

续骨疗伤膏的质量标准研究[△]

唐广应^{1*},文方杰¹,任一¹,李溥²,杨再波²,李姍¹,游绍雪¹,胡建山^{1#}(1.贵州省黔南布依族苗族自治州中医院,贵州都匀 558000;2.黔南民族师范学院贵州省高校民族药用植物资源开发工程研究中心,贵州都匀 558000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)09-1233-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.09.26

摘要 目的:建立续骨疗伤膏的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中肉桂、虎杖进行鉴别。采用高效液相色谱法测定制剂中川续断皂苷Ⅵ的含量:色谱柱为Wondasil C₁₈,流动相为乙腈-水(30:70, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为212 nm,柱温为30 ℃。结果:肉桂、虎杖的TLC图斑点清晰,分离度好。川续断皂苷Ⅵ的检测进样量线性范围为0.204 3~1.225 6 μg($r=0.999 5$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为95.94%~99.80%(RSD=1.43%, $n=6$)。结论:该研究所建标准可用于续骨疗伤膏的质量控制。

关键词 续骨疗伤膏;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;川续断皂苷Ⅵ

Study on Quality Standard of Xugu Liaoshang Cream

TANG Guangying¹, WEN Fangjie¹, REN Yi¹, LI Pu², YANG Zaibo², LI Shan¹, YOU Shaoxue¹, HU Jianshan¹(1. Gui-Zhou Qiannan Chinese Medicine Hospital, Guizhou Duyun 558000, China; 2. Guizhou Provincial College Engineering Research Center for National Medicinal Plant Resource, Qiannan Normal University for Nationalities, Guizhou Duyun 558000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Xugu liaoshang cream. METHODS: TLC was used to identify *Cinnamomum cassia* and *Reynoutria japonica*; HPLC was used to determine the content of asperosaponin VI. The column was Wondasil C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (30:70, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 212 nm, and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The TLC graph of C.cassia and R.japonica showed clear pots and good separation. The linear range of asperosaponin was 0.204 3-1.225 6 μg ($r=0.999 5$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 95.94%-99.80% (RSD=1.43%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Xugu liaoshang cream.

KEYWORDS Xugu liaoshang cream; Quality standard; TLC; HPLC; Asperosaponin VI

慢性软组织损伤是临床上常见多发病,临床表现为疼痛、肿胀、功能障碍^[1],其特点为受损部位长期慢性疼痛^[2]。由于发病广泛,治愈困难,世界卫生组织将慢性软组织损伤列为目前世界疑难病症之一^[3]。续骨疗伤膏系贵州省黔南布依族苗族

自治州中医院胡建山教授挖掘整理苗族民间经验方开发的骨伤科民族药院内制剂,由续断、水冬瓜皮、虎杖、肉桂组合而成,批准文号为黔药制字Z20130008,临床多用于慢性软组织损伤的治疗,疗效较好。为了有效控制续骨疗伤膏的质量,本

(2):372.

- [3] 林兰,牛剑钊,许明哲,等.国外仿制药一致性评价比较分析[J].中国新药杂志,2013,22(24):2 470.
- [4] 国家食品药品监督管理局药品审评中心.药品体外溶出试验信息库:格列齐特[EB/OL].(2010-01-27)[2015-03-11].<http://www.cde.org.cn/recommend.do?method=view&id=363>.
- [5] 张启明,谢沐风,宁保明,等.采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J].中国医药工业杂志,2009,40

(12):946.

- [6] 陆步实,孙磊,周立新,等.多条溶出曲线评价缙沙坦氢氯地平片的质量[J].中国医院药学杂志,2012,32(9):704.
- [7] 孙婷,姜建国,宋更申,等.国内外不同厂家马来酸依那普利片在4种溶出介质中溶出曲线的比较[J].中国药房,2014,25(32):3 053.
- [8] 马晓金,熊婧,李锐. AV 值法考察舒必利片的溶出曲线[J].中国药事,2014,28(8):888.
- [9] 姜雄平,魏立平.受试制剂多个剂量溶出曲线与单条参考曲线的比较[J].中国药学杂志,2012,47(17):1 422.
- [10] 吴凡,刘屹,李志远,等.复方磺胺甲磺胺甲噁唑片溶出曲线研究[J].药物分析杂志,2012,32(2):356.

