

引用:赵启,张琼,胥骞,胥双,袁清照. 基于内病外治法研制的筋骨痛巴布膏质量标准研究[J]. 湖南中医杂志,2020,36(5):148-150,154.

基于内病外治法研制的筋骨痛巴布膏质量标准研究

赵 启¹,张 琼²,胥 骞¹,胥 双¹,袁清照¹

(1. 湖南省中医药研究院附属医院,湖南 长沙,410006;

2. 湘潭医卫职业技术学院,湖南 湘潭,411104)

[摘要] 目的:建立筋骨痛巴布膏的质量标准。方法:筛选方中独活、大黄、苏木及冰片进行薄层色谱鉴别;HPLC法对成品中大黄素进行含量测定。结果:制定了巴布膏中独活等药材的薄层鉴别方法;以大黄素为指标,以Kromasil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)为固定相,甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15)为流动相;检测波长254 nm条件下,成品中大黄素能有效分离,方法学结果可行。结论:该法方便准确、灵敏度高、重现性好,能够为筋骨痛巴布膏质量标准的制订提供客观精准的依据。

[关键词] 内病外治;筋骨痛巴布膏;质量标准;薄层色谱法

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.05.060

Quality standard for cataplasma for bone and muscle pain developed by the method of external treatment for internal diseases

ZHAO Qi¹,ZHANG Qiong²,XU Qian¹,XU Shuang¹,YUAN Qingzhao¹

(1. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;

2. Xiangtan Medicine & Health Vocational College, Xiangtan 411104, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To establish the quality standard for cataplasma for bone and muscle pain. Methods: Thin-layer chromatography (TLC) was performed for Angelica pubescens, Rheum officinale, hematoxylon, and borneol in the prescription, and high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of emodin in the finished product. Results: The TLC identification method was established for the medicinal materials, including Angelica pubescens, in the cataplasma. With the content of emodin as an index, HPLC was performed on a Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (85:15), and at a detection wavelength of 254 nm, emodin was separated effectively from the finished product. The results of methodology showed that this method was feasible. Conclusion: This method is convenient and accurate, with high sensitivity and good repeatability, and therefore, it can provide objective and accurate evidence for developing the quality standard for cataplasma for bone and muscle pain.

[Keywords] external treatment for internal diseases; cataplasma for bone and muscle pain; quality standard; thin-layer chromatography

外治法是中医药治疗疼痛的传统特色疗法,中药外敷治疗骨折历史悠久,优势明显。湖南省中医药研究院附属医院制剂骨伤止痛散是湖南省名中医仇湘中教授的经方制剂,其功能为通经止痛、强筋壮骨,临床主要用于腰椎间盘突出症或骨性、创伤性关节炎所致的疼痛等症。随着现代药物临床应用形式的多元化,中药散剂呈现出越来越多的弊端,如剂量不准确、药效成分利用率低、黏附力差、患者依从性差等。本文所述的新型筋骨痛巴布膏,既保留了原方

的功能及疗效,又扩展了临床适用证。本研究建立了包括薄层鉴别及大黄素的高效液相色谱法(HPLC)含量测定方法,以期对筋骨痛巴布膏的质量标准规范化研究和制剂开发提供实验依据。

1 仪器与试药

薄层色谱成像系统(上海科哲 Goodlook-2000);高效液相色谱仪(waters2489 紫外检测器, waters1525 Binary HPLC Pump);电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器);Kromasil

基金项目:湖南省中医药科研计划项目(201766)

第一作者:赵启,男,副主任医师,研究方向:中医药治疗心血管疾病

通讯作者:袁清照,女,主管药师,研究方向:中药新制剂与质量评价, E-mail: qzyuan601@qq.com

C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。大黄素对照品 (批号: 110756 - 201512), 二氢欧山芹醇当归酸酯对照品 (批号: 111583 - 201605); 独活对照药材 (批号: 120940 - 201511); 冰片对照品 (批号: 110743 - 201504); 苏木对照药材 (批号: 121067 - 201606), 均为中国食品药品检定研究院提供。甲醇、磷酸为色谱纯, 水为去离子水, 其余为分析纯。筋骨痛巴布膏制剂样品 (批号: 20170516、20180225、20180512), 由湖南省中医药研究院附属医院制剂室自制。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别研究

