

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.04.015

瑶药止痛散质量标准研究*

莫海玲, 蒋璐慧, 农英高, 李以军, 林素梅, 周海坚

(广西壮族自治区民族医院·广西医科大学附属民族医院, 广西 南宁 530001)

摘要:目的 建立瑶药止痛散的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对瑶药止痛散中毛两面针、洋金花、草乌进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定瑶药止痛散中氯化两面针碱的含量,色谱柱为 Waters XBridge Phenyl C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液-三乙胺(20:80:1, V/V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 271 nm,柱温为 30℃,进样量为 10 μL。结果 瑶药止痛散中毛两面针、洋金花、草乌的 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。氯化两面针碱质量浓度在 1.25~12.50 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好;精密度、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率为 100.28%,RSD 为 1.75% (n=9)。结论 该研究所建立的标准可用于瑶药止痛散的质量控制。

关键词:瑶药止痛散;薄层色谱法;高效液相色谱法;氯化两面针碱;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)04-0056-04

Quality Standard of Yaoyaozhitong Powder

MO Hailing, JIANG Luhui, NONG Yinggao, LI Yijun, LIN Sumei, ZHOU Haijian

(Minzu Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Affiliated Minzu Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530001)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Yaoyaozhitong Powder. Methods The thin layer chromatography(TLC) method was used to identify *Zanthoxylum nitidum*, *Datura metel* and *Radix Aconiti kusnezoffii* in Yaoyaozhitong Powder, and the high-performance liquid chromatography(HPLC) method was used to determine the content of nitidine chloride in Yaoyaozhitong Powder, the chromatographic column was Waters XBridge Phenyl C₁₈ column(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid triethylamine(20:80:1, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 271 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. Results The TLC spots of *Zanthoxylum nitidum*, *Datura metel* and *Radix Aconiti kusnezoffii* in Yaoyaozhitong Powder were clear and well separated, and the negative control had no interference. The linear range of nitidine chloride was 1.25~12.50 μg/mL. The RSDs of precision, repeatability and stability tests were less than 2.0%. The average recovery of nitidine chloride was 100.28% with RSD of 1.75% (n=9). Conclusion The established standard can be used for the quality control of Yaoyaozhitong Powder.

Key words: Yaoyaozhitong Powder; TLC; HPLC; nitidine chloride; content determination

瑶药止痛散由毛两面针、洋金花、草乌、山乌龟、莪术等 10 味药材组方,可解毒散结、消肿止痛、补气行血、温通经络,且使用较安全^[1-3],临床多用于治疗癌性疼痛。方中毛两面针、洋金花、草乌为君药,毛两面针为芸香科植物毛叶两面针的干燥根和茎,瑶药称入山虎,是瑶药“五虎”之一^[4],具有活血化瘀、行气止痛、祛风通络的功效,其主要有效成分为氯化两面针碱。洋金花为茄科植物曼陀罗,瑶药称辣喝咪^[5],具有止咳平喘、麻醉止痛、散瘀消肿、镇静安神功效,主要有效成分为东莪菪碱、莪菪碱、曼陀罗碱等。草乌具有祛风除湿、温经止痛功效。莪术、山乌龟为方中臣药,山乌龟具有清热解毒、理气止痛的功效^[5],莪术具有行气破血、消积止痛功效。瑶药止痛散目前尚无质量标准,为确保该制剂在临床使用的安全性和有效性,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中毛两面针、洋金花、草乌进行定性鉴别,采用高

效液相色谱(HPLC)法对毛两面针的主要有效成分氯化两面针碱进行定量分析,为制订瑶药止痛散的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2030 型高效液相色谱仪,包括紫外检测器、柱温箱、LabSolutions 色谱数据工作站(日本 Shimadzu 公司);XS 205 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.1 mg/0.01 mg);KQ-300DB 型数控超声清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);HHitech 和泰水纯化系统(上海和泰仪器有限公司);DLF-28 型分级连续投料粉碎机(温州顶级医疗器械有限公司)。

1.2 试剂

瑶药止痛散(本院自制,批号分别为 20190607, 20190608, 20190609);氯化两面针碱对照品(批号为

*基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题[z2015109]。

第一作者:莫海玲,女,大学本科,副主任药师,研究方向为医院药学、药品质量标准,(电子信箱)mo-hailing@126.com。

110848-201604, 纯度为 91.0%), 氢溴酸东莨菪碱对照品(批号为 100049-201009, 纯度为 91.7%), 乌头碱对照品(批号为 110720-201111, 纯度为 98.8%), 次乌头碱对照品(批号为 110798-201308, 纯度为 98.6%), 洋金花对照药材(批号为 121058-200503), 草乌对照药材(批号为 121338-200401), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯; 二甲苯、乙酸乙酯、甲醇、异丙醇、浓氨试液、磷酸等均为分析纯; 水为纯化水。

