

接骨续筋散质量标准研究

徐 雪,张永萍,吴静澜,徐 剑

(贵阳中医药大学,贵州 贵阳,550025)

[摘要] 目的:制定接骨续筋散的质量控制方法。方法:采用薄层色谱法(TLC)对接骨续筋散中骨碎补、续断、西红花、赤芍、木香进行定性鉴别。采用高效液相色谱法(HPLC)对骨碎补中的柚皮苷进行定量分析。结果:在 TLC 色谱中可鉴别制剂中的骨碎补、续断、西红花、赤芍、木香;柚皮苷在 0.032~3.150mg 范围内呈现良好的线性关系($r=0.9999$),样品中柚皮苷的平均加样回收率为 100.53% ($RSD=2.10\%$)。结论:建立了接骨续筋散的 TLC 定性鉴别方法和 HPLC 定量方法,方法准确、重现性好,可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 接骨续筋散;高效液相色谱法;薄层色谱法;柚皮苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.08.063

Quality standard for Jiegu Xujin powder

XU Xue, ZHANG Yongping, WU Jinglan, XU Jian

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To establish the quality control method for Jiegu Xujin powder. Methods: Thin-layer chromatography (TLC) was used for the qualitative identification of Rhizoma Drynariae, teasel root, Stigma Croci, Radix Paeoniae Rubra, and Saussurea costus in Jiegu Xujin powder. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used for the quantitative analysis of naringin in Rhizoma Drynariae. Results: Rhizoma Drynariae, teasel root, Stigma Croci, Radix Paeoniae Rubra, and Saussurea costus were well identified in TLC. Naringin showed a good linear relationship within the range of 0.032~3.150mg ($r=0.9999$), with an average recovery rate of 100.53% (relative standard deviation = 2.10%). Conclusion: The methods for qualitative identification by TLC and quantitative analysis by HPLC are established for Jiegu Xujin powder. These methods are accurate with good repeatability and can be used for the quality control of this preparation.

[Key words] Jiegu Xujin powder; high-performance liquid chromatography; thin-layer chromatography; naringin

接骨续筋散由骨碎补、白芍、续断、血竭、廔虫等 27 味中药组成,有活血止痛、祛瘀生新、接骨续筋、舒筋活络的功效,主治跌打损伤、瘀血阻滞经络,经脉寒湿阻滞,气血闭阻、筋肉肿痛等证。本品为苗药民间验方,疗效明确,但暂无质控标准保证临床用药。为进一步规范和提高药品质量,保证用药安全、有效,笔者按照新药或医疗制剂规范等要求,建立了接骨续筋散的质量标准,采用薄层色谱法鉴别骨碎补、续断、西红花、木香、赤芍,采用高效液相色谱法测定骨碎补中柚皮苷的含量。现将实验结果报告如下。

1 仪器和试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪(日本岛津 2030, LabSolutions, LC-2030C 3D);电热恒温水浴锅(型号:DK-98-II, 天津

市泰斯特仪器有限公司);超声波清洗器(型号:SK8200H, 上海科号超声仪器有限公司);电热鼓风干燥箱(型号:101-3AB, 天津市泰斯特仪器有限公司);高速离心机(型号:TCL-16B, 上海安亭科学仪器厂);电子天平(型号:JA2003, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 试药 甲醇(批号:20180327, 国药集团化学试剂有限公司);乙腈(批号:20180711, 国药集团化学试剂有限公司);水为娃哈哈纯净水;木香对照药材(批号:0921-200104, 中国食品药品检定研究院);骨碎补对照药材(批号:121169-201304, 中国食品药品检定研究院);赤芍对照药材(批号:121093-201303, 中国食品药品检定研究院);川续断对照品(批号:111685-201707, 中国食品药品检定研

基金项目:贵州省普通高等学校特色重点实验室建设项目(黔教合 KY 字[2016]005);贵州省普通高等学校工程研究中心(黔教合 KY 字[2014]22 号)

