100 mL，称定重量，水浴加热 3.5 小时，放冷，补重，滤过。精密量取续滤液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加 50% 的甲醇稀释至刻度，摇匀，超声 10 分钟，经微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。

3.5.1.2.3 药材溶液的制备

精密称取各药材适量，按供试品溶液制备项下进行操作，分别得到每 mL 含相当于原药材 0.0258、0.0256、0.0253、0.0251g 的诃子、西青果、木香、蔷薇茎皮药材溶液。

3.5.1.3 方法学考察^[10]

3.5.1.3.1 精密度试验

供试品溶液连续 6 次进样，以没食子酸为参照，计算各共有峰的平均相对保

留时间和平均相对峰面积, 结果各共有峰相对保留时间的 $RSD < 0.9\%$, 相对峰面积的 $RSD < 1.2\%$, 表明本方法精密度良好, 结果见表 4-5。

表 4-5 精密度试验结果

峰号	平均相对保留时间	RSD/%	平均相对峰面积	RSD/%
1	0.411	0.233	0.908	0.255
2	0.688	0.115	1.327	0.176
3 (S)	1	0	1	0
4	1.168	0.060	0.164	0.489
5	1.665	0.113	0.287	0.307
6	2.211	0.213	0.448	0.232
7	2.283	0.108	1.878	0.092
8	2.377	0.062	0.407	0.284
9	2.501	0.831	0.282	0.197
10	2.644	0.059	1.395	0.181
11	2.862	0.074	0.080	1.118
12	3.183	0.113	0.328	0.294
13	5.640	0.071	0.102	0.813
14	5.679	0.057	0.199	0.449
15	5.765	0.126	0.616	0.247
16	6.288	0.337	0.144	0.501
17	6.850	0.065	1.515	0.090

3.5.1.3.2 重复性试验

按照供试品制备方法制备 6 份溶液, 分别测定, 记录结果, 见表 4-6。结果各共有峰相对保留时间的 $RSD < 2.9\%$, 相对峰面积的 $RSD < 1.9\%$, 表明本方法精密度良好。

表 4-6 重复性试验结果

峰号	平均相对保留时间	RSD/%	平均相对峰面积	RSD/%
1	0.410	0.899	0.907	0.132
2	0.694	2.871	1.328	0.245
3 (S)	1	0	1	0
4	1.163	0.681	0.164	0.920
5	1.659	0.624	0.287	0.402
6	2.203	0.753	0.448	0.225
7	2.276	0.602	1.891	1.069

8	2.368	0.672	0.407	0.330
9	2.492	1.461	0.283	0.432
10	2.634	0.667	1.422	1.870
11	2.850	0.651	0.079	1.577
12	3.170	0.642	0.327	0.467
13	5.617	0.674	0.102	0.963
14	5.655	0.665	0.200	0.586
15	5.741	0.693	0.616	0.261
16	6.276	1.097	0.144	0.754
17	6.820	0.653	1.529	0.963

3.5.1.3.3 稳定性试验

取一份供试品溶液，室温下分别于 0，1，2.5，4，6，8，10，12 h 时进行测定，记录色谱图，见表 4-7。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均<1.3%，相对峰面积的 RSD 均 <1.6%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

表 4-7 稳定性试验结果

峰号	平均相对保留时间	RSD/%	平均相对峰面积	RSD/%
1	0.410	0.486	0.908	0.247
2	0.690	1.224	1.327	0.144
3 (S)	1	0	1	0
4	1.166	0.374	0.164	0.701
5	1.663	0.352	0.287	0.538
6	2.207	0.601	0.448	0.379
7	2.280	0.373	1.881	0.121
8	2.374	0.377	0.408	0.438
9	2.499	0.728	0.282	0.222
10	2.640	0.356	1.396	0.267
11	2.857	0.363	0.080	1.576
12	3.179	0.340	0.328	0.271
13	5.633	0.365	0.102	0.476
14	5.670	0.370	0.200	0.448
15	5.762	0.301	0.616	0.392
16	6.283	0.288	0.144	0.830
17	6.841	0.356	1.518	0.144

3.5.2 对照图谱的建立

取 10 批古方乌发膏供试品溶液进行测定，将色谱数据导入“中药色谱指纹图

谱相似度评价系统”(2004A 版)进行匹配,采用多点校正模式,中位数法生成对照图谱,时间窗为 0.10 min,结果 10 批古方乌发膏色谱图见图 4-7,生成的对照图谱见图 4-8。

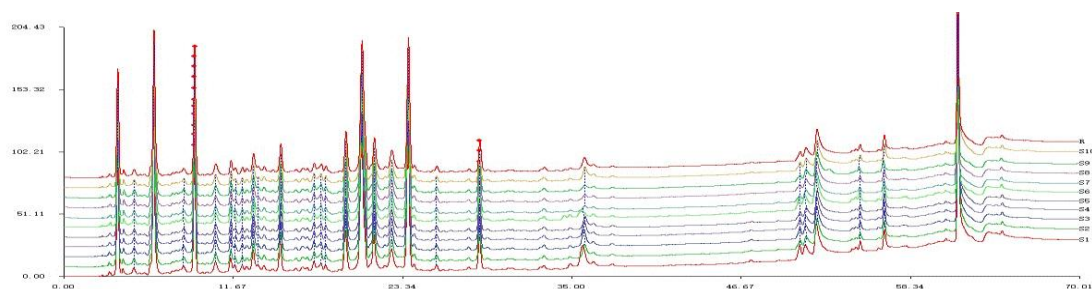


图 4-7 古方乌发膏的指纹谱

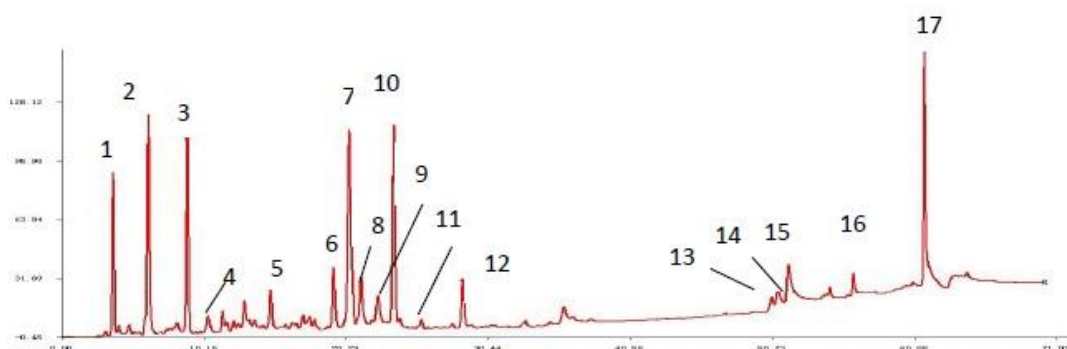


图 4-8 古方乌发膏的对照指纹谱

3.5.3 指纹图谱相似度计算

将 10 批古方乌发膏的指纹图谱导入国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件,将对照指纹图谱的相似度值定为 1,计算各样品图谱与对照图谱的相似度,相似度值详见表 4-8。由相似度评价结果可知,10 批古方乌发膏的相似度均 > 0.9 。

表 4-8 古方乌发膏的相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1	0.991	0.989	0.991	0.987	0.968	0.956	0.956	0.952	0.921	0.962
S2	0.991	1	0.998	0.999	0.994	0.974	0.971	0.971	0.97	0.937	0.977
S3	0.989	0.998	1	0.998	0.992	0.968	0.963	0.963	0.959	0.936	0.969
S4	0.991	0.999	0.998	1	0.994	0.973	0.97	0.969	0.968	0.924	0.976
S5	0.987	0.994	0.992	0.994	1	0.969	0.967	0.966	0.966	0.919	0.973
S6	0.968	0.974	0.968	0.973	0.969	1	0.996	0.996	0.985	0.948	0.995
S7	0.956	0.971	0.963	0.97	0.967	0.996	1	0.999	0.994	0.927	0.999
S8	0.956	0.971	0.963	0.969	0.966	0.996	0.999	1	0.994	0.942	0.999