1.3 药材

毛两面针(批号为 1809034)、洋金花(批号为 1811151)、草乌(批号为 D1703003)、山乌龟(批号为 1811081)、莪术(批号为 1811092)等药材均购自广西张益堂中药饮片有限公司, 经我院周海坚副主任中药师鉴定为正品, 作为对照药材。

2 方法与结果

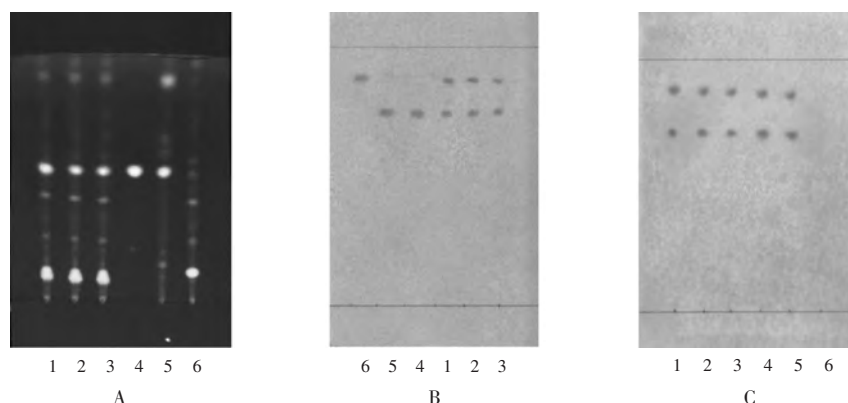
2.1 定性鉴别

毛两面针: 取样品 3 g, 精密称定, 加乙醇 40 mL, 超声(功率 300 W, 频率 40 kHz, 下同)处理 60 min, 放冷至室温, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 取毛两面针对照药材 2 g, 同法制成对照药材溶液; 按止痛散处方和工艺制备缺毛两面针的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液; 称取氯化两面针碱对照品适量, 精密称定, 用乙醇溶解, 制成氯化两面针碱质量浓度为 0.025 mg/mL 的对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法^[6]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, 以二甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-浓氨试液(10:2.5:2.5:0.5:0.05, V/V/V/V/V)为展开剂, 置紫外光灯(波长 365 nm)下检视^[7]。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴

性对照无干扰^[8]。详见图 1 A。

洋金花: 取样品 3 g, 精密称定, 加浓氨试液 5 mL, 混匀, 加三氯甲烷 20 mL, 摇匀, 静置过夜, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取洋金花对照药材 2 g, 同法制成对照药材溶液; 按止痛散处方和工艺制备缺洋金花的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液; 精密称取氢溴酸东莨菪碱对照品, 用甲醇溶解, 制成氢溴酸东莨菪碱质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法^[6]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, 以氯仿-甲醇-浓氨试液(20:3.5:0.5, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以稀碘化铋钾试液^[9]。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰^[8]。详见图 1 B。

草乌: 取样品 3 g, 精密称定, 加氨试液 10 mL 润湿, 加乙醚 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 另取草乌对照药材 2 g, 同法制成对照药材溶液; 按止痛散处方和工艺制备缺草乌的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液; 精密称取乌头碱对照品、次乌头碱对照品, 用异丙醇-三氯甲烷(1:1, V/V)混合溶液溶解, 制成乌头碱、次乌头碱质量浓度均为 1 mg/mL 的混合对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法^[6]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, 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇(8:6:1, V/V/V)为展开剂, 置氨蒸气饱和的展开缸内 20 min, 展开, 取出, 晾干, 喷以稀碘化铋钾试液。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰^[8]。详见图 1 C。



1-3. 供试品溶液(批号分别为 20190607, 20190608, 20190609) 4. 对照品溶液 5. 对照药材溶液 6. 阴性对照溶液
A. 毛两面针 B. 洋金花 C. 草乌

图 1 薄层色谱图

1-3. test solution(batch numbers: 20190607, 20190608, 20190609) 4. reference solution 5. reference material solution 6. negative reference solution
A. *Zanthoxylum nitidum* B. *Datura metel* C. *Radix Aconiti kusnezoffii*

Fig. 1 TLC chromatograms

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge Phenyl C₁₈ 柱(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈-0.2% 磷酸溶液-三乙胺(20:80:1, V/V/V); 检测波长: 271 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

2.2.2 溶液制备

对照品溶液: 取氯化两面针碱对照品 2.5 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得质量浓度为 50 μg/mL 的对照品贮备液; 精密量取 1 mL, 加 70% 甲醇溶解, 并定容至 10 mL, 摇匀, 即得氯化两面针碱质量浓度为 5 μg/mL 的对照品溶液。

