

红梔骨科外洗散质量标准研究

曾聪彦^{1*}, 胡玉良¹, 吴凤荣¹, 陈武远²¹广州中医药大学附属中山中医院, 中山 528401; ²广东药学院中药学院, 中山 528400

摘要: 为了建立红梔骨科外洗散的质量控制方法。采用薄层色谱法对红梔骨科外洗散中的的大黄、黄柏、钩藤进行定性鉴别; 采用高效液相法测定制剂中大黄素和大黄酚的含量。实验结果表明, 薄层色谱中各味药的特征斑点清晰, 且空白对照无干扰; 大黄素在 1.21 ~ 38.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均加样回收率为 99.6%, RSD 为 0.72% ($n = 6$); 大黄酚在 2.53 ~ 80.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9991$), 平均加样回收率为 99.1%, RSD 为 0.64% ($n = 6$)。本文所建立方法简便可行, 结果准确可靠, 重复性好, 可有效控制红梔骨科外洗散的质量。

关键词: 红梔骨科外洗散; 大黄素; 大黄酚; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.029

Quality Standard for Hongzhiguke Powder

ZENG Cong-yan^{1*}, HU Yu-liang¹, WU Feng-rong, CHEN Wu-yuan²¹Zhongshan Hospital, Guangzhou University of TCM, Zhongshan 528401, China;²Guangdong College of Pharmacy, Zhongshan 528400, China

Abstract: The objective of study was to establish the quality standard for Hongzhiguke Powder. Rhei Radix et Rhizoma, Phellodendri Chinensis Cortex, Uncariae Ramulus Cumuncis were identified by Thin-Layer chromatography (TLC). And the high performance liquid chromatography (HPLC) was applied for the determination of Emodin and Chrysophanol in the Hongzhiguke Powder. The experiment results showed that TLC spots were clear and the blank without interference. Emodin was linear with peak area score when its sample size was within the range of 1.21-38.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9999$), the average recovery was 99.6% (RSD = 0.72%, $n = 6$); Chrysophanol was within the range of 2.53-80.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r = 0.9991$), the average recovery was 99.1% (RSD = 0.64%, $n = 6$). Finally, it was concluded that the established methods are simple, reliable and accurate, and can be applied as the quality control method of Hongzhiguke Powder.

Key words: Hongzhiguke powder; emodin; chrysophanol; TLC; HPLC; quality standards

红梔骨科外洗散是由广州中医药大学附属中山中医院常用经验方研制而成的院内制剂, 方中由红花、大黄、宽筋藤、梔子、钩藤、黄柏、络石藤、桑枝、没药、乳香等 10 多味中药组成, 其功效在于活血化瘀、消炎止痛、舒筋活络, 对扭挫伤初期、骨折初期的关节活动不利有较好疗效。为有效控制红梔骨科外洗散的质量, 保证用药的安全、有效, 笔者按中药新药研究规范, 采用薄层色谱法 (TLC) 法对该制剂中主要药味大黄、黄柏等进行了定性鉴别研究, 并采用高效液相色谱 (HPLC) 法对制剂中主要药味大黄中的大黄素和大黄酚进行了含量测定, 建立了准确、可

靠、专属性强的质量控制方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent-1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); KQ3200E 医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Good see- I 薄层色谱摄影仪 (上海科哲生化科技有限公司); JA1203 电子天平 (上海天平仪器厂); 电热恒温水浴锅 (上海衡平仪器仪表厂)。

1.2 药品与试剂

红梔骨科外洗散 (批号: 20130404, 20130615, 20131120) 由广东省中山市中医院制剂室提供; 大黄素 (批号: 110756-200110)、大黄酚 (批号: 110796-201118)、大黄素甲醚 (批号: 110758-201013)、盐酸小檗碱 (批号: 110713-200911) 对照品及大黄 (批号:

收稿日期: 2017-02-21 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 广东省中山市科技计划 (2014A1F138)

* 通信作者 Tel: 86-760-89980213; E-mail: zszcy@126.com

121249-201003)、黄柏(批号:121510-201105)、钩藤(批号:120980-201005)对照药材均购自中国药品生物制品检定所;硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司分厂,批号:20120208);其余试剂均为市售分析纯。

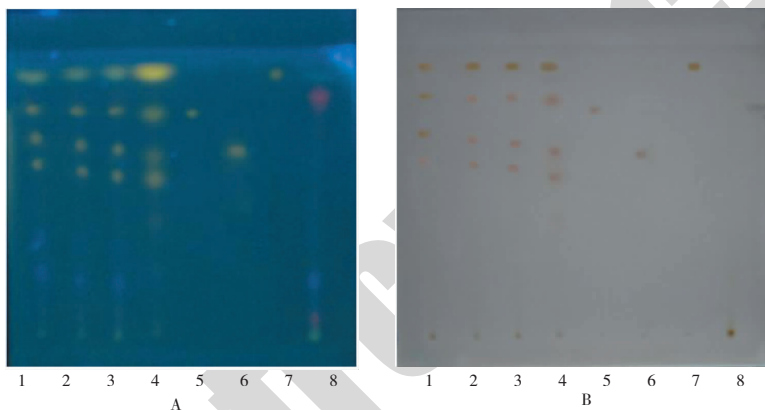
2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 大黄