S9	0.952	0.97	0.959	0.968	0.966	0.985	0.994	0.994	1	0.963	0.997
S10	0.921	0.937	0.936	0.924	0.919	0.948	0.927	0.942	0.963	1	0.974
R	0.962	0.977	0.969	0.976	0.973	0.995	0.999	0.999	0.997	0.974	1

3.5.4 特征指纹图谱分析

对各供试品指纹图谱进行分析,其中没食子酸是整个处方中君药的指标性成分,保留时间适中,峰形、峰面积稳定,和其他峰分离良好,故采用此峰作为参比峰。比较古方乌发膏全方与各药材、对照品溶液的保留时间和谱图,认定色谱峰的来源。本试验选取具代表性的 17 个峰为共有峰,且共有峰的面积占总面积的 90%以上,其中 8 号特征峰出自于诃子,7 号特征峰出自于西青果,16 号特征峰出自于木香,1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 号特征峰为各药材共有峰;3, 13, 14 号峰被分别指认为没食子酸、木香烯内酯、去氢木香内酯。结果说明所建立的古方乌发膏指纹图谱对方中 3 味药材的质量控制有意义,而蔷薇茎皮在该指纹图谱中无体现,可能主要化学成分在该波长下无紫外吸收或响应较低。由结果可知 10 批供试品之间相似度均 >0.9 ,表明该制剂质量较稳定,故暂且规定 >0.9 ,对 17 个共有指纹峰分别进行归属,基本阐明该复方制剂的主要化学组成,该方法的建立可以对古方乌发膏的质量控制提供依据。

3.6 含量测定

本实验采用高效液相法测定制剂中木香烯内酯、去氢木香内酯、没食子酸的含量。在已确定的色谱条件下,各峰分离度良好、阴性无干扰,表明该方法稳定可行,可收入质量标准。

3.6.1 木香烯内酯、去氢木香内酯的含量测定

3.6.1.1 色谱条件

色谱条件及系统适应性试验:色谱柱为(Agilent Eclipse plus C₁₈, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm),流动相为甲醇-水(65:35),流速为 1mL/min,检测波长 225nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,理论塔板数按木香烯内酯峰计算不低于 3000。

3.6.1.2 溶液的制备

对照品溶液的制备:精密称取木香烯内酯、去氢木香内酯对照品各 5.020、5.006 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。分别从中精密量取 1 mL 至 5 mL 容量瓶中,摇匀,即得每 1 mL 各含 0.1004、0.1001 mg 木香烯内酯、去氢木香内酯的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备：称取 2g 自制古方乌发膏，加甲醇 50 mL 超声 30 min，冷却，过滤，滤液用甲醇补足至 50 mL 即得。

阴性溶液制备：自制缺木香的古方乌发膏制剂，按照供试品溶液制备方法处理，即得。

3.6.1.3 方法学考察

专属性试验：取上述对照品、供试品、阴性溶液依照上述色谱条件依次进样，液相色谱图见图 4-10、4-11、4-12。

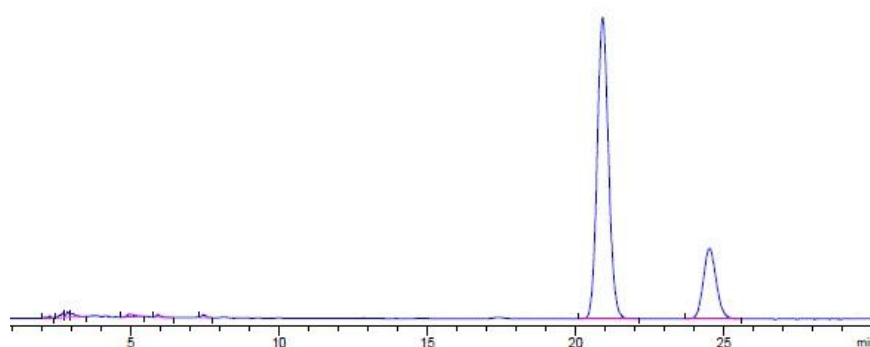


图 4-10 混合对照品溶液的色谱图

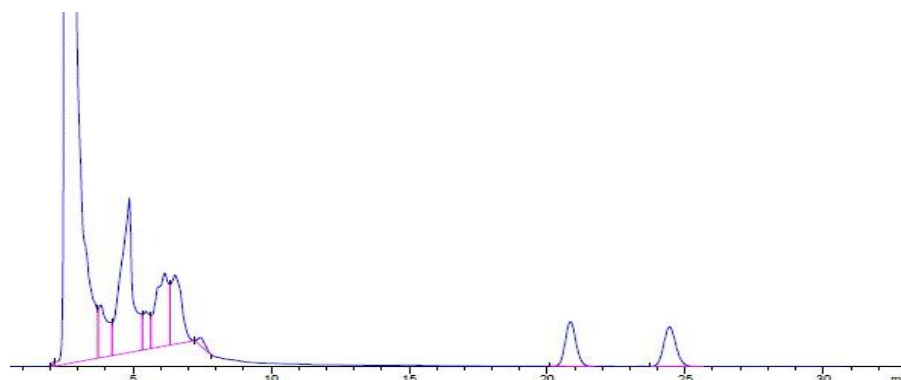


图 4-11 供试品溶液的色谱图

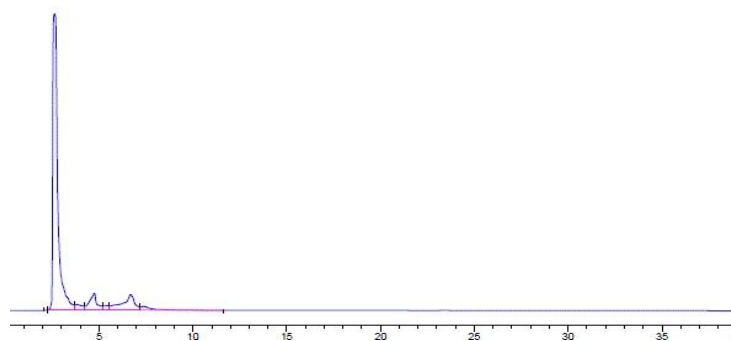


图 4-12 阴性溶液的色谱图

由图可知，木香烯内酯、去氢木香内酯出峰时间分别在 21、24 min 左右，

且两个目标峰的峰形、分离度均良好、无干扰，且阴性溶液相应位置无目标峰，阴性无干扰。

木香烃内酯标准曲线的绘制：分别精密吸取木香烃内酯对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mL，分别置于 5 mL 的容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，得到浓度依次为 0.0201、0.0402、0.0602、0.0803、0.1004、0.2008 mg/mL 的木香烃内酯对照品溶液。依次进样 10 μ L，按照含量测定方法测定，结果见表 4-9。以木香烃内酯对照品的进样量（X）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标，进行线性回归，见图 4-13。

表 4-9 木香烃内酯线性关系的考察

进样量（ μ g）	0.2008	0.4016	0.6024	0.8032	1.0040	2.0080
峰面积	827.02	1686.12	2539.74	3401.81	4244.56	8327.75