第一作者:徐雪,女,2017 级硕士研究生,研究方向:中药、民族药的新剂型及新制剂

通讯作者:张永萍,女,教授,博士研究生导师,研究方向:中药、民族药新制剂与新剂型开发研究, E-mail:1432553893@qq.com

究院);柚皮苷对照品(批号:121009-201707,中国食品药品检定研究院);正丁醇(批号:1701101,上海申博化工有限公司);乙醇(批号:20180319,国药集团化学试剂有限公司);三氯甲烷(批号:170311,西陇科学服务有限公司);浓硫酸(批号:20160601,重庆川东化工有限公司);乙酸乙酯(批号:20180908,天津市富宇精细化工有限公司);盐酸(批号:20101101,重庆川东化工有限公司);甲苯(批号:20180413,国药集团化学试剂有限公司);无水氧化铝(批号:20160118,国药集团化学试剂有限公司);香草醛(批号:20110413,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法和结果

2.1 TLC 鉴定

2.1.1 骨碎补 称取该散剂 5g,加水 50ml,超声 1h,过滤后取滤液 10ml,用 20ml 的乙酸乙酯萃取,取乙酸乙酯层蒸干,残渣加 2ml 甲醇溶解作为供试品溶液。取骨碎补对照药材 0.5g,加甲醇 30ml,加热回流 1h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1ml 溶解,作为对照药材溶液。取除去骨碎补的散剂 5g,按照供试品的处理方法,制成阴性对照溶液。分别精密吸取上述溶液各 4 μ l 点于同一硅胶 G 板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(2:10.5:2.5:4)展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铝试液,置紫外灯(365nm)下检视。如图 1 所示,供试品色谱在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性未见干扰。

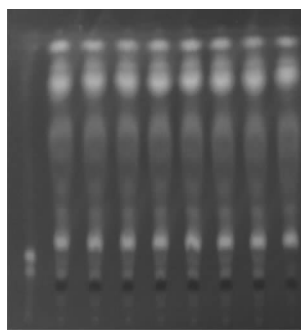
2.1.2 续断 称取该散剂 5g,加 50ml 水,超声 1h,静置过滤,取滤液 10ml,用水饱和的正丁醇萃取 2 次,每次 10ml,合并正丁醇液,用 10ml 的氨试液洗涤 1 次,再用 10ml 的正丁醇饱和的水洗涤,取正丁醇层,蒸干,残渣加 2ml 甲醇作为供试品溶液。取川续断皂苷 VI 对照品,加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液,作为对照品溶液。取除续断和木通的散剂,按照供试品的处理方法,制成阴性对照品溶液。分别精密吸取上述溶液各 5 μ l 点于同一硅胶 G 板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)为展开剂展开,取出晾干,喷以 10% 的硫酸乙醇溶液,加热至斑点清晰。如图 2 所示,供试品色谱在与对照品色谱相同的位置上显相同的颜色斑点,阴性未见干扰。

2.1.3 西红花 称取该散剂 0.5g,加甲醇 10ml,超声 10min,放置使澄清,取上清液作为供试品。取 20mg 西红花对照药材,同法制成对照药材溶液。取除去西红花的散剂 0.5g,同法制成阴性对照溶液。分别精密吸取上述溶液各 5 μ l 点于同一硅胶 G 板上,以乙酸乙酯-甲醇-水(100:16.5:13.5)为展开剂展开,取出,晾干,分别置日光和紫外(365nm)下检视。如图 3 所示,供试品色谱在与对照品色谱相同的位置上显相同的颜色斑点,阴性未见干扰。

2.1.4 赤芍 称取该散剂 5g,加 50ml 水,超声 1h,静置过滤,取滤液 10ml,用水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 10ml,合并正丁醇层,用 2.5ml 的氨试液洗涤 1 次,再用正丁醇饱和的水 7.5ml 洗涤 2 次,取正丁醇层,蒸干,残渣加 2ml 甲醇作

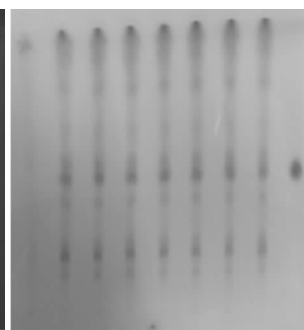
为供试品溶液。另取赤芍对照药材 0.5g,加乙醇 10ml,振摇 5min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2ml 溶解,作为对照药材溶液。取除赤芍和白芍的散剂 5g,按照供试品的处理方法,制成阴性对照溶液。分别精密吸取上述溶液各 3 μ l 点于同一硅胶 G 板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(20:2.5:5:0.5)为展开剂展开,取出,喷以 1% 香草醛硫酸溶液,105℃ 加热至斑点显色清晰。如图 4 所示,供试品色谱在与对照品色谱相同的位置上显相同的颜色斑点,阴性未见干扰。