2.1.1 独活 采用薄层色谱法 (TLC) 鉴别。取本品 1 片, 剪成小块, 揭去盖衬, 加甲醇 50 ml, 超声 30 min, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣加甲醇 2 ml 溶解, 作为供试品溶液。同法制备阴性供试品溶液, 另取独活对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法^[1] 吸取上述 3 种溶液各 10 μl, 分别点于同一硅胶薄层板上, 以石油醚 - 乙酸乙酯 (7:3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材相应位置上, 显相同颜色的斑点。斑点清晰, 分离度好, 缺独活阴性未见干扰。(见图 1)

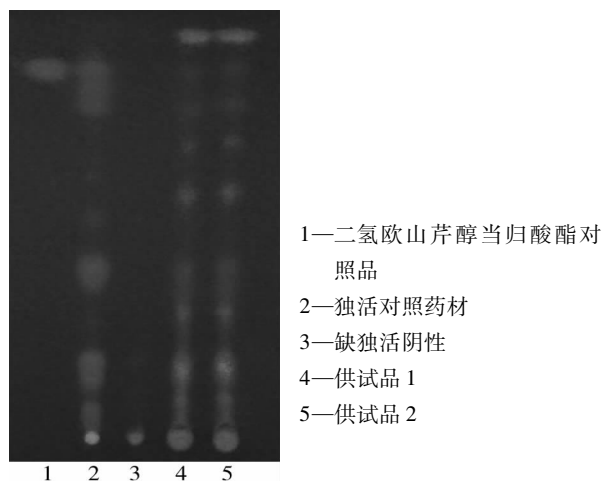


图 1 独活 TLC 色谱图 (荧光 365 nm)

2.1.2 冰片 采用 TLC 鉴别。取本品 1 片, 剪成小块, 揭去盖衬, 加二氯甲烷 20 ml, 超声 30 min, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣加乙醇 2 ml 溶解, 作为供试品溶液。同法制备阴性供试品溶液, 另取冰片对照品, 同法制成 1 ml 含 2 mg 的对照品溶液。照薄层色谱法, 吸取上述 3 种溶液各 10 μl, 分别点于同一硅胶薄层板上, 以环己烷 - 乙酸乙酯 (17:3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 再以 105℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品相应位置上, 显相同颜色的斑点。斑点清晰, 分离度好, 缺冰片阴性未见干扰。(见图 2)

2.1.3 大黄 采用 TLC 鉴别。取本品 1 片, 剪成小块, 揭去盖衬, 加甲醇 20 ml, 超声 30 min, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣加甲醇 2 ml 溶解, 作为供试品溶液。同法制备阴性供试品溶液, 另取大黄素对照品, 同法制成 1 ml 含 2 mg 的对照

品溶液。照薄层色谱法, 吸取上述 3 种溶液各 10 μl, 分别点于同一硅胶薄层板上, 以甲苯 - 三氯甲烷 - 乙酸乙酯 (10:5:4) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品相应位置上, 显相同颜色的斑点。置氨蒸汽中熏后, 斑点变为红色。斑点清晰, 分离度好, 缺大黄阴性未见干扰。(见图 3、图 4)

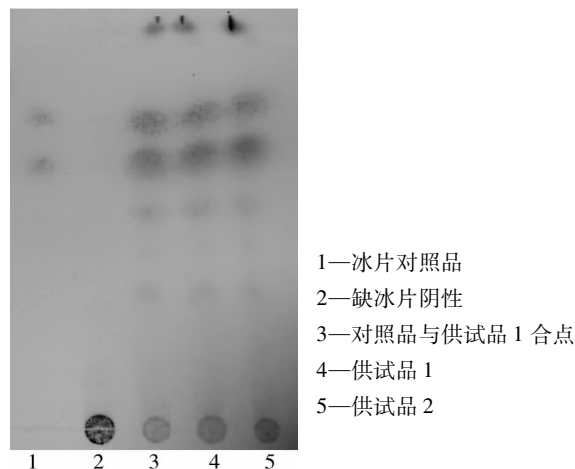


图 2 冰片 TLC 色谱图 (日光)