△ 基金项目:国家中医药管理局中医医院中药制剂能力建设项目;贵州省中医药、民族医药临床重点学科建设项目

* 副主任医师。研究方向:中药民族药制剂。电话:0854-8223183。E-mail:dytangguangying@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药民族药制剂。电话:0854-8260561。E-mail:1158468194@qq.com

(收稿日期:2015-05-21 修回日期:2016-02-02)

(编辑:周 箫)

课题组根据处方所含药味的化学成分和剂型特点,研究了其中肉桂、虎杖薄层色谱(TLC)的鉴别和川续断皂苷VI^[4-7]的含量测定方法。

1 材料

1.1 仪器

DGU-20A型高效液相色谱(HPLC)仪,包括LC-15C型单元泵、SPD-15C型检测器(日本Shimadzu公司);HT-230A型柱温箱(天津奥特赛恩斯科学仪器有限公司);SK8210HP型超声清洗机(上海科导超声仪器有限公司);FA1004型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

续骨疗伤膏(贵州省黔南布依族苗族自治州中医院制剂室自制,批号:20120210、20120211、20120212,规格:每贴70 mm×100 mm);川续断皂苷VI对照品(批号:110874-201112,纯度:90.2%)、肉桂对照药材(批号:121363-201108)、虎杖对照药材(批号:120980-201005)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 肉桂 取本品1片,除去盖衬,平展贴于医用纱布上,剪成1 cm×1 cm的小片,置于具塞锥形瓶中,加乙醇10 ml,冷浸20 min,时时振摇,滤过,取滤液作为供试品溶液。另取肉桂对照药材粉碎(过2号筛),按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按续骨疗伤膏处方和制备工艺制备缺肉桂的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(一部)]^[8]试验,吸取上述3种溶液各20 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(30~60℃)-乙酸乙酯(17:3, V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以二硝基苯胍乙醇溶液,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图1。

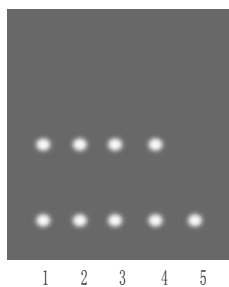


图1 肉桂的薄层色谱图

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of *Cinnamomum cassia*

1. medicinal material reference substance; 2-4. test samples; 5. negative control

2.1.2 虎杖 取本品1片,除去盖衬,平展贴于医用纱布上,剪成1 cm×1 cm的小片,置于具塞锥形瓶中,加甲醇10 ml,超声(功率:100 W,频率:40 kHz,下同)处理15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加2.5 mol/L硫酸5 ml,水浴加热30 min,放冷,用三氯甲烷振摇提取2次,每次5 ml,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加三氯甲烷1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取虎杖对照药材粉碎(过2号筛),按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。按续骨疗伤膏处方和制备工艺制备缺虎杖的阴性样品,按供试

品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(一部)附录VIB]^[9]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(30~60℃)-乙酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图2。

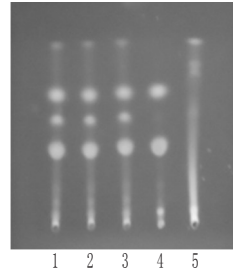


图2 虎杖的薄层色谱图

1~3.供试品;4.对照药材;5.阴性对照

Fig 2 TLC chromatograms of *Polygonum cuspidatum*

1-3. test samples; 4. medicinal material reference substance; 5. negative control

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Wondasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(30:70, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:212 nm;柱温:30℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定川续断皂苷VI对照品63.83 mg,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得每1 ml含川续断皂苷VI 0.553 2 mg的对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液1 ml,置于25 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得每1 ml含川续断皂苷VI 0.102 13 mg的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品5片,除去盖衬,精密称定,平展贴于医用纱布上,剪成1 cm×1 cm的小片,取约五分之一,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇100 ml,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按续骨疗伤膏处方和制备工艺制备缺肉桂的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性和专属性试验 精密吸取“2.2.2”“2.2.3”“2.2.4”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各10 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图3。理论板数以川续断皂苷VI峰计应不低于3 000;各成分基线分离良好,阴性对照在川续断皂苷VI峰处无相应色谱峰出现,即阴性对照无干扰。

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液2、4、6、8、10、12 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以川续断皂苷VI进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=114\ 163x+11\ 172$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明,川续断皂苷VI检测进样量线性范围为0.204 3~1.225 6 μg。

2.2.7 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,川续断皂苷VI峰面积的RSD=1.38%(n=6),表明仪器精密度良好。

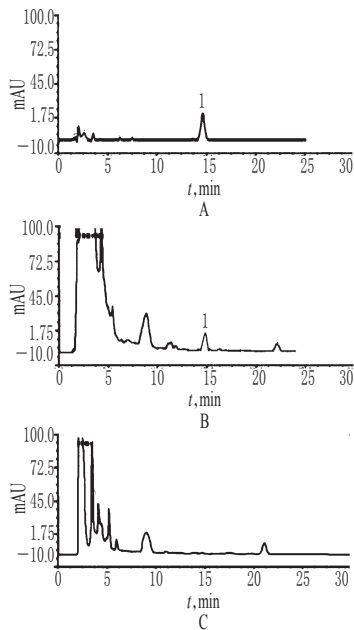


图3 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 川续断皂苷VI

Fig 3 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample; C. negative control; 1. asperosaparin VI