2.1.5 木香 称取该散剂 3g,加入 10ml 三氯甲烷,超声 30min 后过滤,滤液作为供试品溶液。取木香对照药材 0.5g,加甲醇 10ml,超声 30min 后滤过,滤液作为对照药材溶液。取除木香的散剂 3g,同法制成阴性对照品溶液。分别精密吸取上述溶液各 5 μ l 点于同一硅胶 G 板上,以三氯甲烷-环己烷(5:1)为展开剂展开,取出,晾干,喷以 1% 香草醛硫酸溶液,105℃ 加热至斑点显色清晰^[1]。如图 5 所示,供试品色谱在与对照品色谱相同的位置上显相同的颜色斑点,阴性未见干扰。



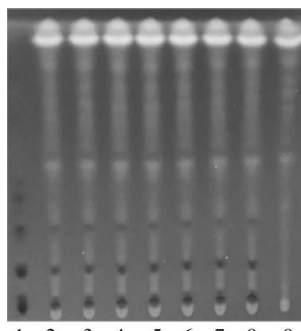
1—骨碎补对照药材
2~8—接骨续筋散供试品
9—阴性(无骨碎补)

图1 骨碎补的薄层色谱图



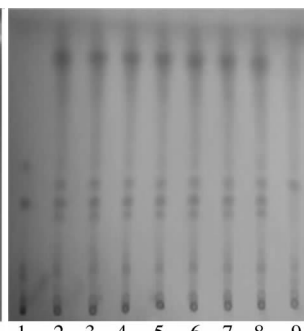
1—阴性(无续断、木通)
2~8—接骨续筋散供试品
9—续断对照品

图2 续断的薄层色谱图



1—西红花对照药材
2~8—接骨续筋散供试品
9—阴性(无西红花)

图3 西红花薄层色谱图



1—赤芍对照药材
2~8—接骨续筋散供试品
9—阴性(无白芍、赤芍)

图4 赤芍薄层色谱图

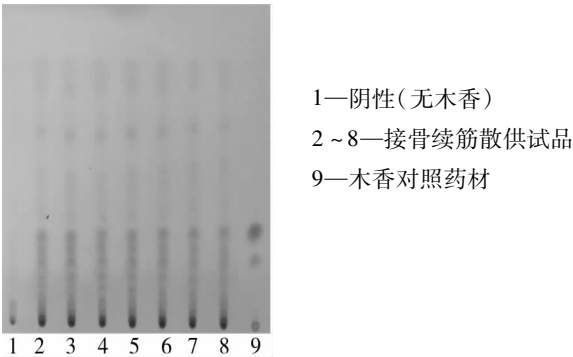


图5 木香薄层色谱图

2.2 柚皮苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:BP-C₁₈(4.6mm×250mm, 5μm);流动相:乙腈-水(14.9:85.1);流速:1.0ml/min;柱温:40℃;检测波长:283nm。进样量:10μl。理论塔板数以柚皮苷峰计,应不低于3000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取柚皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成含柚皮苷0.06mg/ml的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品约1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇10ml,密塞,称定重量,超声处理(功率300W,频率50kHz)1h,取出,放冷,再称定重量,用50%甲醇补足减失的重量,摇匀,离心(13000转离心2min),取续滤液,即得。

2.2.4 专属性考察 取不含骨碎补的空白对照品,按“2.2.3”项下供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液,在上述色谱条件下,取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10μL进样并记录色谱图。结果在与对照品色谱峰相同保留时间的位置上,无色谱峰出现,证明复方中其他药材对柚皮苷的测定没有干扰。(见图6)