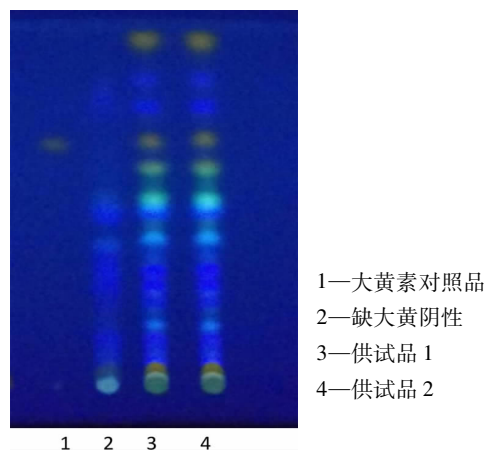


图 3 大黄 TLC 色谱图 (荧光 365 nm)

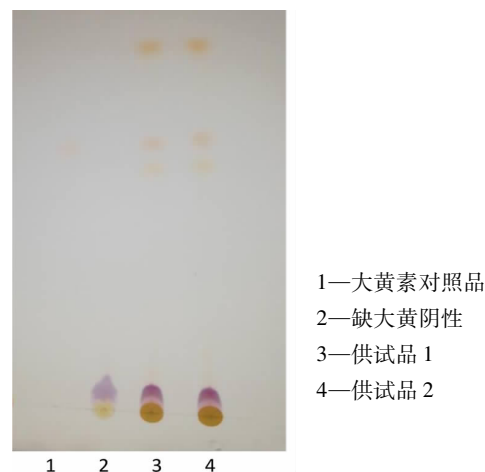


图 4 大黄 TLC 色谱图 (氨熏后日光)

2.1.4 苏木 采用TLC鉴别。取本品1片,剪成小块,揭去盖衬,加甲醇20 ml,超声30 min,滤过,滤液水浴蒸干,残渣加甲醇2 ml溶解,作为供试品溶液。同法制备阴性供试品溶液,另取苏木对照药材1 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法,吸取上述3种溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶薄层板上,以三氯甲烷-丙酮-甲酸(8:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,立即置硅胶干燥器内放置12 h。供试品色谱中,在与对照药材相应位置上,显相同颜色的斑点。斑点清晰,分离度好,缺苏木阴性未见干扰。(见图5)

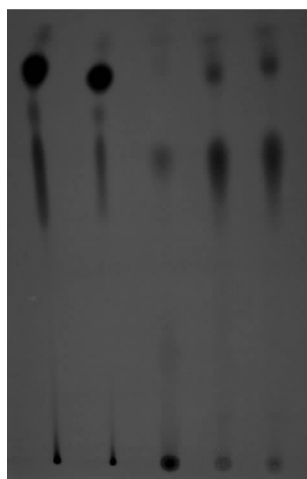


图5 苏木 TLC 色谱图(日光)

2.2 大黄素 HPLC 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱以 C_{18} 为填充剂;以甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15)为流动相;检测波长为254 nm^[2]。理论板数按大黄素峰计算应不低于3000。

2.2.2 对照品溶液制备 取大黄素对照品,精密称定,加甲醇制成每1 ml含大黄素20 μ g的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 取本品2片,膏体约10 g,精密称定,加适量硅藻土研磨,使膏体分散均匀,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇50 ml,称定重量,加热回流1 h,置冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液5 ml,置烧瓶中,挥去溶剂,加8%盐酸溶液10 ml,超声处理2 min,再加二氯甲烷20 ml,加热回流1 h,置冷,并置于分液漏斗中,用少量二氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗中,分取二氯甲烷层,酸液再用二氯甲烷提取3次,每次10 ml,合并二氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,转移至10 ml容量瓶中,加甲醇补足刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性样品溶液制备 按巴布膏处方配比,称取除大黄以外的其余药材适量,按制备工艺制成缺大黄的筋骨痛巴布膏,照2.2.3项下方法制备缺大黄的阴性样品溶液。

2.2.5 方法专属性考察 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各10 μ l,注入液相色谱仪,按2.2.1项下色谱条件测定,得到大黄素对照品、供试品和阴性样品色谱图(见图6、图7、图8)。供试品色谱图中,呈现与对照品相同保留时间的色谱峰,阴性样品无干扰,符合专属性考察要求。

