

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.21.007

玉龙贴膏质量标准研究*

刘东文,何宝凝[△],陈韵姿,陈淑映,李怀国

(广东省佛山市中医院制剂中心,广东 佛山 528000)

摘要:目的 建立玉龙贴膏的质量标准。方法 采用薄层色谱法鉴别方中赤芍、肉桂。采用高效液相色谱法测定芍药苷的含量和乌头碱的限量,色谱柱为 XTerra RP₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);芍药苷含量测定的流动相为甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(40:65),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 230 nm;乌头碱限量检查的流动相为甲醇-0.1% 三乙胺(70:30),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 235 nm。结果 薄层色谱鉴别斑点清晰,阴性对照无干扰,专属性强,重复性良好;芍药苷进样量在 0.515~10.300 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 2$),平均回收率为 98.35%,RSD 为 0.94% ($n=6$);乌头碱进样量在 0.301 2~3.012 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 0$),平均回收率为 97.87%,RSD 为 1.13% ($n=6$)。结论 建立的定性定量方法简便、可靠、准确,可作为玉龙贴膏的质量控制标准。

关键词:玉龙贴膏;质量标准;芍药苷;乌头碱;含量测定;高效液相色谱法

中图分类号:R932;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)21-0023-04

Study on Quality Standard of Yulong Plaster

Liu Dongwen, He Baoning, Chen Yunzi, Chen Shuying, Li Huaiguo

(Pharmaceutical Center, Foshan Hospital of TCM, Foshan, Guangdong, China 528000)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Yulong Plaster. **Methods** *Radix Paeoniae Rubra* and *Cortex Cinnamomi* were identified by TLC method. The content of peoniflorin and limit examination of aconitine were determined by HPLC method. The chromatographic column was XTerra RP₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase of peoniflorin consisted of methanol-0.05 mol/L monopotassium phosphate solution(40:65), the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelength was 230 nm. The mobile phase of aconitine consisted of methanol-0.1% triethylamine(70:30), the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelength was 235 nm. **Results** The TLC method had clear spots, strong specificity and good repeatability, the negative control had no interference. Peoniflorin showed a good linear relationship within the range of 0.515-10.300 μg($r=0.999\ 2$), the average recovery rate was 98.35%, and the RSD was 0.94% ($n=6$). Aconitine showed a good linear relationship within the range of 0.301 2-3.012 0 μg ($r=0.999\ 0$), the average recovery rate was 97.87% and RSD was 1.13% ($n=6$). **Conclusion** The established qualitative and quantitative methods are simple, reliable and accurate, which can be used for the quality control of Yulong Plaster.

Key words: Yulong Plaster; quality control; peoniflorin; aconitine; content determination; HPLC

温经玉龙散是佛山市中医院骨科的临床验方,由赤芍、肉桂、生草乌、白芷、干姜等组方,能温经散寒、活血止痛,主要用于跌打旧患、寒邪着络引起的关节酸痛或外科关节痛等症,临床已使用近 50 年,疗效确切^[1-3]。但由于使用时要加水、蜜糖等煮成糊状再敷于患处,并用绷带固定,导致使用不便,且使关节活动受限。为满足临床用药需要,本研究中拟以温经玉龙散为配方,以热熔压敏胶为基质研制出新的贴膏剂玉龙贴膏。热熔压敏胶是继溶剂型和乳液型压敏胶之后的第 3 代压敏胶产品,以热塑性聚合物为主体成分,兼有热熔和压敏双重特性,为近年经皮给药系统研究的热点^[4]。方中生草乌所含乌头碱既是有效成分,又是毒性成分,因此严格控制其含量十分必要。本研究对方中主要药味进行了定性、定量研究,可为质量标准的制订和临床安全用药提

供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 1525 型高效液相色谱仪,2996 型紫外检测器(美国 Waters 公司);CPA225D 型十万分之一电子天平(赛多利斯公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DT5-1 型低速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

1.2 试剂

玉龙贴膏(医院自制制剂,批号分别为 3081603,3081604,3081605,规格为每片 9 cm);芍药苷对照品(批号为 110736-201438),桂皮醛对照品(批号为 110710-201217),乌头碱对照品(批号为 110720-201111),均由中国食品药品检定研究院提供。预制硅胶

*基金项目:广东省佛山市科技局项目[2015AB00348]。

第一作者:刘东文,女,大学本科,主任药师,主要从事医院制剂质量管理工作,(电话)0757-81092310。

[△]通信作者:何宝凝,女,大学本科,主管药师,主要从事医院制剂检验及新制剂开发工作,(电话)0757-81092310。

G 薄层板(德国默克公司);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 制备方法

取赤芍、肉桂、生草乌、白芷、干姜等药材,粉碎成细粉,过筛,混匀,加入融化成液态的热熔压敏胶和适量辅料,搅拌均匀,涂布,冷却,切片,制成 1 000 片,即得,每片含赤芍、生草乌的生药量均为 0.84 g,含肉桂生药量为 0.42 g。