取本品 2 g,加甲醇 40 mL,浸泡 1 h,滤过,取滤液 10 mL,蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,再加盐酸 1 mL,超声处理 30 min,立即冷却,用乙醚振摇 2 次提取,每次 20 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解,作为供试品液。取缺大黄药材的其余

各药制成的阴性对照品 2 g,按供试品溶液方法制得大黄阴性对照溶液。另取大黄对照药材 0.1 g,同法制成对照药材溶液。再取大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄素甲醚对照品,加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》四部通则)实验,吸取上述六种溶液各 4 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上,以石油醚(30 ~ 60 $^{\circ}$ C) - 甲酸乙酯 - 甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱、对照品色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点;置氨蒸气中熏后,斑点变为红色,阴性对照色谱无此斑点,见图 1。



A. 紫外灯光(365nm)下;B. 氨熏后日光下;1~3. 供试品;4. 大黄对照药材;5. 大黄素对照品;6. 大黄酚对照品;7. 大黄素甲醚对照品;8. 缺大黄阴性对照

A. under 365nm ultraviolet lamp;B. under sunlight;1~3. Samples;4. reference substance;5. Emodin;6. Chrysophanol;7. Rheochrysidin;8. negative control

图 1 大黄的 TLC 鉴别

Fig. 1 TLC analysis of Rhei Radix et Rhizoma

2.1.2 黄柏

取本品 5 g,加甲醇溶液 20 mL,密塞,超声处理 15 min,滤过,滤液浓缩至 1 mL,作为供试品液。取缺黄柏药材的其余各药制成的阴性对照品 5 g,按供试品溶液方法制得黄柏阴性对照溶液。另取黄柏对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》四部通则)实验,吸取上述四种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯 - 丁酮 - 甲酸 - 水(10:6:1:1)为展开剂,置氨蒸汽预饱和的展缸内,展开,取出,晾干。置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相

同颜色的荧光斑点,阴性对照色谱无此荧光斑点。见图 2。

2.1.3 钩藤

取本品 10 g,加入浓氨试液 10 mL,浸泡 30 min,加入三氯甲烷 50 mL,加热回流 2 h,放冷,滤过,滤液挥干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取缺钩藤药材的其余各药制成的阴性对照品 10 g,按供试品溶液方法制得钩藤阴性对照溶液。另取钩藤对照药材 1 g,加入浓氨试液 2 mL,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》四部通则)试验,吸取上述三种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60 ~ 90 $^{\circ}$ C) - 丙酮(6:4)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以改良碘化铋

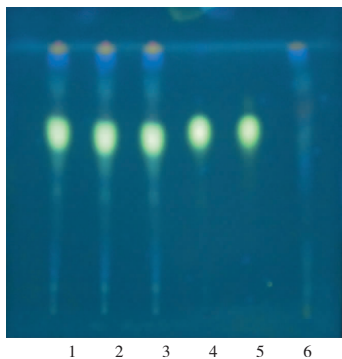


图2 黄柏的 TLC 鉴别

Fig. 2 TLC analysis of Phellodendri Chinensis Cortex

1~3、供试品;4、黄柏对照药材;5、盐酸小檗碱对照品;6、缺黄柏阴性对照

1~3. samples; 4. reference substance; 5. berberine hydrochloride; 6. negative control

钾试液。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照色谱无此斑点。见图3。

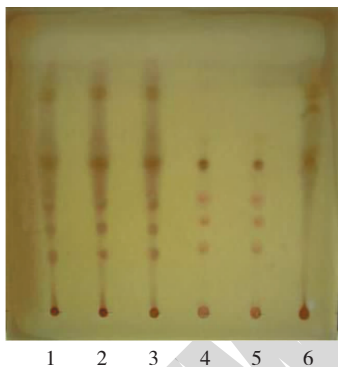


图3 钩藤的 TLC 鉴别

Fig. 3 TLC analysis of Uncariae Ramulus Cumuncis

1~3、供试品;4~5、钩藤对照药材;6、缺钩藤阴性对照

1~3. samples; 4~5. reference substance; 6. negative control

2.2 大黄素和大黄酚的含量测定^[1-2]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (85:15); 检测波长 254 nm; 柱温 25 °C。理论板数按大黄素、大黄酚峰面积计算应不低于 3000。

2.2.2 供试品溶液的制备

取供试品约 3 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 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 10 mL, 置烧瓶中, 挥去

溶剂, 加水 15 mL 使溶解, 再加盐酸 1 mL, 超声处理 5 min, 加热回流 30 min, 立即冷却, 置分液漏斗中, 用少量乙醚洗涤容器, 并入分液漏斗中, 用乙醚分 3 次振摇提取, 每次 15 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。用 0.45 μL 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品。

2.2.3 对照品的制备

精密称定大黄素及大黄酚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 7.72 μg 大黄素以及 17.44 μg 大黄酚的混合对照品溶液, 摇匀即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备