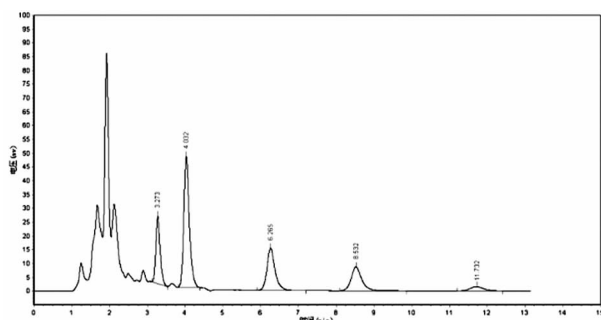


图6 筋骨痛巴布膏样品 HPLC 色谱图

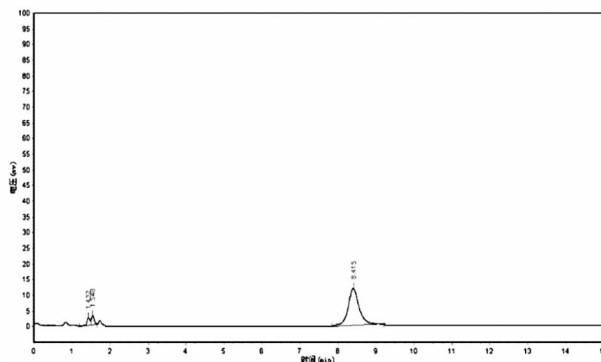


图7 大黄素对照品 HPLC 色谱图

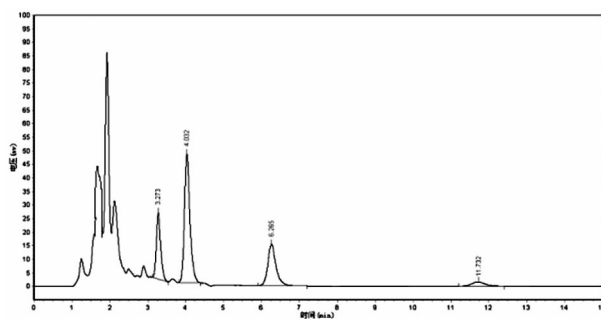


图8 阴性样品 HPLC 色谱图

2.2.6 方法学考察 1)线性关系考察。分别精密称取大黄素对照品溶液2、4、6、8、10、12 μ l注入高效液相色谱仪,测定,以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标绘制标准曲线,曲线方程为: $Y = 27036.15X + 4630.2$, $R^2 = 0.9993$,线性关系良好。2)精密度试验。取同一供试品溶液样品,按照相同色谱条件连续进样5次,每次10 μ l,记录大黄素的峰面积,相对标准偏差(RSD)为1.09%,证明方法的精密度较好。3)稳定性试验。取同一供试品溶液,25℃室温放置,分别于0、4、8、12、16、20 h进样,每次10 μ l,记录色谱图,以峰面积进行计算,测得结果RSD为1.29%。结果表明,供试品溶液在20 h内峰面积值基本稳定。4)重复性试验。取同一巴布膏供试品(批号:20180225)6份,照供试品溶液的制备方法制成供试品溶液,依法测定样品中大黄素的含量, RSD为2.71%。结果表明,该方法重复性较好。5)加样回收率试验。取已测知大黄素含量的样品(批号:20180225,含量为33 mg/g)5 g,精密称定,共取6份,分别精密(下转第154页)

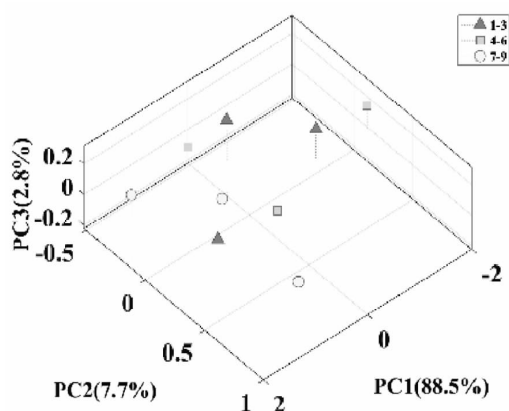


图4 白术药材的PCA三维得分图

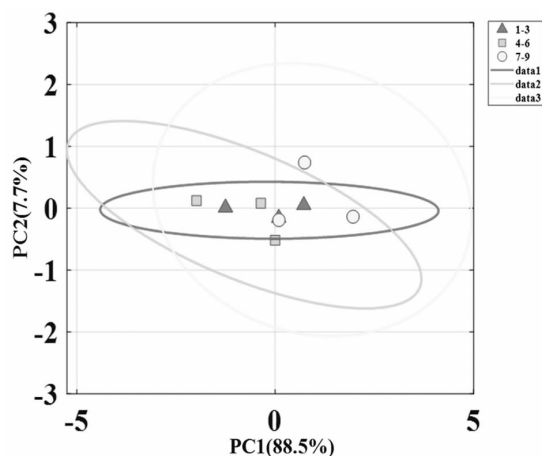


图5 白术药材的PCA二维得分图

4 讨 论

本研究在建立白术药材指纹图谱条件的研究中比较了不同检测波长(210、220、240、250、260、270、280、290、300 nm)条件下的色谱图,检测波长设置为240 nm时,色谱图基线噪音较低,特征峰响应度较高,各成分色谱信息较丰富,因此选择240 nm作为本实验的检测波长。通过对