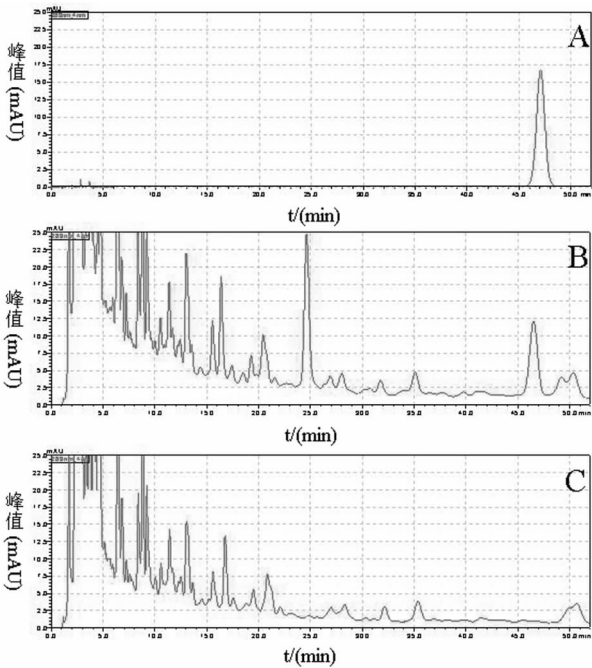
2.2.5 线性关系的考察 精密称取柚皮苷对照品适量,加甲醇制成含0.626mg/ml的母液,再将其稀释为6个不同的质量浓度(0.6260、0.2504、0.1002、0.0401、0.0160、0.0064mg/ml)。以对照品浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,得回归方程Y=20000000X+13329,r=0.9999(n=6)。结果表明柚皮苷在0.0064~0.6260mg/ml范围内,呈线性关系。(见表1)

2.2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液10μl,注入液相色谱仪,重复6次,测定其色谱峰面积值。结果RSD为1.52%(n=6),表明所用仪器具有良好的精密性。(见表2)

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定。结果RSD为1.77%(n=6),表明12h内供试品溶液中柚皮苷的含量基本稳定。(见表3)

2.2.8 重复性试验 取同一份供试品,按“2.2.1”项下色谱条件独立测定6次。结果RSD为1.94%(n=6),表明本

法具有良好的重复性。(见表4)



A—柚皮苷对照品;B—供试品溶液;C—阴性对照

图6 接骨续筋散中柚皮苷的高效液相色谱图

表1 标准曲线数据

浓度(mg/ml)	0.6260	0.2504	0.1002	0.0401	0.0160	0.0064
峰面积	9388539	3882877	1497623	587897	240823	91777
回归方程	Y=20000000X+13329(r=0.9999)					

表2 精密度试验结果

时间(h)	2	4	6	8	10	12
峰面积	942684	950707	967195	970486	969782	982962
RSD(%)	1.77					

表3 稳定性试验结果

时间(h)	2	4	6	8	10	12
峰面积	579639	606805	590053	589791	585245	577872
RSD(%)	1.77					

表4 重复性试验结果

编号	测定值(mg/ml)	平均值(mg/ml)	RSD(%)
1	0.3655	0.3666	1.94
2	0.3532		
3	0.3719		
4	0.3696		
5	0.3673		
6	0.3724		

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量样品适量,共6份,分别加入一定质量浓度的对照品溶液,使其制备后在供试品中的量分别为其限度值的50%(L)、100%(M)、150%(H),每组制备3份。按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录

峰面积并计算加样回收率。将柚皮苷的对照品按高、中、低 3 个浓度加入到样品中,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,精密量取 10 μ l 测定,柚皮苷的平均回收率为 100.53%,RSD 为 2.10%。(见表 5)

表 5 加样回收率试验结果

样品	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
L1	0.5002	0.1863	0.0916	0.2779	101.35		
L2	0.5002	0.1832	0.0916	0.2748	100.64		
L3	0.5002	0.1854	0.0916	0.2770	103.30		
M1	0.5002	0.1777	0.1833	0.3610	96.90		
M2	0.5001	0.1807	0.1833	0.3640	98.58	100.53	2.10
M3	0.5001	0.1819	0.1833	0.3652	99.20		
H1	0.5002	0.1928	0.2746	0.4674	102.83		
H2	0.5003	0.1854	0.2746	0.4600	99.80		
H3	0.5001	0.1928	0.2746	0.4674	102.19		

2.2.10 样品的测定 取同一批接骨续筋散的 3 份样品,分别按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液并测定峰面积,计算柚皮苷的含量。柚皮苷平均含量为 0.3823mg/g,RSD 为 1.68%。(见表 6)

表 6 柚皮苷含量测定结果

样品	峰面积	柚皮苷含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	RSD(%)
1	605898	0.3856	0.3823	1.68
2	589014	0.3749		
3	606944	0.3863		

