

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.017

洗四方袋泡剂质量标准研究*

黄振忠¹,袁经权^{2,3},唐炳兰²,潘宇²,周阳晓³,陈路^{2Δ}

(1. 广西壮族自治区贵港市中西医结合骨科医院,广西 贵港 537100; 2. 广西壮族自治区药用植物园, 广西 南宁 530023; 3. 广西中医药大学,广西 南宁 530001)

摘要:目的 建立洗四方袋泡剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别制剂中鸡血藤、三叉苦和大黄药材;采用高效液相色谱法测定制剂中大黄酸的含量,色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(80:20,V/V),柱温为 30℃,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm,进样量为 10 μL。结果 鸡血藤、三叉苦和大黄的薄层色谱图斑点清晰,分离度较好,阴性对照无干扰;大黄酸质量浓度线性范围为 0.044~0.352 μg(R²=0.999 7),平均回收率为 98.13%,RSD 为 1.77%(n=9)。结论 该方法可靠,准确,操作简单,可用于洗四方袋泡剂的质量控制。

关键词:洗四方袋泡剂;质量标准;薄层色谱法;大黄酸;高效液相色谱法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)15-0064-04

Quality Standard of Xisifang Bag Bubble

HUANG Zhenzhong¹, YUAN Jingquan^{2,3}, TANG Binglan², PAN Yu², ZHOU Yangxiao³, CHEN Lu²

(1. Combination of TCM and Western Medicine Orthopaedic Hospital of Guigang, Guigang, Guangxi, China 537100; 2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning, Guangxi, China 530023; 3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530001)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Xisifang Bag Bubble. **Methods** A thin layer chromatography(TLC) method was used to identify *Spatholobi caulis*, *Evodiae lepta* and *Rhei Radix et Rhizoma* in the preparation. A high performance liquid chromatography(HPLC) method was applied to determine the content of rhein. The Agilent C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm) was adopted, the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution(80:20,V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30℃, the detecting wavelength was 254 nm, and the sample size was 10 μL. **Results** The TLC plots of *Spatholobi caulis*, *Evodiae lepta* and *Rhei Radix et Rhizoma* showed clearly with well separation and no interference with the negative. Rhein showed good linear relationship in the range of 0.044~0.352 μg(R²=0.999 7) with the peak area. The average recovery was 98.13% and RSD was 1.77%(n=9). **Conclusion** This methods is reliable, accurate, and simple in operation, which can be used for the quality control of Xisifang Bag Bubble.

Key words: Xisifang Bag Bubble; quality standard; thin layer chromatography; rhein; high performance liquid chromatography

洗四方袋泡剂是广西壮族自治区贵港市中西医结合骨科医院临床使用 30 多年的验方,作为治疗骨科损伤疾病后期功能康复的外用熏洗协定方剂,具有活血化瘀、舒筋通络功效。洗四方袋泡剂由鸡血藤、大黄、三叉苦、白背叶、鸡骨香等 11 味中药组方,用于骨科损伤疾病后期的功能康复、软组织损伤、腰腿痛及手足冻疮等的治疗^[1-2]。方中鸡血藤为君药,行血补血,通经活络;白背叶、鸡骨香散瘀止痛,祛风活血^[3];三叉苦消肿止痛^[4];大黄凉血、祛瘀、解毒^[5]。该制剂在提取工艺、临床用药的安全性等方面均有报道^[6-8],为控制

其质量,确保临床用药有效,本研究中通过薄层色谱(TLC)法定性鉴别该制剂中的鸡血藤、三叉苦和大黄药材,采用高效液相色谱(HPLC)法测定制剂中大黄酸的含量,以期为该制剂质量标准的建立提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

VARIAN 210 型高效液相色谱仪(UV 检测器,美国瓦里安公司);BSA124S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,精度为 0.1 mg);SB-5200D 型超

*基金项目:广西壮族自治区贵港市科技计划项目[贵科攻 1305004]。

第一作者:黄振忠,男,大学本科,副主任药师,研究方向为医院药学研究,(电子信箱)huzzh@126.com。

Δ通信作者:陈路,男,壮族,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药民族药研究,(电子信箱)150388451@qq.com。

[9] 林敏浩,周爱梅,杨慧,等. 水蒸汽蒸馏法提取广佛手挥发精油及其组成分析[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(2): 619-625.