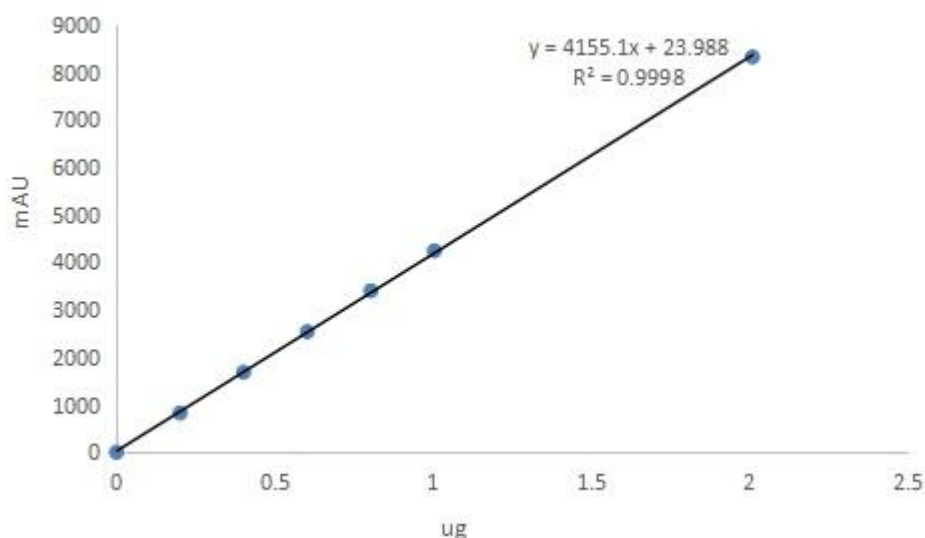


图 4-13 木香烃内酯标准曲线

结果表明：在 0.0201~0.2008 mg/mL 范围内，木香烃内酯内酯的峰面积与其进样量的线性关系良好。

去氢木香内酯标准曲线的绘制：分别精密吸取去氢木香内酯对照品储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mL，分别置于 5 mL 的容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，得到浓度依次为 0.0200、0.0401、0.0601、0.0801、0.1001、0.2003 mg/mL 的去氢木香内酯对照品溶液。依次进样 10 μ L，按照含量测定方法测定，结果见表 4-10。以木香烃内酯对照品的进样量（X）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标，进行线性回归，见图 4-14。

表 4-10 去氢木香内酯线性关系的考察

进样量 (μg)	0.2003	0.4005	0.6008	0.8010	1.0013	2.0026
峰面积	243.12	499.51	734.54	982.05	1257.32	2418.17

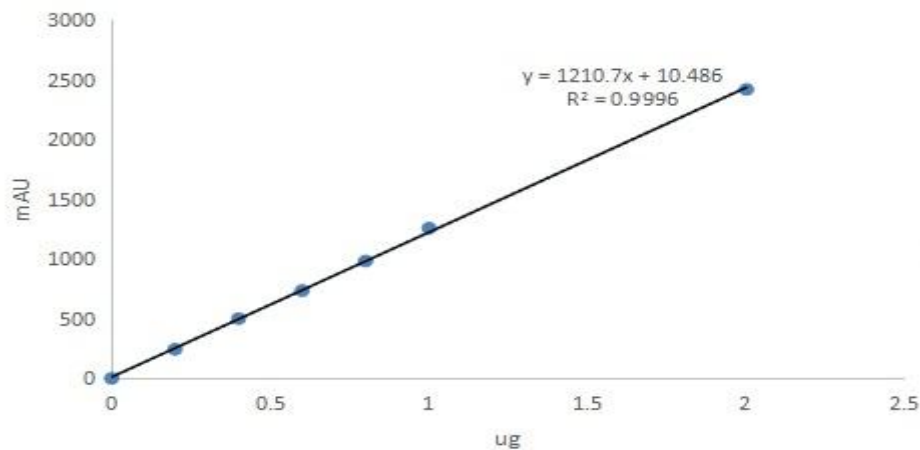


图 4-14 去氢木香内酯标准曲线

结果表明：在 0.0200~0.2003 mg/mL 的范围内，去氢木香内酯的峰面积与其进样量的线性关系良好。

精密度试验：分别吸取 0.1004、0.1001 mg/mL 的木香烃内酯、去氢木香内酯混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL，按照上述方法测其峰面积，连续测定 6 次，结果见表 4-11、4-12，对照品木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积的 *RSD* 值分别为 0.70、0.78%，供试品两者的峰面积的 *RSD* 值分别为 0.30、0.48%，表明仪器精密性良好。

表 4-11 对照品精密度试验

次数	1	2	3	4	5	6	<i>RSD</i> (%)
木香烃内酯峰面积 (mAU)	4245.24	4276.93	4203.54	4265.23	4279.32	4130.35	0.70
去氢木香内酯峰面积 (mAU)	1258.19	1232.41	1241.74	1245.69	1239.34	1254.75	0.78

表 4-12 供试品精密度试验

次数	1	2	3	4	5	6	<i>RSD</i> (%)
木香烃内酯峰面积 (mAU)	1836.44	1845.23	1852.47	1847.45	1849.72	1848.48	0.30
去氢木香内酯峰面积 (mAU)	2027.18	2029.83	2041.14	2019.57	2038.63	2045.84	0.48

重复性试验：取同一批次样品 6 份，按照供试品溶液制备方法进行制备，测

定,结果见表 4-13,木香炔内酯、去氢木香内酯含量的 *RSD* 值分别为 1.67、0.35%,表明该试验重复性良好。

表 4-13 重复性试验

次数	1	2	3	4	5	6	<i>RSD</i> (%)
木香炔内酯含量 (mg/g)	1.1421	1.0975	1.0980	1.0976	1.0966	1.0956	1.67
去氢木香内酯含量 (mg/g)	4.1770	4.1744	4.1695	4.1653	4.1427	4.1472	0.35

稳定性试验:取上述供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 测定其木香炔内酯、去氢木香内酯的含量,结果见表 4-14,计算得供试品中木香炔内酯、去氢木香内酯峰面积 *RSD* 分别为 0.70、0.50%,表明该溶液在 48 h 内稳定。

表 4-14 稳定性试验

时间 (h)	0	2	4	8	12	24	48	<i>RSD</i> (%)
木香炔内酯峰面积 (mAU)	1846.44	1845.25	1852.37	1857.43	1859.42	1845.46	1820.57	0.70
去氢木香内酯峰面积 (mAU)	2030.14	2027.83	2045.19	2039.87	2049.65	2041.84	2021.44	0.50

加样回收试验:按照供试品溶液制备项下称取古方乌发膏 1g 于锥形瓶中,平行制备 9 份,加入 50mL 甲醇,超声处理 30 min,放冷,滤过,每份滤液按照试验要求分别加入相应的木香炔内酯和去氢木香内酯对照品,超声 10 min 即得到样品溶液。经分析,结果见表 4-15、4-16。

表 4-15 木香炔内酯加样回收试验

编号	样品中木香炔内酯含量 mg	加入木香炔内酯含量 mg	木香炔内酯测得量 mg	回收率 %	平均回收率 %	<i>RSD</i> %
1	1.0723	0.8478	1.9221	100.24		
2	1.2632	0.8524	2.1141	99.82		
3	1.0715	0.8535	1.9155	98.89		
4	1.1708	1.0204	2.1653	97.46		
5	1.1693	1.0203	2.1544	96.55	99.96	2.61
6	1.0684	1.0245	2.0906	99.78		
7	1.0675	1.2145	2.3237	103.43		
8	1.0723	1.2146	2.2728	98.84		

9	1.0717	1.2142	2.3426	104.67		
表 4-16 去氢木香内酯加样回收试验						
编号	样品中去氢木香 炔内酯含量 mg	加入去氢木香炔 内酯含量 mg	去氢木香炔内 酯测得量 mg	回收率 %	平均回 收率%	RSD%
1	4.1592	3.2821	7.4387	99.92		
2	4.1544	3.2473	7.4608	101.82		
3	4.1631	3.2584	7.3847	98.87		
4	4.1284	4.1027	8.3886	103.84		
5	4.1283	4.1043	8.0910	96.55	100.62	2.27
6	4.0915	4.1032	8.1836	99.73		
7	4.0986	4.9201	9.1324	102.31		
8	4.0854	4.9243	9.1505	102.86		
9	4.1179	4.8325	8.9330	99.64		