2.2 薄层色谱鉴别

2.2.1 赤芍

取本品 2 片,除去盖衬,剪成小块,加乙醇 80 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取芍药苷对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。按处方比例及制法,以淀粉代替赤芍制成不含赤芍的阴性样品,取 2 片,按供试品溶液制备方法制成缺赤芍的阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则中薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)为展开剂^{[5]158},展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照品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。结果见图 1 A。

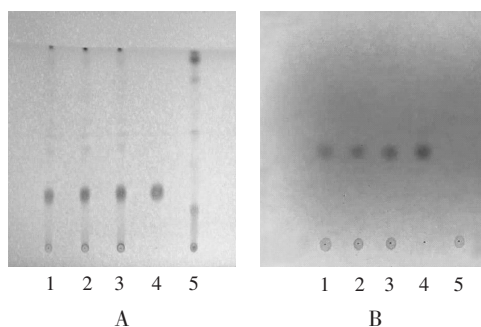
2.2.2 肉桂

取本品 1 片,除去盖衬,剪成小块,加乙醇 10 mL,冷浸 30 min,时时振摇,滤过,取滤液作为供试品溶液。另取桂皮醛对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 1 μ L 的溶液,作为对照品溶液。按处方比例及制法,以淀粉代替肉桂制成不含肉桂的阴性样品,取 1 片,按供试品溶液制备方法制成缺肉桂的阴性对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则中薄层色谱法试验,吸取供试品溶液和缺肉桂的阴性对照品溶液各 5 μ L,对照品溶液 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(17:3)为展开剂^{[5]137},展开,取出,晾干,喷以二硝基苯肼乙醇试液。供试品溶液色谱中,在与对照品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。结果见图 1 B。

2.3 芍药苷含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:XTerra RP₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(38:62);检测波长:230 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μ L。



1-3. 供试品溶液(批号分别为 3081603, 3081604, 3081605)

4. 对照品溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 赤芍(温度为 23 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 66%)

B. 肉桂(温度为 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 67%)

图 1 薄层色谱图

理论板数以芍药苷峰计应不低于 3 000。

2.3.2 溶液制备

取同一批(批号为 3081603)样品 10 片,除去盖衬,精密称定,粉碎,混匀,取相当于 1 片的质量,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入 50% 乙醇 50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,再用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。取经五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成含芍药苷 0.515 0 g/L 的溶液,作为对照品溶液。按处方比例取除赤芍外的其余成分制成缺赤芍的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

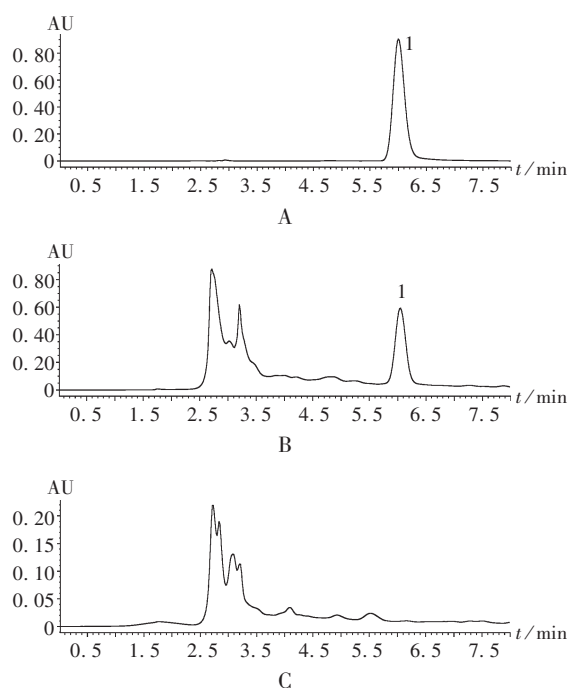
2.3.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取 2.3.2 项下 3 种溶液各 10 μ L,按拟订色谱条件测定,记录色谱图,详见图 2。结果在与对照品溶液相应位置上,供试品溶液有色谱峰,阴性对照品溶液无色谱峰,表明阴性对照无干扰。