[10] 魏玉君,邵邻相,麻艳芳,等. 佛手叶挥发油的成分分析及生物活性研究[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版),2014, 37(3):329-333.

[11] 罗朵生,李勇,周修腾,等. 生佛手与制佛手挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用技术分析比较[J]. 中华中医药杂志,2014,29(3):916-918.

[12] 钟艳梅,田庆龙,肖海文,等. 不同产地佛手药材的化学成分比较研究[J]. 中南药学,2014,12(1):63-66.

(收稿日期:2019-12-04)

声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率为200 W,频率为40 kHz);UV-1240型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu UV 公司);ZF-8型暗箱式四用紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.2 试药

鸡血藤对照药材(成都普菲德生物技术有限公司,批号为170621);三叉苦对照药材(批号为121682-201301),大黄对照药材(批号为120984-201202),大黄酸对照品(批号为110757-201607),均购自中国食品药品检定研究院;鸡血藤(批号为180601),三叉苦(批号为180401),大黄(批号为180701),均购自广西玉林市至真中药饮片有限责任公司;洗四方袋泡剂(批号分别为201810,201811,201812),广西壮族自治区贵港市中医结合骨科医院院内制剂;甲醇、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

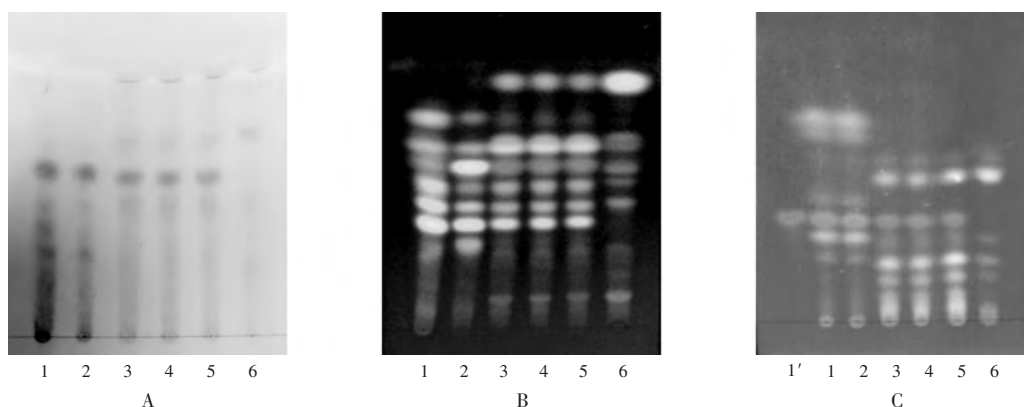
2.1 薄层色谱(TLC)鉴别

鸡血藤:取3批样品各5 g,加甲醇50 mL,超声处理30 min,取出,滤过,滤液蒸干,残渣加水30 mL使溶解,用醋酸乙酯萃取3次,每次20 mL,合并3次醋酸乙酯萃取液,水浴蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液;取鸡血藤药材粉末1 g,按供试品溶液制备方法制备供试药材溶液;取鸡血藤对照药材粉末1 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液;取缺鸡血藤的阴性样品5 g,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2015年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述4种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-甲酸乙酯-冰醋酸-甲酸-异丙醇(5:5:0.5:0.5:1, V/V/V/V/V)为展开剂^[9],展开,取出,晾干,喷以现配的5%香草醛盐酸溶液,加热至斑点显色清晰,置日光下检视。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红色斑点,阴性对照

无干扰(见图1A)。

三叉苦:取3批样品各5 g,加95%乙醇50 mL,加热回流1 h,冷却,滤过,滤液蒸干,加水40 mL,超声处理20 min,过滤,用醋酸乙酯萃取2次,每次20 mL,合并2次醋酸乙酯液,水浴蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液;取三叉苦药材粉末1 g,按供试品溶液制备方法制备供试药材溶液,取三叉苦对照药材粉末1 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液;取缺三叉苦的阴性样品5 g,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。按2015年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述4种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-醋酸乙酯-甲酸-水(5:5:1:0.5, V/V/V/V)为展开剂^[10],展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。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亮蓝色斑点,阴性对照无干扰(见图1B)。