以上结果显示,古方乌发膏供试品中木香炔内酯、去氢木香内酯的平均回收率分别为 99.96、100.62%, *RSD* 分别为 2.61、2.27%,表明该测定方法稳定可行。

3.6.1.4 古方乌发膏中木香炔内酯和去氢木香内酯的含量测定

自制三批古方乌发膏,按照上文中方法进行处理测定,得到如下数据,见表 4-17。

表 4-17 木香炔内酯和去氢木香内酯的含量测定

批号	木香炔内酯 (mg/g)	去氢木香内酯 (mg/g)	木香炔内酯和去氢木香 内酯总含量 (mg/g)
160101	1.0924	4.1492	5.2461
160102	1.1095	4.1550	5.2645
160103	1.1046	4.1608	5.2654
平均值	—	—	5.2587

根据以上测定结果,考虑到原药材质量、制备工艺过程等因素的影响,按测定结果平均含量的 80%为下限,暂定古方乌发膏中每克含木香炔内酯和去氢木香内酯的总量不得少于 4.21mg。

3.6.2 没食子酸的含量测定

3.6.2.1 色谱条件^[11]

色谱柱为(Inertsil® ODS-3, 5μm, 4.6 mm×250 mm),流动相为 0.05%磷酸的

甲醇液 (A) -0.05% 磷酸水溶液 (B)，条件如下：

时间/min	A (0.05% 磷酸的甲醇液)	B (0.05% 磷酸水溶液)
0-7	10→5	90→95
7-15	5→18	95→82
15-20	18	82

检测波长为 272 nm，柱温为 25 °C，流速为 1.0 mL/min，进样量为 10 μ L。
理论塔板数按没食子酸峰计算不低于 6000。

3.6.2.2 溶液的制备

对照品溶液的制备：精密称取没食子酸对照品 2.5 mg，置 5 mL 量瓶中，加 50% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，作为对照品母液。从中精密量取 1 mL 至 25 mL 容量瓶中，加 50% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，即得每 1 mL 含 0.02 mg 没食子酸的对照品溶液。

供试品溶液的制备^[12]精密称取古方乌发膏 1g 于圆底烧瓶中，加入 4 mol/L 盐酸溶液 50 mL，称定重量，水浴加热 3.5 小时，放冷，补重，滤过。精密量取续滤液 1 mL，置 5 mL 量瓶中，加 50% 的甲醇稀释至刻度，摇匀，超声 10 分钟，过微孔滤头，取续滤液，即得供试品溶液。

阴性溶液的制备：取处方缺西青果、诃子药材，制备成阴性软膏样品。按供试品溶液制备项下方法处理，制得阴性样品溶液^[12]。

3.6.2.3 方法学考察

专属性试验：精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液 10 μ L，按上述色谱条件依次进样，结果没食子酸分离度达到规定要求，且阴性无干扰，见图 4-15、4-16、4-17。

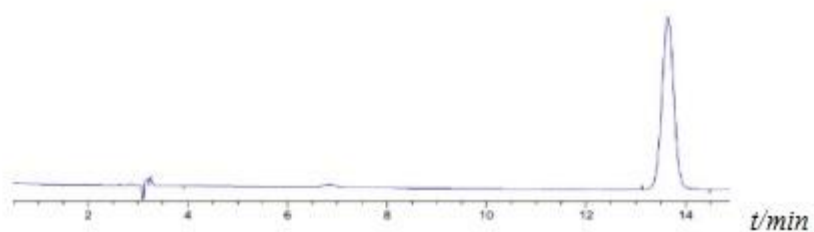


图 4-15 没食子酸对照品溶液色谱图

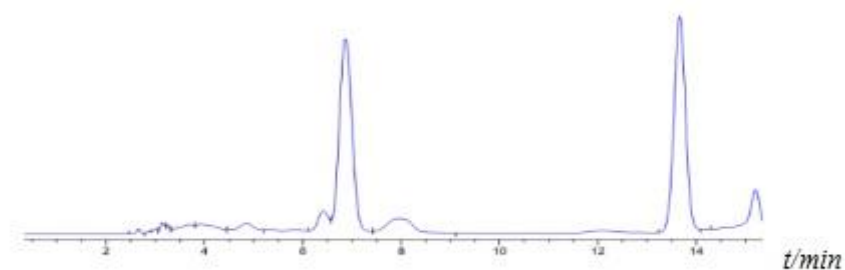


图 4-16 供试品溶液色谱图

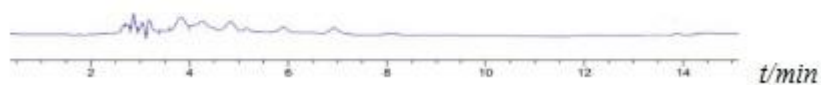


图 4-17 阴性样品溶液色谱图

线性关系考察：制备 0.4 mg/mL 的没食子酸对照品溶液，依次吸取 1、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mL 至 10 mL 容量瓶中，50%的甲醇稀释至刻度，分别得到浓度为 0.04, 0.02, 0.016, 0.012, 0.008, 0.004 mg/mL 的一系列对照品溶液，精密吸取各浓度对照品溶液 10 μ L，分别注入高效液相色谱仪，按照上述色谱条件测定峰面积，以峰面积（A）为纵坐标，对照品含量 c（ μ g/mL）为横坐标，绘制标准曲线。线性回归得到回归方程为： $A=142.62c-28.206(r=0.9998)$ 。结果表明没食子酸浓度在 0.04~0.4 μ g/ μ L 内呈良好的线性关系。结果见表 4-18 及图 4-18。

表 4-18 没食子酸线性关系考察结果

浓度/ μ g·mL ⁻¹	4	8	12	16	20	40
峰面积（mAU）	563.21	1138.25	1655.94	2238.48	2802.48	5694.79

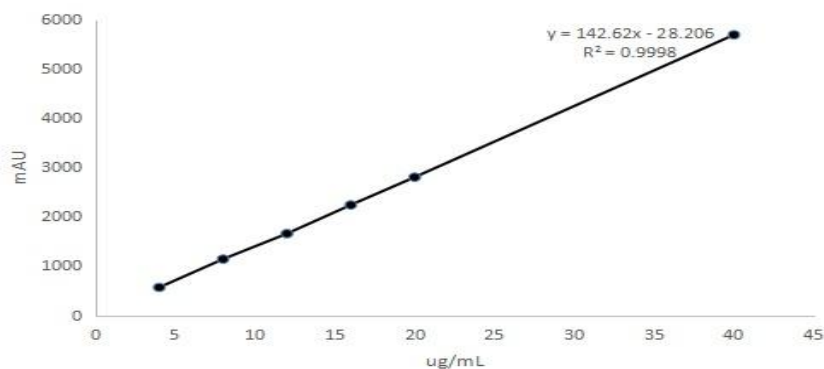


图 4-18 没食子酸标准曲线

精密度试验：精密吸取线性关系考察项下的对照品溶液（没食子酸浓度为 $0.016 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）及批号为 160101 的供试品溶液 $10\mu\text{L}$ ，并按上述色谱条件重复进样 6 次，计算没食子酸的峰面积 RSD 值，结果见表 4-19、4-20。

表 4-19 对照品精密度试验结果

成分	峰面积 (mAU)	平均	RSD/%
没食子酸	2348.24	2290.5	2.97
	2240.27		
	2253.23		
	2199.1		
	2359.42		
	2342.74		