3 讨 论

3.1 定性鉴别 散剂中骨碎补的鉴定试验中,分别对供试品进行处理后主斑点不清晰,通过查阅文献对不同的溶剂(甲醇、乙醚、乙酸乙酯)进行考察,最后选择乙酸乙酯进行萃取。在甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(1:12:2.5:3)的展开剂条件下,采用均匀设计方法对展开剂进行了考察(1:12:2:3、1:12:2.5:4、2:12:2.5:3、2:12:2.5:3、1.5:12:2.5:3、1:12:2.5:2.5、1:10:2.5:4),进一步优选出展开剂为甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(1:10.5:2.5:4)。结果分离效果好、斑点清晰。分别对 G 板与高效 G 板进行对比,最终高效 G 板分离效果好。散剂中续断采用《中华人民共和国药典》^[2]中的提取方法分离效果差,改用水进行提取,用水饱和的正丁醇、氨试液、正丁醇饱和的水进行萃取,结果杂质少,主斑点清晰。散剂中西红花采用《中华人民共和国药典》^[2]中的方法进行试验,此展开剂受温度影响很大,分别考察了 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃,发现在 35℃ 时主斑点分离效果好,斑点明显,Rf 值合适。散剂中赤芍采用《中华人民共和国药典》^[2]中的方法提取,发现杂点多,且分离效果不好。改用水进行提取,用水饱和的正丁醇、氨试液、正丁醇饱和的水来洗涤,发现杂点少了很多,主斑点明显。在《中华人民共和国药典》^[2]方法,三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(20:

2.5:5:0.1)的基础上对展开剂进行考察(20:3:5:0.1、20:2.5:5:1、15:2.5:5:1),最终选择 20:2.5:5:0.5 进行试验,斑点清晰,与杂点分离效果好。对 25℃、30℃、35℃ 进行了考察,最后发现 35℃ 时最稳定,分离效果最好。散剂中木香采用《中华人民共和国药典》^[2]中的方法进行提取,分离不好,最终选择采用三氯甲烷进行超声提取,用环己烷:甲酸乙酯:甲酸(15:5:1)为展开剂,并进一步考察(12:5:1、10:5:1、15:5:2),发现主斑点不清晰,最终采用三氯甲烷:环己烷(5:1)为展开剂,主斑点清晰。

3.2 含量测定 对流动相进行考察,分别有甲醇-水、甲醇-0.1%、0.2% 乙酸水、甲醇-0.1%、0.2% 磷酸水、乙腈-0.1%、0.2% 磷酸水、乙腈-0.1%、0.2% 甲酸水、乙腈-0.1%、0.2% 磷酸水,结果基于对分离度及色谱柱保护的考虑,最终选择乙腈-水(14.9:85.1)作为流动相。对柱温(30℃、35℃、40℃)进行考察,最后选择了 40℃。对不同的流速(0.8、1.0、1.2ml/min)进行了考察,最后选择了 1.0ml/min。对供试品的提取方法(超声、回流),提取溶剂(乙醇、水、甲醇及 70%、50%、30% 甲醇),超声时间(30min、1h)以及供试品的量(0.5、1g)进行考察,比较含量的大小,最终选择 1g 接骨续筋散溶于 10ml 的 50% 甲醇溶液超声 1h。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典中药材薄层色谱彩色图集[M]. 北京:人民卫生出版社,2009.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:7.

(收稿日期:2019-02-12)

锅巴莲子治小儿厌食

方药:饭锅巴、面锅巴各 150g,怀山药 15g, 莲子、薏苡仁、白术各 10g,焦山楂、焦麦芽、焦神曲各 9g,砂仁(后下)6g,甘草 3g。

用量:每天 1 剂,水煎服。5d 为 1 个疗程。

功效:健脾醒胃,消食导滞。

主治:小儿厌食。

病例验证:李某,男,5 岁。患儿因春节期间过食瓜果肥腻之品,逐渐出现厌食、形体消瘦,经中西医多方治疗,未见好转。刻诊见面色萎黄、脘腹胀满、食少纳呆、尿多便溏、舌淡、苔薄腻等症。此乃饮食不节,食滞中焦,寒温不当,脾困食阻。予此方进 5 剂,患儿饮食倍增,精神好转。效不更方,更进 5 剂,饮食如常,面色红润。(http://paper.cntcm.com.cn/html/content/2019-07/26/content_617524.htm)