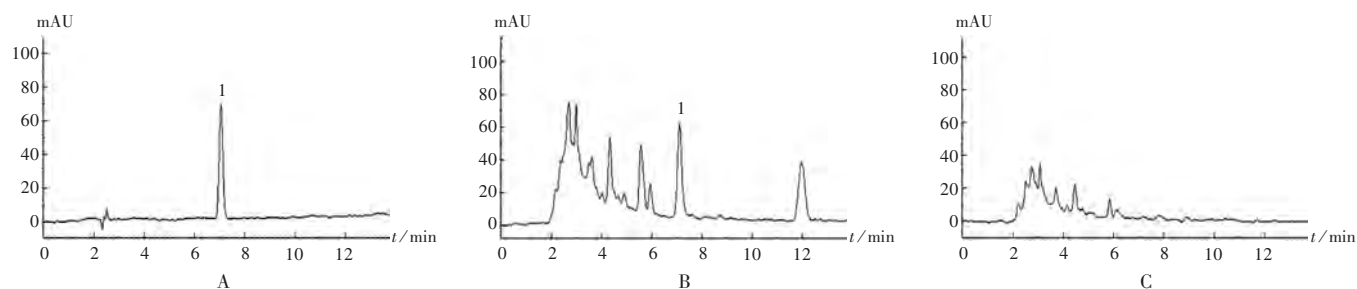
大黄:取3批样品各2 g,加水40 mL回流提取1 h,冷却,滤过,滤液加醋酸乙酯萃取3次,每次20 mL,合并3次醋酸乙酯萃取液,水浴蒸干,残渣加乙醇2 mL使溶解,作为供试品溶液;取大黄酸对照品0.0010 g,精密称定,加乙醇1 mL制成质量浓度为1 mg/mL的大黄酸对照品溶液;取大黄药材粉末0.1 g,按供试品溶液方法制备供试药材溶液,取大黄对照药材粉末0.1 g,按供试品溶液方法制备对照药材溶液;取缺大黄的阴性样品2 g,按供试品溶液方法制备阴性对照品溶液。按2015年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述5种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶H薄层板上,以现配的石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(11:6:1, V/V/V)上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。在254 nm波长的紫外灯下检视,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同棕色斑点,阴性对照无干扰^[5,11](见图1C)。



1. 对照药材溶液 1'. 大黄酸对照品溶液 2. 供试药材溶液 3-5. 供试品溶液(批号分别为201810,201811,201812)
6. 阴性对照品溶液

A. 鸡血藤 B. 三叉苦 C. 大黄

图1 薄层色谱图



1. 大黄酸

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

2.2 大黄酸含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶 Agilent XDB C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.1% 磷酸溶液 (80:20, V/V); 检测波长:254 nm; 流速:1.0 mL/min; 柱温:30 ℃; 进样量:10 μL。在此色谱条件下,理论板数按大黄酸峰计应不低于 3 000。

2.2.2 溶液制备

取大黄酸对照品 4.4 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得质量浓度为 44 μg/mL 的对照品贮备液;精密移取对照品贮备液 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得质量浓度为 22 μg/mL 的对照品溶液。取样品 3 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,密闭加塞,称定质量,回流提取 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,精密吸取续滤液 10 mL 置烧瓶中,水浴挥去溶剂,加入 10 mL 8% 盐酸溶液,超声处理 2 min,再加入 10 mL 三氯甲烷,回流提取 1 h,放冷,置分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤圆底烧瓶,一同并入分液漏斗中,振摇,混合均匀,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷提取 3 次,每次 10 mL,合并三氯甲烷层,水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得供试品溶液^[5]。另按处方工艺取缺大黄的阴性样品 3 g,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液,按拟订色谱条件注入高效液相色谱仪,记录色谱图,见图 2。结果显示,大黄酸色谱峰分离效果良好,且阴性对照无干扰。