线性关系考察:精密吸取芍药苷对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μ L,按拟订色谱条件测定,以峰面积(Y)对芍药苷进样量(X)进行回归,得线性方程 $Y = 1.55 \times 10^6 X + 2.38 \times 10^5$, $r = 0.999 2$ ($n = 6$)。结果表明,芍药苷进样量在 0.515 ~ 10.300 μ g 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液,重复进样 6 次,测定。结果芍药苷峰面积的 RSD 为 0.46% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 3081603)样品 6 份,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,测定含量。结果芍药苷平均含量为每片 0.027 7 g, RSD 为 0.57% ($n = 6$),表明方法重复性良好。



1. 芍药苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 芍药苷高效液相色谱图

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0,4,8,12,18,24 h时进样,依法测定,记录峰面积。结果的RSD为1.02% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为3081603)6份,分别精密加入芍药苷对照品,依法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果见表1。

表1 芍药苷加样回收试验结果($n=6$)

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.554 0	0.515 0	1.058 0	97.86		
0.551 3	0.515 0	1.060 6	98.89		
0.553 8	0.515 0	1.067 3	99.71	98.35	0.94
0.561 9	0.515 0	1.061 5	97.01		
0.546 6	0.515 0	1.053 8	98.49		
0.557 1	0.515 0	1.062 4	98.12		

2.3.4 样品含量测定

取3批样品,依法制备供试品溶液,进样测定。结果批号为3081603,3081604,3081605的样品中每片平均含量分别为0.027 7,0.027 5,0.026 4 g,RSD分别为0.57%,0.61%,0.51% ($n=3$)。

2.4 乌头碱限量检查

2.4.1 色谱条件

色谱柱:X Terra RP₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%三乙胺(70:30);检测波长:235 nm;

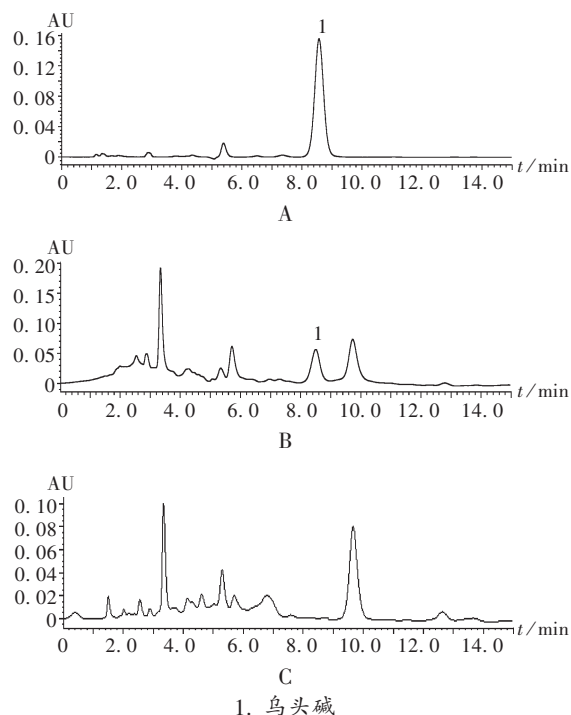
流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。理论板数以乌头碱峰计应不低于3 000。

2.4.2 溶液制备

取同一批(批号为3081603)号的样品10片,除去盖衬,精密称定,剪碎,混匀,取相当于1片的质量,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨水20 mL,静置5 min,再加乙醚50 mL,冷浸24 h,转移至离心管中,在3 000 r/min的转速离心5 min,取乙醚层,沉淀用乙醚洗涤5次,每次20 mL,合并乙醚液,低温(<40℃)挥干,残渣精密加甲醇5 mL溶解,密塞,摇匀,再用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。取乌头碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成含乌头碱0.301 2 g/L的溶液,作为对照品溶液。按处方比例取除生草乌外的其余成分制成缺生草乌的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.4.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取2.4.2项下3种溶液各10 μL,按拟订色谱条件测定,记录色谱图,详见图3。结果在与对照品溶液色谱相应位置上,供试品溶液有色谱峰,阴性对照品溶液无色谱峰,表明阴性对照无干扰。



1. 乌头碱

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 乌头碱高效液相色谱图

线性关系考察:精密吸取乌头碱对照品原液1.0,2.0,3.0,5.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,连同乌头碱对照品原液按拟订色谱条件进行测定,以峰面积(Y)对乌头碱质量浓度(X)进行回归,得线性方

程 $Y = 4.61 \times 10^4 X - 5.53 \times 10^5$, $r = 0.999\ 0$ ($n = 4$)。结果表明,乌头碱进样量在 $0.301\ 2 \sim 3.012\ 0\ \mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取质量浓度为 $0.301\ 2\ \text{g/L}$ 的乌头碱对照品溶液,重复进样 6 次,测定。结果乌头碱峰面积的 RSD 为 0.87% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 3081603)样品 6 份,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,测定含量。结果乌头碱平均含量为每片 $0.451\ 8\ \text{mg}$, RSD 为 1.27% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,因乌头碱溶液不稳定,故存放于冰箱中,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 时各进样 $10\ \mu\text{L}$, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.93% ($n = 5$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 3081603)6 份,分别精密加入乌头碱对照品,依法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果见表 2。