(上接第150页)加入大黄素对照品溶液(浓度为0.08 mg/ml) 2 ml,按2.2.3项下供试品溶液制备方法处理,依法测定,大黄素的平均回收率为99.51%,RSD为1.52%。结果表明,本方法加样回收率好。

2.2.7 样品含量测定 分别取3批(20170516、20180225、20180512)巴布膏样品,照上述含量测定方法分别测定并计算大黄素含量。经测定,3批样品中大黄素含量分别为34、33、37 mg/g,平均含量达34.6 mg/g。

3 讨 论

由于巴布膏性状黏稠,样品本身不容易处理,指标成分难以溶出,多次尝试后在供试品溶液制备及样品处理时,加入了适量硅藻土混合研磨,使膏体疏松并分散均匀,有助于后续的成分提取^[3]。研究中曾以蛇床子素等指标探索独活的鉴别条件;以阿魏酸等为指标,摸索了当归的鉴别条件;

提取溶剂的种类、用量、提取时间和提取方法等因素的考察,结果表明,用50%甲醇超声提取30 min的提取效果最好。

本研究建立了白术药材HPLC指纹图谱方法,对浙江、湖南、安徽3个产地的9批白术药材从指纹图谱的相对保留时间和相对峰面积分析可知,其所含成分基本一致,含量高低稍有区别。9批药材指纹图谱相似度大于0.96,主成分分析结果也无法鉴别区分这9批药材。因此可认为3个产地的白术药材没有质量差异。

参考文献

- [1] 李伟,文红梅,张爱华,等. 白术质量标准研究——HPLC法测定2种白术内酯的含量[J]. 药物分析杂志,2001,21(3):170-172.
- [2] 杨舒婷,龚华栋,赵云鹏,等. 产地与种源对白术药材质量的影响[J]. 中药材,2013,36(6):890-892.
- [3] 彭华胜,王德群. 白术道地药材的形成与变迁[J]. 中国中药杂志,2004,29(12):1133-1135.
- [4] 李伟,文红梅,崔小兵,等. 白术健脾有效成分研究[J]. 南京中医药大学学报,2006,22(6):366-367.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:103-104.
- [6] 刘青,申洁,肖苏萍,等. 基于多成分含量测定及色谱指纹图谱技术提升白术药材质量标准[J]. 中国现代中药,2019,21(8):1062-1067.
- [7] SUN X, WENG HM. Qualitative evaluation of *Atractylodes Macrocephalae* Rhizoma from different habitats by HPLC-PDA fingerprint combined with UFLC-Q-TOF/MS qualitative identification[J]. Chinese Traditional & Herbal Drugs, 2016, 47(19):3494-3501.
- [8] 寿旦,俞忠明,章建民. 白术高效液相色谱指纹图谱的建立及种源差异分析[J]. 中华中医药杂志,2009,25(3):148-151.
- [9] 陈向东,张光大,兰小勇,等. HPLC指纹图谱对白术药材的质量评价研究[J]. 中药材,2013,36(2):208-212.

(收稿日期:2020-03-12)

以马兜铃酸I为指标,摸索了细辛的鉴别条件;以羟基红花黄色素A为指标,摸索了红花的鉴别条件,均未获得满意结果。考虑其原因在于筋骨痛巴布膏的处方组成较复杂,部分药材指标成分经提取后有所损失,导致含量过低,无法鉴别;其次是巴布膏采用的是水溶性基质,工艺以水煎煮提取为主,成分若为脂溶性成分,则无法充分提取。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(四部)通则0502[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 方彬,吕凤莲,刘传玲,等. 高效液相色谱法测定虎杖中大黄素的含量[J]. 中国药事,2005,19(2):106-107.
- [3] 詹强,陈红梅,俞忠明,等. 痹痛消巴布膏的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学,2018,35(7):1050-1053.

(收稿日期:2020-02-03)