

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.18.009

乳没活络散的鉴别和限量检查研究*

陈思颖¹, 田 勇², 李莉娜^{1,3}, 陆 苑¹, 王永林¹, 李勇军⁴, 王爱民^{4△}

- (1. 贵州医科大学·贵州省药物制剂重点实验室 药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004;
2. 思南田氏民族传统骨伤医院, 贵州 铜仁 565100; 3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004;
4. 贵州医科大学·民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 建立乳没活络散的显微鉴别、薄层色谱鉴别和双酯型生物碱限量检查方法。方法 通过显微鉴别法对乳没活络散成分的外观及性状进行鉴别;通过薄层色谱法(TLC)对乳没活络散中3味药进行定性鉴别,并对制剂中双酯型生物碱进行限量检查。结果 显微鉴别出乳没活络散中含三七、乳香、没药等6味药;TLC法鉴别出乳香、苏木和续断,斑点明显,色谱带清晰,阴性无干扰;TLC法能对乳没活络散中双酯型生物碱限量进行检查。结论 建立的鉴别及检查法稳定可靠,可用于乳没活络散的质量控制。

关键词:乳没活络散;显微鉴别法;薄层色谱法;双酯型生物碱;限量检查;质量控制

中图分类号:R264.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)18-0027-04

Identification and Limit Test of Rumohuoluo San

Chen Siying¹, Tian Yong², Li Lina^{1,3}, Lu Yuan¹, Wang Yonglin¹, Li Yongjun⁴, Wang Aimin⁴

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 2. Sinan Tianshi Traditional Orthopedics and Traumatology Hospital, Tongren, Guizhou, China 565100; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 4. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM <Ministry of Education>, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To establish methods of microscopic identification, TLC identification and limit test of diester alkaloid for Rumohuoluo San. **Methods** The appearance and properties of the components of Rumohuoluo San were identified by microscopic identification, and the three kinds of herbs in Rumohuoluo San were qualitatively identified by TLC, and the amount of diester alkaloids in the preparation was carried out limit test. **Results** Six herbs in Rumohuoluo San were identified by microscopical identification method, including *Panax notoginseng*, *Boswellia carterii* and *Commiphora myrrha*, etc. *Boswellia carterii*, *Caesalpinia sappan* and *Dipsacus asper* were identified by TLC. The spots were obvious, the chromatographic bands were clear, and the negative controls had no interference. The limit concentration of diester alkaloid in Rumohuoluo San could be detected by TLC. **Conclusion** The established identification method and inspection method were stable and reliable, which can be used for the quality control of Rumohuoluo San.

Key words: Rumianhuoluo San; microscopic identification; TLC; diester alkaloids; limit test; quality control

*基金项目:贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金[黔科合人字(2015)11号];贵州省科技计划项目[黔科合平台人才(2016)5613;黔科合平台人才(2016)5677]。