线性关系考察:分别精密吸取对照品贮备液(质量浓度为 44 μg/mL)1,2,3,4,5,6,7,8 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经微孔滤膜滤过,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以大黄酸进样量(X , μg)为横坐标、色谱峰峰面积值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y=89.306X+2.500$, $R^2=0.9997$ ($n=8$)。

结果表明,大黄酸进样量在 0.044 ~ 0.352 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取 2.2.2 项下大黄酸对照品溶液(质量浓度为 22 μg/mL)适量,按拟订色谱条件连续重复进样 6 次,依法测定,记录峰面积。结果大黄酸峰面积的 RSD 为 0.99% ($n=6$),表明仪器精密程度良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液(批号为 201810),分别于 0,1,2,4,8,12,24 h 时进样测定,记录峰面积。结果大黄酸峰面积的 RSD 为 0.89% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 201810)样品适量,精密称定,依法平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果大黄酸平均含量为 0.160 4 mg/g, RSD 为 1.64% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取 9 份已知含量的样品(批号为 201810,大黄酸为 0.160 4 mg/g)适量,依次精密加入对照品贮备液 3,6,9 mL,各 3 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果见表 1。

表1 大黄酸加样回收试验结果($n=9$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.518 1	0.243 5	0.132 0	0.373 5	98.48		
1.517 2	0.243 4	0.132 0	0.371 3	96.89		
1.501 2	0.240 8	0.132 0	0.370 6	98.33		
1.504 7	0.241 4	0.264 0	0.509 4	101.52		
1.502 3	0.241 0	0.264 0	0.502 2	98.94	98.13	1.77
1.500 6	0.240 7	0.264 0	0.497 5	97.27		
1.501 2	0.240 8	0.396 0	0.633 9	99.27		
1.506 4	0.241 6	0.396 0	0.619 9	95.53		
1.503 7	0.241 2	0.396 0	0.625 1	96.94		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 201810,201811,201812)样品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算大黄酸含量。结果 3 批样品中大黄酸含量分别为 0.160 4,0.162 5,0.138 2 mg/g。

3 讨论

3.1 薄层色谱条件优化

鸡血藤:供试品溶液制备时采用乙醇为超声提取溶剂,但效果不理想,将超声提取溶剂改成甲醇后,斑点浓度较大,清晰可见,分离好,阴性对照无干扰^[3];选择二氯甲烷-丙酮-甲醇-甲酸(8:1.2:0.3:0.5, V/V/V/V)作为展开剂^[3],但结果 R_f 值较小且斑点拖尾,通过系统考察,选取环己烷-甲酸乙酯-冰醋酸-甲酸-异丙醇(5:5:0.5:0.5:1, V/V/V/V/V)作为展开剂^[9],分离效果较好;香草醛盐酸溶液为显色剂,结果斑点清晰,但显色后斑点消失太快,后改进为显色剂现用现配,斑点保留时间较久。

三叉苦:对供试品溶液的提取溶剂、提取方法做了系统考察^[12-14],结果采用95%乙醇提取的方法,斑点分离清晰,阴性对照无干扰;展开剂选择甲苯-醋酸乙酯-甲酸-水(5:5:1:0.5, V/V/V/V)^[10],结果斑点不清晰,改成展开剂静置30 min后,取上层溶液,置紫外光灯(254 nm)下进行检视,结果分离效果佳,斑点清晰,阴性对照无干扰。

大黄:展开剂的选择参考2015年版《中国药典(一部)》中大黄药材鉴别及文献^[11]的方法,先以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)为展开剂,但溶剂易挥发、易分层、展开时斑点稍有堆积;后将石油醚(30~60℃)改为石油醚(60~90℃),并将展开剂比例调为石油醚(60~90℃)-甲酸乙酯-甲酸(11:6:1, V/V/V),现配现用,结果斑点分离效果好, R_f 值适中,且无拖尾现象。故选择石油醚(60~90℃)-甲酸乙酯-甲酸(11:6:1, V/V/V)为展开剂。