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:20120210)适量,分别于放置0、1、2、4、8、10、12 h时进样测定,记录峰面积。结果,川续断皂苷VI峰面积的RSD=0.21%(n=7),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.2.9 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20120210)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,川续断皂苷VI峰面积的RSD=0.86%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:20120210)适量,共6份,分别加入一定量的川续断皂苷VI对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Result of recovery test(n=6)

取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
3.209 1	5.112	5.106 4	10.011	95.94		
3.226 0	5.139	5.106 4	10.102	97.19		
3.211 0	5.115	5.106 4	10.211	99.80	97.92	1.43
3.221 0	5.131	5.106 4	10.116	97.62		
3.215 4	5.122	5.106 4	10.189	99.23		
3.216 1	5.123	5.106 4	10.115	97.76		

2.2.11 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Result of contents determination of samples(n=3)

批号	川续断皂苷VI, mg/片	平均值, mg/片	RSD, %
20120210	13.068		
20120211	13.105	13.142	0.7
20120212	13.252		

3 讨论

本课题组前期根据《贵州省医疗机构制剂技术评审要点

(中药、民族药)(试行)》^[9]相关技术要求,对方中骨碎补、水冬瓜根皮等进行了TLC鉴别,由于结果不易判断、存在阴性对照干扰,故暂不列入质量标准草案。

试验前期,本课题组分别采用Wondasil C₁₈、Aglient ZORBAX SB-C₁₈、Kiomasil ODS 色谱柱进行分析,结果表明Wondasil C₁₈色谱柱分离效果好,故选择Wondasil C₁₈为本研究的色谱柱;分别采用乙腈-0.05%磷酸溶液^[10]、乙腈-水^[11]、甲醇-水^[12]等作为流动相分离检测,上述流动相均能缩短分析时间,但整体来说对于续骨疗伤膏分离情况较差。最后笔者采用乙腈-水洗脱时,本品中川续断皂苷VI峰与杂质峰能较好分离。笔者分别采用柱温25、30℃进行分析,结果表明30℃柱温时分离效果最好,故选择30℃为本研究的柱温。

本课题组分别采用甲醇、50%甲醇、70%乙醇作为提取剂进行分析,结果表明以甲醇提取川续断皂苷VI的含量最高,故选择甲醇为本研究的溶剂。由于本品是膏剂,辅料成分对指标成分川续断皂苷VI的提取干扰比较大,以甲醇为溶剂,分别比较直接加热回流提取、超声提取两种方法^[13]作用30、40、60 min的效果,结果表明超声提取30 min时川续断皂苷VI含量较高,且峰形较好,故选择提取时间为30 min。

综上所述,本研究所建标准可用于续骨疗伤膏的质量控制。

参考文献

- [1] 王衍全,杨豪. 中医筋伤学[M].北京:人民军医出版社,2006:14.
- [2] 宣蛰人. 软组织外科理论与实践[M].北京:人民军医出版社,2004:2.
- [3] 朱汉章. 针灸医学[M].北京:中国中医药出版社,2004:124.
- [4] 徐玲玲,张玉莹,年华. HPLC法测定毓麟合剂中川续断皂苷VI的含量[J]. 中国药房,2010,21(19):1794.
- [5] 彭键. 高效液相色谱法测定跌打丸中川续断皂苷VI的含量[J]. 中南药学,2012,10(1):25.
- [6] 谭洪根,林生,张启伟,等. 高效液相色谱法测定续断药材中川续断皂苷VI的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(9):726.
- [7] 李广润,宫丽丽,吕亚丽,等. 川续断皂苷VI药理作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2014,33(7):477.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S].2015年版[S].北京:中国医药科技出版社,2015:136、208.
- [9] 贵州省食品药品监督管理局. 贵州省医疗机构制剂技术评审要点: 中药、民族药: 试行[EB/OL]. (2009-11-17)[2014-07-23]. http://www.gzhfda.gov.cn/read_Article_13_977.shtml.
- [10] 刘成红,武志. HPLC测定强肾镇痛丸中川续断皂苷VI[J]. 中成药,2009,31(12):1957.
- [11] 张春风,李凯,杨中林. 川续断超微粉与普通粉中川续断皂苷VI溶出特性比较研究[J]. 中成药,2010,32(1):100.
- [12] 张丹,曹纬国,陶燕铎. 不同炮制方法对续断中总皂苷和川续断皂苷VI含量的影响[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(7):1054.
- [13] 曹越,彭维,苏薇薇,等. 续断药材指纹图谱的研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(1):50.

(收稿日期:2015-09-18 修回日期:2015-12-03)

(编辑:张静)