第一作者:陈思颖,女,仡佬族,博士研究生,讲师,研究方向为中药民族药药代动力学与质量控制,(电子信箱)85192139@qq.com。

△通信作者:王爱民,男,回族,教授,研究方向为中药民族药质量控制,(电话)0851-86908468(电子信箱)gywam100@163.com。

- 研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2010(9):9-10.
- [4] 薛斐倩,王绩英. 脱氢卡维丁的药理作用及其相关机制研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(95):58-60.
- [5] 叶 勇,黄秋洁,刘华钢. 高效液相色谱法测定不同来源岩黄连中不同部位脱氢卡维丁含量[J]. 医药导报, 2015, 34(1):99.
- [6] 黄其春,涂文升,龙俊青,等. 广西各地岩黄连药材中脱氢卡维丁含量考察[J]. 中国药业, 2009, 18(23):9-10.
- [7] 张 毅,张建华,柴 智,等. 毛黄堇药材的生物学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(10):814-818.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:303.
- [9] 吴 杨,陆兔林,季 德,等. 岩黄连中生物碱的分离和结构鉴定[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(1):81-83.
- [10] 王 静,陆兔林,毛春芹,等. 岩黄连药材的提取工艺研究[J]. 医药导报, 2010, 29(3):360-363.
- [11] 龚志强,谢丽莎,黄茂春. HPLC测定广西4个产地野生岩黄连药材中脱氢卡维丁的含量[J]. 中国医药指南, 2013, 11(3):480-481.
- [12] 胡 芳,陆兔林,毛春芹,等. HPLC测定岩黄连生物总碱中脱氢卡维丁、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):68-71.
- [13] 程 华,熊 斌,丁碧军,等. RP-HPLC法测定岩黄连注射液中的脱氢卡维丁的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(33):2601-2602.
- (收稿日期:2018-01-10;修回日期:2018-03-09)

乳没活络散是贵州省思南田氏民族传统骨伤医院根据具有 200 多年民间药用历史的家传秘方研制开发的医疗机构制剂(黔药制字 Z20170134),具有活血化瘀、舒经活络、消肿止痛的功效,可用于治疗闭合性骨折、跌打扭伤及骨伤病变等疾病。该方针对骨折、跌打扭伤“气滞血瘀证”遣方用药,由三七、乳香、没药、制川乌、制草乌等 10 味中药组方,经过 30 余年的临床使用,疗效显著,深受患者欢迎。本研究中参考相关标准和文献制订了乳没活络散的显微鉴别方法,对乳香、苏木、续断进行薄层色谱(TLC)鉴别,对制川乌、制草乌中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱限量进行检查,以控制乳没活络散的质量,提高临床用药的有效性和安全性。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

尼康 50i 显微镜和尼康 DS-Fi2 成像系统(放大倍率为 10~1 500 倍,日本尼康公司);TLC ACANNER 3 型薄层色谱成像系统(瑞士卡玛公司,参数:230 V,50/60 Hz,80 VA,UV 254/366 nm 紫外光管,400~750 nm 白光管);CQ-250A-ST 型超声波清洗机(四川中浪科技有限公司)。

1.2 试药

乳香对照药材(批号为 120970-201305,规格为 0.5 g),没药(天然没药)对照药材(批号为 120967-201405,规格为 1 g),苏木对照药材(批号为 121067-201606,规格为 1 g),续断对照药材(批号为 121-33-201311,规格为 2 g),均购自中国食品药品检定研究院;乌头碱对照品(批号为 150325,规格为 20 mg),次乌头

碱对照品(批号为 150811,规格为 20 mg),新乌头碱对照品(批号为 150913,规格为 20 mg),均购自四川省维克奇生物科技有限公司,上述对照品经高效液相色谱(HPLC)法测定含量均不低于 98%;三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司,批号为 20160803,规格为每瓶 0.5 L)等试剂均为分析纯;硅胶 G 和硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工厂,规格为 100 mm×100 mm);水为超纯水。