3.2 检测波长选择

采用紫外可见分光光度计在190~600 nm波长范围内对大黄酸对照品溶液进行紫外光谱扫描,结果在254 nm波长处有最大吸收峰。检测波长确定为254 nm。

3.3 流动相选择

由于洗四方袋泡剂含多种中药,成分复杂,故需选择合适的流动相进行分析。曾考察甲醇-0.1%磷酸溶液的流动相系统,甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15, V/V)^[5]时主峰与杂峰分离效果差;甲醇-0.1%磷酸溶液流动相为(75:25, V/V)^[15]时保留时间过长;甲醇-0.1%磷酸溶液流动相为(80:20, V/V)时峰型好,峰面积合适,且与杂峰的分离效果好,均达到要求。故选择后者。

3.4 色谱条件选择

曾以 DIKMA C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), ULTIMATE×B C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent XDB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)及 Agilent XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对样品溶液进行含量测定。以 DIKMA C₁₈ 柱和 Agilent XDB-C₁₈ 柱

(150 mm×4.6 mm, 5 μm)测得样品溶液的保留时间短,且大黄酸与前后峰分不开,故不被选择;而 ULTIMATE×B C₁₈ 柱测得样品溶液的保留时间较好,但峰型差,理论板数较低,故不被采纳;而 Agilent XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱测得样品溶液中的大黄酸保留时间合适,且与前后杂质峰的分度均大于4,峰型和分离度均良好,符合《中国药典》的规定,故选用该色谱柱。

3.5 方法评价

曾对洗四方袋泡剂中鸡血藤、三叉苦和大黄药材进行 TLC 鉴别,斑点清晰,供试品溶液与对照品溶液的斑点对应良好,阴性对照无干扰;以 HPLC 法测定洗四方袋泡剂中大黄酸的含量,分离效果好,峰形良好,保留时间适宜,专属性强,测定结果准确,在规定时间内测定方法稳定。本研究中所建立的方法可靠、准确,操作简单,可确保产品的质量和疗效,保证患者用药安全。

参考文献:

- [1] 史明,谭勇明,李文恒,等. 中药洗四方局部熏洗在膝部骨折后期的临床应用[J]. 实用中西医结合临床,2010,10(1):30-31.
- [2] 韦秋萍,伍艳靖. 洗四方熏洗治疗手足冻疮63例[J]. 广西中医药,2009,32(1):40.
- [3] 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,2015:194.
- [4] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1990:9.
- [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,2015:23.
- [6] 黄振忠,张绿明,杨萍,等. “洗四方”袋泡剂的提取工艺研究[J]. 内蒙古中医药,2017,36(4):134-135.
- [7] 杨萍,韦风时,黎家华. 洗四方袋泡剂浸出条件优选[J]. 北方药学,2013,10(3):110-111.
- [8] 黄振忠,张绿明,黎家华. “洗四方”袋泡剂皮肤刺激性与致敏性的实验研究[J]. 广西医科大学学报,2013,30(5):708-711.
- [9] 曾聪彦,陈逸望. 舒脊片中鸡血藤的薄层色谱鉴别研究[J]. 北方药学,2016,13(12):2-3.
- [10] 蔡杰,苏美霞,赖坤平,等. 岗梅合剂中三叉苦的薄层色谱鉴别[J]. 天津药学,2016,28(1):6-7.
- [11] 黄艳,罗定强,李青,等. 乙型肝炎胶囊质量标准改进研究[J]. 中国药业,2018,27(21):31-34.
- [12] 刘乡乡,康志英,黄晓玲,等. 复方感冒灵片质量标准研究[J]. 中药材,2003,26(4):282-283.
- [13] 况开星,程民. 感冒灵胶囊质量标准的研究[J]. 黑龙江医药,2013,26(5):746-750.
- [14] 颜杰,裴建梅. 感冒灵流浸膏的质量标准研究[J]. 广东药学,2005,15(2):32-34.
- [15] 金贤武,付彩群,黄道明,等. 高效液相色谱法同时测定复方胆通片中5种蒽醌类成分含量[J]. 中国药业,2018,27(6):7-10.

(收稿日期:2019-10-23;修回日期:2020-03-15)