表 4-20 供试品精密度试验结果

成分	峰面积 (mAU)	平均	RSD/%
没食子酸	2935.42	2904.90	1.47
	2947.16		
	2945.72		
	2992.38		
	2926.60		
	2982.14		

结果表明，其 RSD 值均小于 3%，表明仪器精密度良好。

稳定性试验：精密吸取对照品溶液（没食子酸浓度为 $0.016 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）和同一批（批号为 160101）供试品溶液，分别于不同时间进样一次，记录峰面积，结果见表 4-21、4-22。结果表明，对照品、供试品溶液在 24h 内稳定性良好。

表 4-21 对照品稳定性试验结果

测定时间/h	0	2	4	8	12	16	24
供试品峰面积 (mAU)	2262.74	2250.39	2245.86	2260.31	2253.64	2240.38	2237.19
RSD/%	0.43						

表 4-22 供试品稳定性试验结果

测定时间/h	0	2	4	8	12	16	24
供试品峰面积(mAU)	2924.84	2937.29	2998.32	2931.94	2954.26	2935.75	2943.27
RSD/%	0.86						

重复性试验：精密称取同一批（160101）古方乌发膏，按供试品溶液的制备方法制备，平行制备 6 份，依次进样，结果见表 4-23，没食子酸的平均含量为

5.1754mg/g, RSD 为 0.16%, 表明该方法的重复性良好。

表 4-23 重复性试验结果

试验号	1	2	3	4	5	6
没食子酸 (mg/g)	5.1810	5.1725	5.1601	5.1767	5.1816	5.1803
RSD/%	0.16					

加样回收试验：分别取 9 份古方乌发膏，每份 0.5g，加入没食子酸对照品，按照供试品溶液制备项下操作，测定其中没食子酸的含量，结果见表 4-24，古方乌发膏中没食子酸的平均回收率为 100.02%，RSD 值为 1.48%，表明该测定方法稳定可行。

4-24 加样回收试验

编号	样品中没食子 酸量 mg	加入没食子 酸量 mg	没食子酸测 得量 mg	回收率 %	平均回收 率%	RSD %
1	5.1762	4.1414	9.3565	100.94	100.02	1.48
2	5.1741	4.1367	9.3886	101.88		
3	5.1776	4.1314	9.2602	98.82		
4	5.1754	5.1771	10.2935	98.86		
5	5.1785	5.1762	10.2512	98.00		
6	5.1752	5.1755	10.3357	99.71		
7	5.1763	6.2124	11.4819	101.50		
8	5.1748	6.2116	11.3125	98.81		
9	5.1783	6.2118	11.4932	101.66		

3.6.2.4 古方乌发膏中没食子酸的含量测定

自制三批古方乌发膏，按照上文中方法进行处理测定，得到如下数据，见表 4-25。

表 4-25 没食子酸的含量测定

批号	160101	160102	160103
没食子酸含量 (mg/g)	5.1824	5.1625	5.1629
平均值 (mg/g)	5.1693		

根据以上测定结果，考虑到原药材质量、制备工艺过程等因素的影响，按测定结果平均含量的 80% 为下限，故暂定古方乌发膏中每克含没食子酸不得少于 4.14mg。

4 功能主治

少年白发，促生黑发。主要用于血热偏盛、精虚血弱引起的白发病状。

5 用法用量

外用涂抹于头皮层，一次 12 g，每次 1h，每日一次。

6 规格

120g/盒。

7 贮藏

密封，遮光，避潮。

参考文献：

- [1]杨俊,徐应淑,徐小婷,等.应用 Box-Behnken 设计优选虎耳草软膏剂成型工艺[J].遵义医学院学报,2016,39(1):81-84.
- [2]张志勤.复方维 A 酸乳膏的制备、质量控制及稳定性研究[D].大连:大连医科大学,2013.
- [3]赵明川,张玉,周春英,等.毛发早白的病因病机与治疗概况[J].山东中医杂志,2012,31(2):150~151.
- [4]罗国安,梁琼麟,王义明,等.中药指纹图谱—质量评价、质量控制与新药研发[M].北京:化学工业出版社,2009.
- [5]国家食品药品监督管理局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S].国药管注[2000]348 号.
- [6]苏建,刘永利.清火栀麦胶囊 HPLC 特征图谱的建立和 3 种成分的测定[J].中成药,2016,38(4):810-815.
- [7]徐吉银,孙丽丽,杨立伟,等.小儿七星茶口服液指纹图谱研究[J].中草药,2016,47(6):928-932.
- [8]韩亚南,汪娟,黄福开,等.藏族药八味沉香丸的 HPLC 指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(9):52-57.
- [9]陈浩,何小女,徐欢,等.抗炎止血软膏中没食子酸含量的测定[J].江西中医药,2014,45(373):61-62.
- [10]祝明,陈碧莲,石上梅,等.中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用[J].中国现代应用药学,2016,33(5):611-614.
- [10]国家药典委员会.中国药典 2015 年版[S].一部.北京:中国中医药出版社,2015.
- [11]陈浩,何小女,徐欢,等.抗炎止血软膏中没食子酸含量的测定[J].江西中医药,2014,45(373):61-62.

第五章 稳定性研究

考相关文献^[1-3]，依据《药物稳定性试验指导原则》对古方乌发膏成品进行 6 个月的加速试验和 12 个月的长期稳定性试验检查。

1 试验方法

加速试验：取古方乌发膏的三批样品（批号 160101，160102，160103）进行试验，将包装好的乌发膏置于 $30\pm2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $65\pm5\%$ 的恒温恒湿培养箱内，分别在 0、1、2、3、6 个月取样进行相关检查及测定。

长期稳定性试验：取古方乌发膏的三批样品（批号 160101，160102，160103）进行试验，将包装好的乌发膏置于室温（ $10\sim30^{\circ}\text{C}$ ）、相对湿度 $60\pm10\%$ 的条件下贮藏 12 个月，分别在 0、3、6、9、12 个月进行取样进行相关检查及测定。

2 考察项目及结果

通过对本乳膏进行性状、铁盐、重金属、砷盐、pH 值、微生物限度检查以及薄层鉴别、含量测定的考察，结果显示该乳膏剂在包装良好的情况下，在 1 年半内具有较好稳定性，结果见表 5-1 至 5-6。

5-1 古方乌发膏加速试验结果（批号：160101）

日期		0 月	1 月	2 月	3 月	6 月
性状		本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏
薄层鉴别	应检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点
	应检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯
	应检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸
检查	铁 盐 含 量 $\leq 105.00 \mu\text{g/g}$	85.07	83.43	83.71	83.94	84.40
	重 金 属 含 量 $< 20\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	砷盐含量 $< 4\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	pH 值	6.83	6.47	6.51	6.54	6.67
微生物限度	需 氧 菌 总 数 $\leq 100\text{cfu/g}$	30	20	30	30	30
	霉菌和酵母菌数 $\leq 10\text{cfu/g}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	不得检出金黄色葡萄球菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
	不得检出铜绿假单胞菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
特征指纹图谱		符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
含量测定	每克含木香烃内酯、去氢木香内酯总量 mg	5.2461	5.3304	5.3125	5.2900	5.2873
	每克含没食子酸含量 mg	5.1824	5.1721	5.1716	5.1727	5.1705