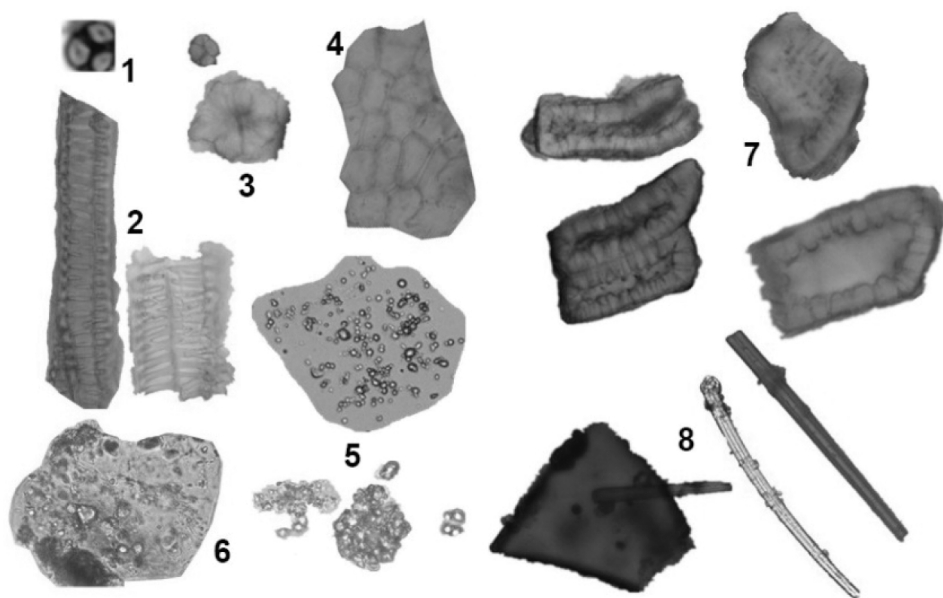
2 方法与结果

2.1 显微鉴别^[1-5]

参照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 2001“显微鉴别法”,取乳没活络散,按粉末制片法制片后置显微镜下观察,结果见图 1。淀粉粒众多,网纹、梯纹导管,草酸钙簇晶,木栓细胞长方形或多角形(三七);不规则团块,无色或淡黄色,表面及周围扩散出众多细小颗粒(乳香);不规则碎块,淡黄色半透明渗出油滴(没药);石细胞呈长方形或类长方形,直径 40~120 μm(制川乌和制草乌);体壁碎片上有短粗或细长刚毛(土鳖虫)。