供试品溶液: 取样品 3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇 20 mL 超声处理 30 min, 滤过; 滤渣和滤纸加 70% 甲醇 20 mL 超声处理 30 min, 放冷至室温, 滤过, 滤液置同一容量瓶中, 加 70% 甲醇洗涤 3 次, 洗液并入 50 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 摇匀, 即得供试品溶液。

阴性对照品溶液: 按止痛散处方和工艺制备缺毛两面针的阴性样品, 同法制成阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取 2.2.2 项下对照品溶液、供试品溶液各适量, 按选定色谱条件进样测定, 色谱图见图 2。结果理论板数按氯化两面针碱峰计应不低于 2 000, 分离度均大于 1.5, 基线分离良好。

专属性试验: 取上述对照品溶液、阴性对照溶液各适量, 按选定色谱条件进样测定, 色谱图见图 2。结果阴性对照品溶液在与氯化两面针碱对照品溶液相同保留时间处无干扰峰, 表明专属性良好。

线性关系考察: 分别精密量取对照品贮备液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加 70%

甲醇定容, 摇匀, 制成系列对照品溶液。取上述溶液各 10 μL, 按选定色谱条件进样测定, 记录峰面积。以氯化两面针质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 55\,065.1X + 5\,178.40$ ($r = 0.999\,6$, $n = 6$)。结果表明, 氯化两面针碱质量浓度在 1.25 ~ 12.50 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取对照品溶液适量, 按选定色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果氯化两面针碱峰面积的 RSD 为 0.68% ($n = 6$), 表明仪器精密度高。

稳定性试验: 取供试品溶液(批号 20190607)适量, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 时进样测定, 记录峰面积。结果氯化两面针碱峰面积的 RSD 为 0.68% ($n = 6$), 表明供试品溶液在室温放置 12 h 内基本稳定。

重复性试验: 称取样品(批号 20190608)适量, 精密称定, 同法制备供试品溶液, 再按选定色谱条件进样测定 6 次, 记录峰面积, 并计算含量。结果氯化两面针碱含量平均值为 100.86 μg/g, RSD 为 1.16% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品(批号 20190608)2 g, 精密称定, 共 6 份, 分别加入 1, 2, 3 mL 的氯化两面针碱对照品贮备液, 同法制备供试品溶液, 再按选定色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算回收率。结果见表 1。

样品含量测定: 取 3 批样品各适量, 分别同法制备供试品溶液, 再按选定色谱条件进样测定, 平行测定 3 次, 记录峰面积, 并计算样品含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 样品超声提取次数选择

在样品提取预试验中, 考察了不同超声提取次数对

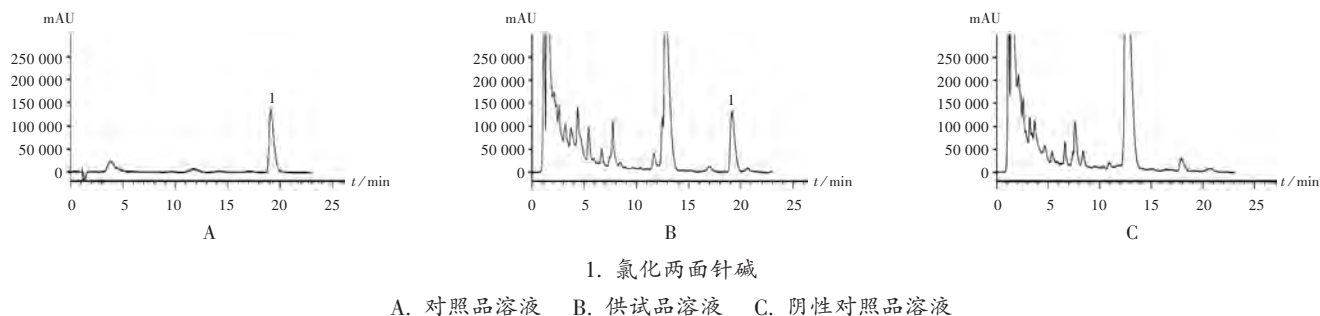


图2 高效液相色谱图

1. nitidine chloride

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=9$)
Tab.1 Results of recovery tests($n=9$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
2.0368	205.9147	50.6	258.10	103.13		
2.0677	209.0386	50.6	259.90	100.52		
2.0608	208.3410	50.6	259.50	101.10		
2.0716	209.4328	101.2	312.15	101.50		
2.0197	204.1859	101.2	305.05	99.67	100.28	1.75
2.0427	206.5111	101.2	309.10	101.37		
2.0519	207.4412	151.8	355.15	97.30		
2.0125	203.4579	151.8	354.40	99.43		
2.0648	208.7454	151.8	358.30	98.52		