表 5-2 古方乌发膏加速试验结果（批号：160102）

日期		0 月	1 月	2 月	3 月	6 月
性状		本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏
薄层鉴别	应检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点
	应检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯
	应检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸
检查	铁 盐 含 量 $\leq 105.00 \mu\text{g/g}$	85.37	87.49	88.72	89.94	89.41
	重 金 属 含 量 $< 20\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	砷盐含量 $< 4\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	pH 值	6.84	6.64	6.72	6.85	6.94
微生物限度	需 氧 菌 总 数 $\leq 100\text{cfu/g}$	20	20	30	30	40
	霉菌和酵母菌数 $\leq 10\text{cfu/g}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	不得检出金黄色葡萄球菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
	不得检出铜绿假单胞菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
特征指纹图谱		符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
含量测定	每克含木香烃内酯、去氢木香内酯总量 mg	5.2645	5.3504	5.2425	5.2400	5.2473
	每克含没食子酸含量 mg	5.1625	5.1734	5.1718	5.1712	5.1705

表 5-3 古方乌发膏加速试验结果（批号：160103）

日期		0 月	1 月	2 月	3 月	6 月
性状		本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏
薄层鉴别	应检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点
	应检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯
	应检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸
检查	铁盐含量 $\leq 105.00 \mu\text{g/g}$	85.48	87.49	88.74	88.34	89.46
	重金属含量 $< 20\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	砷盐含量 $< 4\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	pH 值	6.85	6.57	6.64	6.74	6.87
微生物限度	需氧菌总数 $\leq 100\text{cfu/g}$	20	20	20	30	30
	霉菌和酵母菌数 $\leq 10\text{cfu/g}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	不得检出金黄色葡萄球菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
	不得检出铜绿假单胞菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
特征指纹图谱		符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
含量测定	每克含木香烃内酯、去氢木香内酯总量 mg	5.2654	5.3274	5.3175	5.2914	5.2973
	每克含没食子酸含量 mg	5.1629	5.1791	5.1743	5.1727	5.1725

表 5-4 古方乌发膏长期稳定性试验结果（批号：160101）

日期		0 月	3 月	6 月	9 月	12 月
性状		本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏
薄层鉴别	应检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点
	应检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯
	应检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸
检查	铁 盐 含 量 ≤105.00 μg/g	85.07	89.45	89.94	90.12	90.42
	重 金 属 含 量 <20ppm	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	砷盐含量<4ppm	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	pH 值	6.83	6.87	6.84	6.92	6.98
微生物限度	需 氧 菌 总 数 ≤100cfu/g	30	20	20	30	30
	霉菌和酵母菌数 ≤10cfu/g	<10	<10	<10	<10	<10
	不得检出金黄色葡萄球菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
	不得检出铜绿假单胞菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
特征指纹图谱		符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
含量测定	每克含木香烃内酯、去氢木香内酯总量 mg	5.2461	5.3104	5.3122	5.2970	5.2874
	每克含没食子酸含量 mg	5.1824	5.1794	5.1772	5.1751	5.1715

表 5-5 古方乌发膏长期稳定性试验结果（批号：160102）

日期		0 月	3 月	6 月	9 月	12 月
性状		本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏
薄层鉴别	应检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点
	应检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯
	应检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸
检查	铁 盐 含 量 ≤105.00 μg/g	85.37	84.17	84.42	84.35	84.79
	重 金 属 含 量 <20ppm	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	砷盐含量<4ppm	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	pH 值	6.84	6.84	6.85	6.91	6.97
微生物限度	需 氧 菌 总 数 ≤100cfu/g	20	20	30	30	30
	霉菌和酵母菌数 ≤10cfu/g	<10	<10	<10	<10	<10
	不得检出金黄色葡萄球菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
	不得检出铜绿假单胞菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
特征指纹图谱		符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
含量测定	每克含木香烃内酯、去氢木香内酯总量 mg	5.2645	5.2803	5.2823	5.2819	5.2800
	每克含没食子酸含量 mg	5.1625	5.1782	5.1743	5.1717	5.1705

表 5-6 古方乌发膏长期稳定性试验结果（批号：160103）

日期		0 月	3 月	6 月	9 月	12 月
性状		本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏	本品内容物为银灰色乳膏
薄层鉴别	应检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点	检出诃子、西青果特征斑点
	应检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯	检出木香特征斑点：木香烃内酯、去氢木香内酯
	应检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸	检出蔷薇茎皮特征斑点：熊果酸
检查	铁盐含量 $\leq 105.00 \mu\text{g/g}$	85.48	82.73	82.94	83.13	83.08
	重金属含量 $< 20\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	砷盐含量 $< 4\text{ppm}$	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	pH 值	6.85	6.74	6.79	6.84	6.85
微生物限度	需氧菌总数 $\leq 100\text{cfu/g}$	20	20	20	30	30
	霉菌和酵母菌数 $\leq 10\text{cfu/g}$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	不得检出金黄色葡萄球菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
	不得检出铜绿假单胞菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
特征指纹图谱		符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
含量测定	每克含木香烃内酯、去氢木香内酯总量 mg	5.2654	5.2937	5.2916	5.2904	5.2892
	每克含没食子酸含量 mg	5.1629	5.1794	5.1761	5.1727	5.1705

参考文献:

- [1] 谢军, 刘圣, 姚先梅, 等. 复方甘草黄酮乳膏的稳定性研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(3): 310-311.
- [2] 张志勤. 复方维 A 酸乳膏的制备、质量控制及稳定性研究.[D] 大连: 大连医科大学, 2013: 60.
- [3] 杨跃辉, 郭涛, 段旭, 等. 正交试验法优选氢定乳膏的基质处方及稳定性考察[J]. 实用药物与临床, 2006, 9(6): 337-339.

第六章 总结与讨论

1 总结

本文根据蒙药标准中乌发涂剂的功能主治、使用方法等,结合处方中各药的药性、药理作用以及临床使用的有效方便性等,选用乳膏剂作为最终剂型。研究把古方和现代制剂手段相结合,制定了古方乌发膏的制备工艺路线、对该制剂进行检查、鉴别、指纹图谱以及含量测定,建立了本制剂的质量标准,还对其稳定性进行了考察研究。

1.1 乳膏剂制备工艺

本课题通过正交试验筛选木香挥发油的最佳提取工艺:木香饮片 10 倍量水浸泡 1h,水蒸气蒸馏 8h,收集挥发油,保留药渣;同法筛选出处方的最佳动态温浸提取工艺:木香药渣和处方中西青果、诃子、蔷薇茎皮、铁屑粗粉 10 倍量水 60℃下动态温浸提取两次,每次 3 h。提取液经减压浓缩(60℃,真空度 -0.08~-0.09Mpa)至药液比 1:4 后加入乙醇使浓度达到 60%,静置 4 h 除杂,再减压浓缩(60℃,真空度 -0.08~-0.09Mpa)至相对密度为 1.15~1.25(60℃)的清膏,回收乙醇。采用响应面法优选出的古方乌发膏最佳基质处方为:30 mL 提取液(密度 1.2)、十六醇 20g、白凡士林 10g、十二烷基硫酸钠 0.5g、丙二醇 1.5%、氮酮 2.5%、尼泊金甲酯 0.05%。古方乌发膏的最终制备工艺为:经提取、除杂、浓缩后的药液合并挥发油作为乳膏剂的水相,加入十二烷基硫酸钠、丙二醇、氮酮、尼泊金甲酯加热至 80℃,缓慢加入加热至相同温度的油相(十六醇、白凡士林),边加边随一个方向搅动,直到乳化凝结,即得。

1.2 质量标准

本课题对古方乌发膏成品进行了性状、装量差异、铁盐、砷盐、重金属及微生物限度检查,均符合规定。通过薄层鉴别,检出诃子、西青果的特征斑点,木香的木香烯内酯、去氢木香内酯特征斑点,蔷薇茎皮的熊果酸特征斑点。并对古方乌发膏进行指纹图谱研究,相似度评价中 10 批供试品相似度>0.9,表明该制剂质量稳定;对 17 个共有指纹峰分别进行归属,基本阐明该复方制剂的主要化学组成,该方法的建立对古方乌发膏的质量控制提供了一定的依据。通过高效液相法对木香烯内酯、去氢木香内酯、没食子酸进行含量测定及方法学考察,暂定古方乌发膏以木香烯内酯、去氢木香内酯的总量计每克不得少于 4.21mg,没食