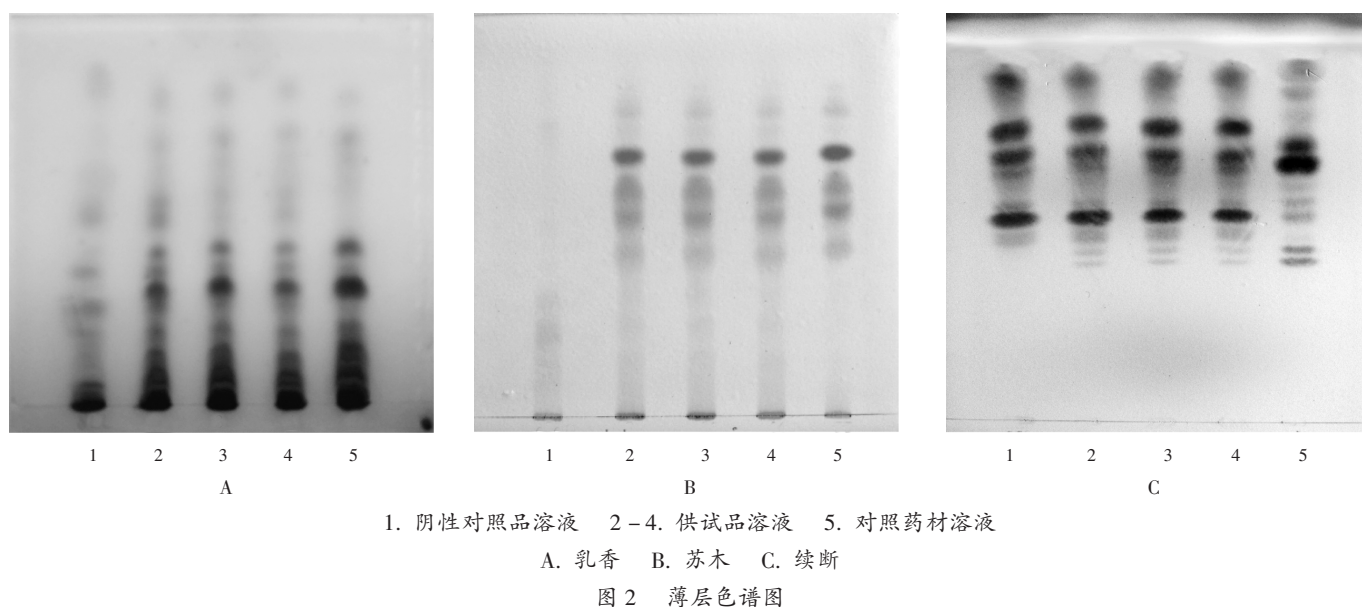
2.2 薄层色谱鉴别

乳香^[1,6-10]:取乳没活络散 3 g,加无水乙醇 15 mL,超声处理 15 min,滤过,水浴浓缩至 2 mL,作为供试品溶液;另取缺乳香的阴性制剂,同法制备阴性对照品溶液;再取乳香对照药材适量,同法处理,制得对照药材溶液。分别吸取上述 3 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90℃)-甲苯-乙酸乙酯(10:1.5:1.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 的香草醛硫酸溶液(以 60% 硫酸水溶液作为溶剂),在 105℃



1. 淀粉粒(三七) 2. 导管(三七) 3. 草酸钙簇晶(三七) 4. 木栓细胞(三七) 5. 不规则团块(乳香) 6. 不规则碎块(没药)
7. 石细胞(制川乌,制草乌) 8. 刚毛(土鳖虫)

图1 乳没活络散显微鉴别图



加热至斑点显色清晰。结果斑点清晰,比移(R_f)值适中。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图2 A。

苏木^[1,9-10]:取乳没活络散1 g,置索式提取器中,加乙醚适量加热回流除去脂溶性成分,药渣挥干乙醚,再加甲醇适量,加热回流提取1 h,甲醇提取液挥干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液;另取缺苏木的阴性制剂,同法制备阴性对照品溶液;再取苏木对照药材0.5 g,同法处理,制得对照药材溶液。分别吸取上述供试品溶液和阴性对照品溶液各10 μ L,对照药材溶液5 μ L,分别点于同一硅胶GF₂₅₄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,分别置日光和紫外光灯(254 nm)下视检,室温放置12 h后日光下再次检视。结果室温放置12 h后色谱斑点显色清晰,供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图2 B。

续断^[1,11-13]:取乳没活络散0.5 g,加甲醇适量,超声处理25 min,滤过,滤液蒸至近干,残渣加水20 mL使溶解,滤过,滤液加浓氨水5 mL,再加水饱和的正丁醇提取3次,每次15 mL,合并上层溶液,加正丁醇饱和的水洗涤3次,每次15 mL,合并上层溶液,蒸至近干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取缺苏木的阴性制剂0.5 g,同法制备阴性对照品溶液,再取续断对照药材0.1 g,同法制成对照药材溶液。分别吸取对照药材溶液2 μ L,供试品溶液和阴性对照品溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)10 $^{\circ}$ C以下放置的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,且阴性对照无干

扰。详见图2 C。

2.3 双酯型生物碱限量检查^[1,13-14]

生川乌和生草乌中含有以乌头碱、新乌头碱和次乌头碱为主的毒性成分双酯型生物碱,经炮制后水解为毒性较低的单酯型生物碱。为控制乳没活络散质量,本研究中对制剂中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的限量检查进行了研究。