表 2 乌头碱加样回收试验结果($n = 6$)

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.459 0	0.301 2	0.756 3	98.71	97.87	1.13
0.456 3	0.301 2	0.749 5	97.34		
0.446 8	0.301 2	0.745 4	99.14		
0.460 4	0.301 2	0.757 6	98.67		
0.445 7	0.301 2	0.737 5	96.88		
0.463 1	0.301 2	0.753 7	96.48		

2.4.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,进样测定。结果批号为 3081603, 3081604, 3081605 的样品中,乌头碱每片平均含量分别为 $0.451\ 8$, $0.445\ 7$, $0.455\ 2\ \text{mg}$, RSD 分别为 1.27% , 1.14% , 1.36% ($n = 3$)。

3 讨论

玉龙贴膏为新型的中药橡胶膏剂,具有组成复杂、主药含量少和基质难于去除的特点。基质与待测成分分离是橡胶膏剂含量测定的关键,在制订质量标准时要考虑所选成分的代表性及测定方法的可行性。赤芍是方中主药,其主要有效成分为芍药苷,因此选择芍药苷的含量作为一个质控指标。比较了芍药苷多个提取方法[无水乙醇回流提取、50%乙醇回流提取^[6]、甲醇回流提取^[7]和甲醇回流提取后过柱^[8]],比较了提取时间 20, 40, 60 min, 结果发现 50%乙醇回流提取 60 min 提取率最高。因此,采用该方法作为本品芍药苷的含量测定方法。根据 2015 年版《中国药典(一部)》赤芍饮片项下规定含芍药苷不得

少于 1.5% , 按理论计算本品每片含芍药苷应不少于 $0.012\ 6\ \text{g}$ 。本研究中对玉龙贴膏 3 批次的样品进行芍药苷的含量测定,结果均符合规定。

草乌为国家规定的 28 种有毒中药材之一,为保证制剂产品质量和临床安全用药,必须严格控制其使用量,而《中国药典》并未对生草乌外用作出限量规定。参考原卫生部药典委员会《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》标准,含草乌的外用制剂只有一个制剂品种,即乌头酊,乌头碱的限量规定为 $0.045\% \sim 0.055\%$ (g/mL)^[9]。因此,玉龙贴膏含乌头碱应为每片 $0.378 \sim 0.462\ \text{mg}$ 。本研究中对玉龙贴膏 3 批次的样品进行乌头碱的限量检查,结果均符合规定。

乌头碱的提取方法有多种,氨乙醚冷浸、氨乙醚超声提取、酸提氯仿萃取、酸提乙醚萃取^[10]等,经比较后选取提取效率较高的氨乙醚冷浸法。在流动相比例选择上,曾采用甲醇-0.2%三乙胺(66:34)、甲醇-0.2%三乙胺(60:40),但分离效果不理想,最后选用甲醇-0.1%三乙胺(70:30)为流动相,分离效果好。采用高效液相色谱法测定乌头碱的含量,准确,可靠,较薄层色谱法能更准确地反映药品的毒性水平,可更好地指导生产,为临床安全用药提供依据。

参考文献:

- [1] 李丹凤,邱沈虹,杜雪莲,等. 玉龙散外敷治疗腰椎间盘突出症腿腿疼痛的效果观察[J]. 护理学报,2013,20(7A):51-53.
- [2] 范伟锋,陈衍尧,朱秋贤,等. 玉龙散外敷对椎动脉型颈椎病血流动力学参数的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(8):47-49.
- [3] 莫兴骊,张兆华,陈淑萍. 玉龙散外敷治疗肩周炎的疗效观察[J]. 中西医结合心血管病杂志,2016,4(20):178-179.
- [4] 王承满,汤秀珍,沈平壤,等. 热熔压敏胶应用于中药贴剂的研究进展[J]. 中草药,2010,41(3):496-499.
- [5] 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.
- [6] 吴雅崑,王琦. 乳癖消巴布膏质量标准研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(8):240-242.
- [7] 刘新. 痹舒巴布剂的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2005.
- [8] 齐红. 乳康巴布剂的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2004.
- [9] 刘小鸣,吴瑞环,张振凌,等. 中药成方制剂中含乌头碱类中药制剂质量标准分析[J]. 中国药事,2015,29(4):450-456.
- [10] 随志刚,陈明玉,刘志强,等. 草乌中乌头类生物碱提取方法比较研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(3):513-514.

(收稿日期:2018-05-27)