子酸每克不得少于 4.16mg。

1.3 稳定性试验

通过对本制剂进行加速试验和长期稳定性试验,考察性状、铁盐、砷盐、重金属、pH 值、微生物限度检查以及特征图谱、薄层鉴别、含量测定,结果表明该制剂在包装良好的情况下,在 18 个月内稳定性良好。

2 讨论

2.1 动态温浸提取工艺的选取

本课题在原方温浸提取的基础上,改用动态温浸提取,动态提取作为中药提取生产中的一种新方法,较传统静态温浸、煎煮等提高了提取效率,减少了提取时间和对有效成分的破坏,从而可提高成方制剂的质量。同时动态温浸工艺扩散过程快、浸取温度低,可减少生产中的能源消耗^[1-2],并且使浸取时间变短。

2.2 药材粒度的考察

本试验提取前原药材均为饮片形式,木香需单独提取挥发油,挥发油作为现代研究最多的一类物质,其中木香烃内酯、去氢木香内酯药理作用主要体现为抗炎、抗氧化等作用^[3-5],由于挥发油不稳定、易氧化、易升华,提取前若木香粉碎过细有可能导致油细胞破碎,造成挥发油逸散,另外木香药渣还要进一步与处方中其他药材中粉温浸提取,粉碎后不利于收集药渣,故实验中采用木香饮片以水蒸气蒸馏法单独提取挥发油。考虑到温浸提取的最大有效性,试验前期通过比较药材(除木香外)饮片、粗粉、中粉粉碎后的收率和提取后指标成分没食子酸的含量变化,其中细粉不易过滤,滤液中杂质过多,中粉中有效物质溶出较饮片少,故选择粗粉为最佳药材粒度。

2.3 没食子酸含量测定

2.3.1 检测波长的选择

本试验通过 DAD 全波长扫描,扫描波长为 190 nm-400 nm,分析 3D 光谱图,发现大部分物质在 220 nm 处呈现最强吸收,故设定 220 nm 为古方乌发膏的检测波长。

2.3.2 供试品制备溶剂的选择

参考相关文献^[6],分别考察了 50%甲醇、70%甲醇、90%甲醇、甲醇对没食

子酸的提取率以及对色谱峰性能的影响,结果表明 50%甲醇作为供试品制备溶剂,供试品溶液中的没食子酸含量高且色谱峰分离度高、对称性好。

2.3.3 色谱条件的优化

分别考察了甲醇-水、甲醇-0.03%磷酸水溶液、甲醇-0.05%磷酸水溶液、0.05%磷酸甲醇液-0.05%磷酸水溶液等多种流动相。结果表明酸性条件下,没食子酸的峰形、分离度及其他色谱峰的检出等得到良好改善,而选用 0.05%磷酸甲醇液-0.05%磷酸水溶液,峰形效果最好,同时有效解决了醇-水系统梯度洗脱下的基线漂移问题,故选择该体系作为色谱条件的流动相。

2.4 响应面法筛选基质处方

2.4.1 基质处方评价指标的选定

本部分通过综合评分法,将外观性状和小鼠真皮层内所含没食子酸含量为指标。大多数情况下透皮吸收性试验均使用扩散池法,研究目的是有效成份吸收入血的程度,而本试验以真皮层没食子酸的含量为指标,是因为古方乌发膏外用,主要作用于头皮层。通常毛囊根部的毛乳头提供头皮营养,并加速黑色素颗粒合成,当黑色素颗粒在毛囊内产生形成障碍,不能够及时传入毛发中,从而使毛发髓质、皮质部分的黑色素颗粒减少、消失,就会出现白发,本方旨在促进皮层血液循环,促进黑色素生成,使有效成分作用于毛囊,从而长出黑发,故头皮的真皮层为主要作用部位。

2.4.2 促皮渗透剂的筛选

综合考虑到本制剂使用时需涂抹在头皮发根以及时间的方便性,本试验前期考察了 1h 内丙二醇、氮酮联用对古方乌发膏经皮渗透性的影响,结果发现丙二醇与氮酮联用的效果最佳,这与文献^[7]报道一致,作为经常联合使用的促渗剂对,丙二醇可以增强氮酮在头皮角质层中的溶解度,延长其在角质层的作用时间和作用强度,并可有效地缩短时滞^[8],由于本研究以真皮层中没食子酸的含量作为筛选促渗剂丙二醇、氮酮用量比的评价指标,故应控制促渗剂的用量,使 1h 内真皮层的目标成分含量最高,由试验结果可知 1.5%丙二醇联合 2.5%的氮酮效果最好。为减少复杂性,本试验对单因素试验采用了外观感官评分来筛选十六醇、十二烷基硫酸钠用量,根据 2015 版药典乳膏基质的考察指标,该评价只涉及了均匀度和延展性,是否易涂布,尚有不足之处。文中响应面试验采用多指标综合评

分法筛选基质组成,比单一评价更加全面可靠。

2.5 特征指纹图谱

由于诃子、西青果、蔷薇茎皮的主要提取物为鞣质类物质,且诃子和西青果两者来源相同,故只对 17 个共有指纹峰中的一部分进行了来源归属,其余为四种药材的共有峰。HPLC 作为特征图谱与指纹图谱最常用的方法^[9],具分离功能强、分析速度快、样品适用性广泛、检测器种类多和系统稳定性好等优势。本试验用该法对制剂进行指纹图谱研究和含量测定,相似度评价中 10 批供试品相似度 >0.9 ,说明该制剂质量较稳定,对 17 个共有指纹峰分别进行归属,基本阐明该复方制剂的主要化学组成,该处方指纹图谱方法的建立和对目标成分没食子酸的含量测定方法的建立对古方乌发膏的质量控制提供了依据。

2.6 创新点与不足之处

本课题研究选用蒙药经验方乌发涂剂,在中医药理论指导下,课题组采用现代制剂技术制成方便有效的的新剂型-乳膏剂,对少数民族验方的研究、开发利用使其独特的方药和显著疗效得以保护和发展;考虑到处方中含有铁屑一味药物,对重金属、砷盐、铁盐进行了检查、制订了标准;为提高头皮适应性,更参考洗发水 pH 值规定,对其也进行了检查和标准制订;对古方乌发膏的指纹图谱进行研究,建立了特征指纹图谱,提升了制剂的质量标准。

方中药物均不常用,文献等参考资料稀少,尤其蔷薇茎皮至今未有任何质量标准参考,而本课题组对蔷薇茎皮药材的质量标准研究还不全面,欠缺含量测定等内容。另外,整个试验研究只进行了制备工艺、质量标准和稳定性研究,课题组后续将进行与之相关的药效学和毒理学等方面的研究。

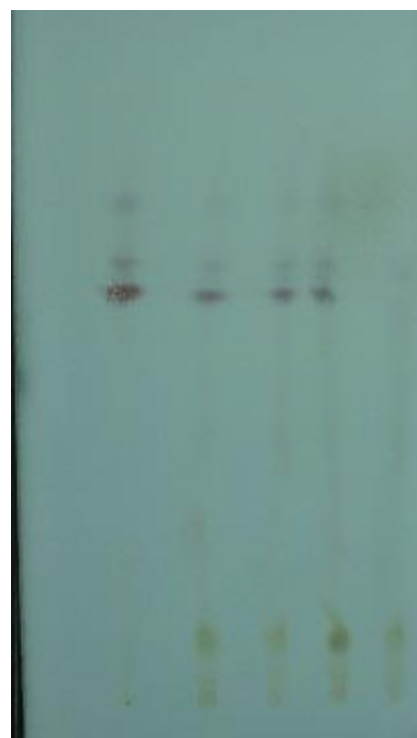
参考文献:

- [1]苗青.中药动态温浸工艺技术[J].中成药,2002,24(2):136.
- [2]杨晓晨,李惠玲.中药动态提取[J].时珍国医国药,2006,17(8):1491.
- [3]王永兵,王 强,毛福林,等.木香的药效学研究[J].中国药科大学学报,2001,32(2):146.
- [4]刘俊红,李棣华,伍孝先,等.提取木香中木香烃内酯及去氢木香内酯影响因素的初步研究[J].时珍国医国药,2009,20(12):3013-3014.
- [5]王本祥.现代中药药理学,第 1 版[M].天津:天津科学技术出版社,1997:655.
- [6]张兰珍,王晓强,贾辉等.高效液相色谱法测定叶下珠中没食子酸的含量[J].北京中医药大学学报,2000,23(6):46-47.
- [7]黄晓晨,宿树兰,钱大玮,等.不同促渗剂对少腹逐瘀方外用贴剂中效应成分群体外透皮吸收的影响[J].中草药,2014,45(21):3074-3080.
- [8]梁秉文,叶祖光.中药经皮给药制剂技术[M].北京:化学工业出版社,2006.
- [9]祝明,陈碧莲,石上梅,等.中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用[J].中国现代应用药学,2016,33(5):611~614.

附图

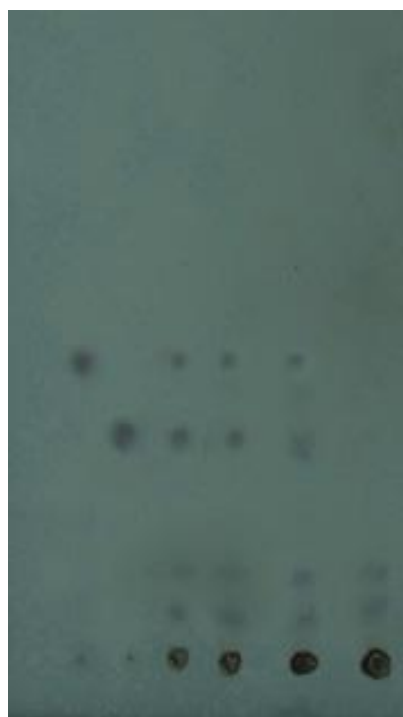


附图 3-1 西青果、诃子 TLC 展开剂 I

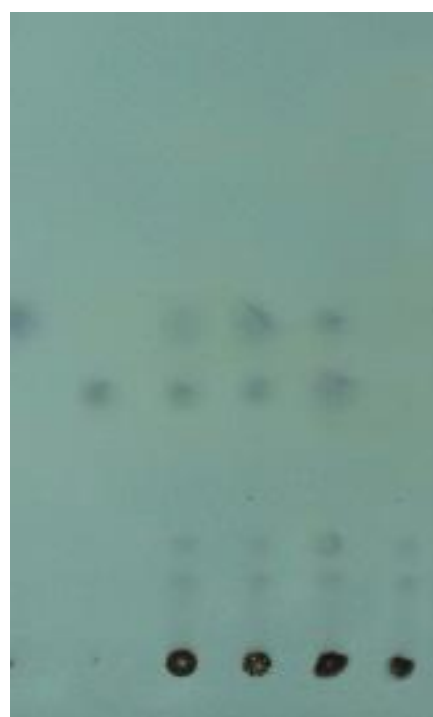


附图 3-2 西青果、诃子 TLC 展开剂 II

1 诃子对照药材 2 供试品 (160101) 3 供试品 (160102)
4 供试品 (160103) 5 阴性对照溶液



附图 3-3 木香 TLC 展开剂 I



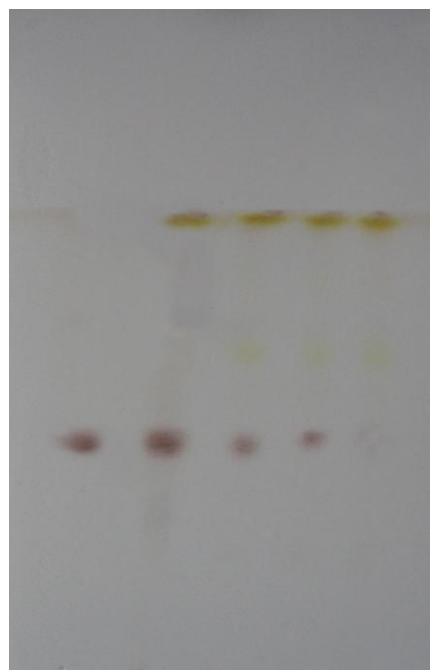
附图 3-4 木香 TLC 展开剂 II

- 1 去氢木香内酯 2 木香炔内酯 3 供试品 (160101)
4 供试品 (160102) 5 供试品 (150103) 6 阴性对照溶液



1 2 3 4 5

附图 3-5 蔷薇茎皮 TLC 展开剂 I



1 2 3 4 5

附图 3-6 蔷薇茎皮 TLC 展开剂 II

- 1 熊果酸 2 供试品 (160101) 3 供试品 (160102)
4 供试品 (150103) 5 阴性对照溶液

致谢

特别感谢我的导师李希教授，在李老师的悉心指导下，我的研究生阶段学到了很多知识，不管是生活工作，还是从论文选题、实验设计到实验完成。李老师在工作上认真负责，态度严谨，生活上对我们关心有加，无微不至，在学校的这三年从李老师那里不仅收获了很多知识道理，还收获了很多温暖，仿佛置于一个温暖的大家庭中。在此谨向导师李老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意！

还要感谢四川省中医药科学院中医研究所的谢守德老师、冯建安老师及黄嫣老师对平时我的日常生活、实验指导、论文写作等做出了巨大帮助，在此衷心的感谢！

感谢这几年来在实验室学习阶段期间，给予我帮助的师姐师妹们，使我的工作变得轻松容易。

最后，感谢我的家人和朋友，谢谢你们对我的支持与鼓励！

在读期间公开发表的学术论文

序号	论文名称	发表刊物及时间	本人署名次序
1	《正交实验法优化古方乌发膏的提取工艺》	《成都中医药大学学报》2016 年第 39 卷 4 期	1
2	《古方乌发膏HPLC指纹图谱建立和含量测定》	《亚太传统医药》2017 年第 1 期	1
3	《Box-Behnken 设计优选古方乌发膏机制组成》	《亚太传统医药》2017 年第 2 期	1
4	《HPLC_ELSD 法测定归芪升白颗粒中黄芪甲苷含量》	《亚太传统医药》2017 年第 5 期	1
5	《减压内部沸腾提取川佛手多糖工艺的优化》	《中成药》2017 年 4 月第 39 卷第 4 期	2
6	《基于多指标成分分析川佛手不同干燥工艺的比较研究》	《亚太传统医药》2016 年第 23 期	2
7	《柴胡-佛手挥发油提取工艺优化》	《亚太传统医药》2016 年第 24 期	2
8			

申明

本人承诺：硕士学位论文古方乌发膏的药学研究是本人在成都中医药大学攻读硕士学位期间在导师指导下独立进行研究工作所取得的成果，无抄袭及编造行为。由于本人的导师（或主要具体指导者）系校外兼职导师，并提供了该学位论文研究、撰写的主要经费，故该论文涉及的有关知识产权等，按事先已有的约定执行；若无约定，则全部归成都中医药大学所有。

本人同意：成都中医药大学有权通过影印、复印等手段汇编学位论文予以保存，并提供查阅和借阅；有权按照规定向国家有关部门、相关机构送交论文及电子版，公布（或刊登）论文内容。

研究生签字：王佳

导师签字：薛