取乳没活络散10 g,加氨试液20 mL拌匀,放置1 h,加三氯甲烷100 mL,加浓氨水4 mL,超声处理30 min,滤过,残渣和滤器用适量三氯甲烷洗涤,洗涤液与滤液合并,分取三氯甲烷层,置分液漏斗中,用5%盐酸溶液提取3次,每次20 mL,合并上层溶液,用浓氨水调节pH至11~12,用三氯甲烷提取3次,每次20 mL,合并下层溶液,回收至干,残渣加甲醇溶解成1 mL,作为供试品溶液;取缺制川乌、制草乌的阴性制剂,同法制备阴性对照品溶液;取缺制川乌、制草乌的阴性制剂,分别加入乌头碱、新乌头碱和次乌头碱对照品适量,同法制备阴性对照品溶液加混合对照品溶液。再取乌头碱、新乌头碱和次乌头碱对照品适量,用0.1%甲酸甲醇溶液溶解,制成0.48,0.24,0.12 g/L 3种质量浓度的混合对照品溶液。分别吸取供试品溶液10 μ L和3种质量浓度的混合对照品溶液5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇(3.2:1.8:1)为展开剂,置氨蒸气饱和30 min的展开缸内展开,取出,晾干,喷以稀碘化铋钾试液,在日光下检视。结果阴性对照无干扰,质量浓度为0.48,0.24 g/L的乌头碱、新乌头碱和次乌头碱显色清晰,质量浓度为0.12 g/L的乌头碱、新乌头碱和次乌头碱显色不明显,表明本方法检测乌头碱、新乌头碱和次乌头碱检出限为1.2 μ g(0.24 g/L对照品溶液点样5 μ L),详见图3。

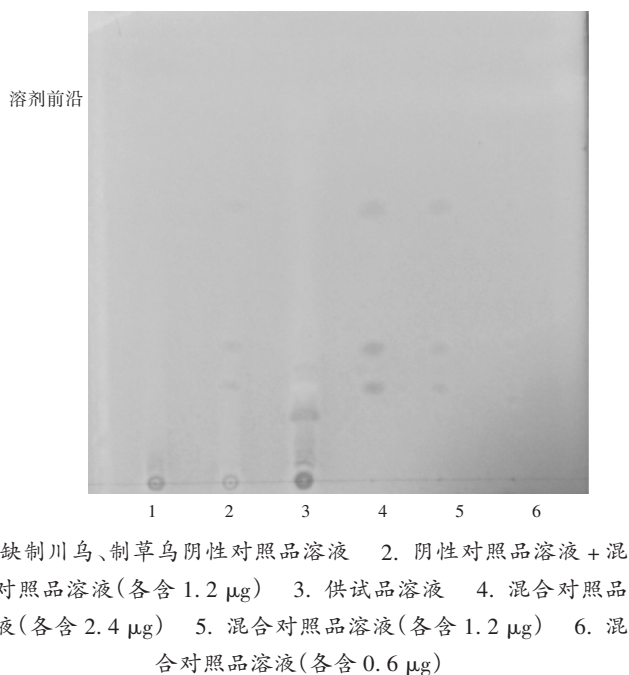


图3 双酯型生物碱限量确定薄层色谱图

吸取上述质量浓度为 0.24 g/L 对照品溶液 5 μ L, 供试品溶液和阴性对照品溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 同法展开显色。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上出现的斑点应小于对照品溶液的斑点或不出现斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 4。

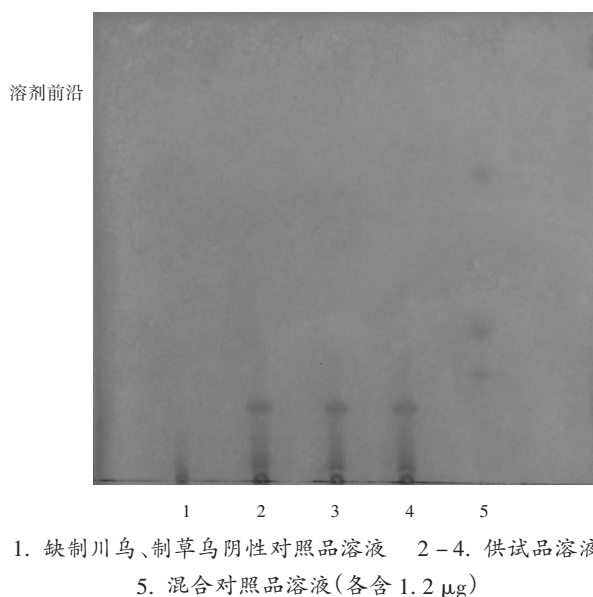


图4 双酯型生物碱限量检查薄层色谱图

3 讨论

乳香鉴别试验中, 分别以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) - 甲苯 - 乙酸乙酯(10:1.5:1.5)、石油醚 - 甲苯 - 乙酸乙酯(10:1.5:1)及石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) - 甲苯 - 乙酸乙酯(10:1.5:0.5)为展开剂, 结果以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) -