表2 样品含量测定结果($n=3$)
Tab.2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)
20190607	100.12	0.14
20190608	100.71	0.96
20190609	101.75	1.32

氯化两面针碱含量的影响,结果超声提取2次与提取3次的含量差异不大,故确定为2次。

3.2 TLC鉴别条件选择

在毛两面针的TLC鉴别中,曾参考文献[4, 10-11]选择展开剂,结果发现各斑点分离效果不佳,拖尾严重,效果不理想。后参考文献[7],以二甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-浓氨试液(10:2.5:2.5:0.5:0.05, V/V/V/V/V)为展开剂,结果各斑点显示清晰,分离度好。在洋金花的TLC鉴别中,曾考察了乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液(17:2:1, V/V/V)及氯仿-甲醇-浓氨试液(20:3.5:0.5, V/V/V),结果以后者为展开剂,各斑点分离度好,且显色清晰,阴性对照无干扰。

在草乌TLC鉴别中,曾考察了正己烷-乙酸乙酯-甲醇(8:6:1, V/V/V),乙酸乙酯-浓氨试液(20:1, V/V)及乙酸乙酯-正己烷-浓氨试液(15:5:1, V/V/V),结果以正己烷-乙酸乙酯-甲醇(8:6:1, V/V/V)为展开剂时,各斑点分离度好,且显色清晰,阴性对照无干扰。

3.3 含量测定指标选择

氯化两面针碱是毛两面针的主要活性成分之一,具有抗炎、抗菌、镇痛、抗肿瘤活性^[12-15],含量测定方法较成熟^[4, 16-17],本试验中结合瑶药止痛方的临床疗效及对疗效的贡献程度,最终确定以氯化两面针碱为考察指标。选用乙腈-0.2%磷酸溶液-三乙胺(20:80:1, V/V/V)为流动相,结果精密度、重复性、稳定性的RSD均小于2.0%,3批样品中氯化两面针碱的平均含

量为100.86 $\mu\text{g/g}$,平均加样回收率为100.28%, RSD为1.75% ($n=6$),表明该研究所建立的标准可用于瑶药止痛散的质量控制。

参考文献

- [1] 莫艳芳,邓广业,黄显实,等. 瑶药止痛贴穴位敷贴治疗癌痛的临床研究[J]. 湖南中医药大学学报,2011,10(31): 40-42.
- [2] 莫艳芳. 瑶药止痛散穴位敷贴联合盐酸吗啡治疗癌性疼痛疗效观察[J]. 中国民族民间医药,2008,17(1):25-26.
- [3] 梁丹,黄显实,莫艳芳. 瑶药穴位止痛敷贴联合氨酚羟酮治疗中度癌痛的临床观察[J]. 右江医学,2013,41(3): 356-357.
- [4] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2014:6-7.
- [5] 覃迅云,罗金裕,高志刚. 中国瑶药学[M]. 北京:民族出版社,2002:180-181,1009-1011.
- [6] 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,2015:57-59.
- [7] 吕洁. 两面针分散片制备工艺和质量标准的研究[D]. 广州:广东药学院,2011.
- [8] 隋继英,刘向红,陈金娜,等. 化痰无糖颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房,2018,29(22):3083-3087.
- [9] 刘梦然,刘宇,冯继承. 中药如意定喘片质量标准提高研究[J]. 黑龙江医药,2018,31(1):16-19.
- [10] 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,2015:169-170.
- [11] 黄琪,雷鹏,李秀杰,等. 两面针与毛两面针药材中5种化学成分的比较研究[J]. 中国药科大学学报,2012,43(2): 154-158.
- [12] 李丹妮,刘华钢,刘丽敏. 氯化两面针碱诱导人肝癌细胞SMMC-7721凋亡及机制研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(5):23-25.
- [13] 刘华钢,秦三海,王博龙. 氯化两面针碱体外诱导两种鼻咽癌株的细胞凋亡[J]. 华西药学杂志,2007,22(5):514.
- [14] 刘丽敏,刘华钢. 氯化两面针碱的研究近况[J]. 时珍国医国药,2007,18(1):60.
- [15] 秦三海,刘华钢,王博龙. 氯化两面针碱体外诱导肺癌SPC-A-1Tea8113两种肿瘤细胞株凋亡的研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(2):279-280.
- [16] 黄琪,雷鹏,刘英慧,等. 高效液相色谱法同时测定毛两面针药材中5种化学成分含量[J]. 中国药理学杂志,2012,47(9):1514-1517.
- [17] 黄琪,雷鹏,李新中,等. 毛两面针药材HPLC指纹图谱及模式识别研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(5): 918-923.

(收稿日期:2020-06-01)