甲苯 - 乙酸乙酯(10:1.5:1)为展开剂时展开效果较好, 斑点清晰, R_f 值适中, 故试验中选用以其为展开剂。

双酯型生物碱的限量检查中, 发现乌头碱、新乌头碱和次乌头碱在甲醇中稳定性较差, 混合对照品溶液在含 0.1% 甲酸的甲醇溶液中稳定性较好。

乳没活络散中制川乌和制草乌占全方的 6%, 2015 年版《中国药典(一部)》制川乌和制草乌项下规定, 双酯型生物碱以乌头碱、次乌头碱及新乌头碱的总量计, 均不得超过 0.04%。因此, 10 g 制剂中双酯型生物碱以乌头碱、新乌头碱和次乌头碱总量不得超过 0.24 mg ($10\text{ g} \times 6\% \times 0.04\% = 0.24\text{ mg}$, 经供试品溶液制备后, 3 种生物碱均为 0.24 g/L)。为保证制剂的安全性, 供试品中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱在薄层色谱上的斑点不得比 0.24 g/L 对照品溶液点样 5 μ L 的斑点深(即 10 g 乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的限量不高于 0.24 mg)。

参考文献:

- [1] 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, 2015:200-202.
- [2] 邵燕, 辛俐华, 孙金霞, 等. 鳖甲煎丸中 3 种昆虫药刚毛及体壁碎片的显微鉴别研究[J]. 中成药, 2012, 34(12):2358-2361.
- [3] 冯振来, 任丽莉, 杨立志. 接骨散质量标准研究[J]. 中外健康文摘, 2013, 10(17):409.
- [4] 秦雪梅, 漆小梅, 白云娥, 等. 不同商品规格三七药材的质量研究[J]. 中草药, 1999, 30(3):222-223.
- [5] 邓志军, 陈剑梅, 郭洁文. 三七与其混伪品的生药学鉴别[J]. 今日药学, 2011, 21(9):553-555.
- [6] 王苏会, 王瑞, 闫荟, 等. 消骨增贴中乳香、没药的薄层鉴别[J]. 中国医药导刊, 2009, 11(1):151-152.
- [7] 夏磊, 宋志前, 张琳琳, 等. 乳香及含乳香中成药中乳香酸类薄层层析鉴别[J]. 中成药, 2012, 34(7):1403-1404.
- [8] 蒋敏, 段海燕. 接骨七厘片中血竭、乳香、没药的薄层色谱鉴别[J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(4):30-31.
- [9] 方磊, 姚蓉, 罗疆南, 等. 愈伤接骨丹薄层色谱定性鉴别研究[J]. 中国药业, 2013, 22(13):25-26.
- [10] 赵严丽. 十一味降香驳骨片主药的薄层色谱研究[J]. 中国药业, 2017, 26(18):25-26.
- [11] 袁玲艳, 赵永慧, 赵嘉琳, 等. 续断通络胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):96-98.
- [12] 袁杰, 刘道芳. 接骨灵贴膏质量标准的研究[J]. 中成药, 2016, 38(3):575-578.
- [13] 唐凤岚, 王静, 周梁. 风湿灵片的薄层色谱鉴别方法研究[J]. 中国药业, 2013, 22(17):33-34.
- [14] 李霞, 邓恢进, 张先胜. 复伤糖浆的薄层鉴别及乌头碱限量的检查方法研究[J]. 中国医药指南, 2016, 14(35):20-21.

(收稿日期:2018-01-10;修回日期:2018-04-08)