按处方比例称取缺大黄的其余药味, 按红梔骨科外洗散制备工艺制备阴性样品, 然后按“2.2.2”项下方法操作, 制得阴性对照溶液。

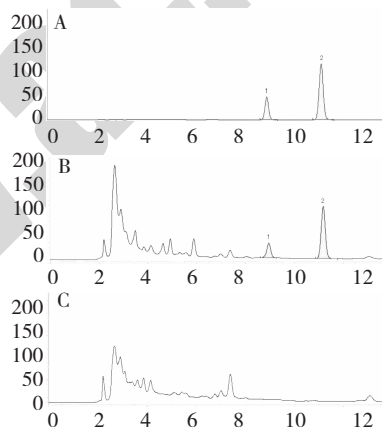


图4 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1-大黄素; 2-大黄酚

A. standard substance; B. sample; C. blank sample; 1-emodin; 2-Chrysophanol

2.2.5 专属性试验

在上述色谱条件下, 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 20 μL, 注入色谱仪进样测定, 记录色谱图。结果发现, 供试品色谱图中, 在与对照品色谱图相应保留时间处有相同色谱峰, 且主峰与相邻色谱峰能够完全分离, 峰形良好; 阴性对照无干扰。见图4。

2.2.6 线性关系考察

精密称取大黄素对照品及大黄酚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 77.2 μg 大黄素以及 161.6 μg 大黄酚的混合溶液; 精密吸取上述溶液 5 mL, 用稀乙醇稀释至 10 mL, 摇匀; 再精密吸取上述溶液 5

mL,用稀乙醇稀释至 10 mL,摇匀,按上述方法依次稀释,制得大黄素浓度分别为 38.6、19.3、9.65、4.83、2.41、1.21 $\mu\text{g/mL}$,大黄酚浓度分别为 80.8、40.4、20.2、10.1、5.05、2.53 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。每一浓度进样 20 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,对照品质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得大黄素回归方程为 $y = 72.498x - 28.278$ ($r = 0.9999$),大黄酚回归方程为 $y = 75.092x - 90.012$ ($r = 0.9991$)。结果表明,大黄素和大黄酚分别在 1.21 ~ 38.6 $\mu\text{g/mL}$ 、2.53 ~ 80.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.2.7 精密度试验

在上述色谱条件下,精密吸取混合对照品溶液 20 μL ,注入高效液相色谱仪,重复进样 6 次,记录峰面积。结果大黄素和大黄酚峰面积的 RSD 分别为 0.79%、0.93%,表明仪器精密密度良好。

2.2.8 稳定性试验

精密吸取同一批次供试品溶液(批号:20131120),按照“2.2.1”的条件下,分别于 0、3、6、9、12 h 进样,测定峰面积。结果大黄素和大黄酚峰面积的 RSD 分别为 0.49%、0.69%,表明样品溶液在 12h 内稳定性良好。

2.2.9 重现性试验

取同一批号样品(20131120)3 g,精密称定,平行 6 份,分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积。结果大黄素和大黄酚峰面积的 RSD 分别为 0.92%、0.98%,表明该方法重现性良好。

2.2.10 回收率试验

取已知含量的同一批号样品(20131120)1 g,精密称定,平行 6 份,分别添加大黄素和大黄酚对照品适量,按“2.2.2”项下方法操作制成供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Table 1 Result of recoveries ($n=6$)

待测成分 Analyte	取样量 Sample amount (g)	样品含量 Original content (mg)	加入量 Added amount (mg)	实测量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
大黄素 Emodin	1.0016	0.1209	0.1930	0.3130	99.5	99.6	0.72
	0.9992	0.1206	0.1930	0.3120	99.2		
	1.0033	0.1211	0.1930	0.3117	98.7		
	0.9987	0.1205	0.1930	0.3121	99.3		
	1.0008	0.1208	0.1930	0.3153	100.8		
	1.0003	0.1207	0.1930	0.3133	99.8		
大黄酚 Chrysophanol	1.0016	0.3326	0.4040	0.7351	99.6	99.1	0.64
	0.9992	0.3318	0.4040	0.7301	98.6		
	1.0033	0.3332	0.4040	0.7371	100.0		
	0.9987	0.3317	0.4040	0.7328	99.3		
	1.0008	0.3324	0.4040	0.7285	98.4		
	1.0003	0.3322	0.4040	0.7308	98.7		

2.2.11 样品测定

按“2.2.2”项下和“2.2.3”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液,分别精密吸取 20 μL ,依“2.2.1”项下色谱条件测定,3 批样品中大黄素、大黄酚的含量测定结果见表 2。

3 讨论

在 TLC 鉴别研究中,曾对方中红花、大黄、宽筋藤、钩藤、黄柏、梔子、桑枝、络石藤等众多药味进行

了研究,结果发现红花、宽筋藤、梔子、桑枝、络石藤等药味存在供试品图谱斑点不清晰、阴性对照有干扰或重复性差等问题,只有大黄、钩藤、黄柏 3 味 TLC 鉴别研究是成功的。其中,大黄、钩藤 TLC 试验方法分别与《中国药典》2015 年版一部大黄、钩藤项下的 TLC 方法一致,黄柏原采用《中国药典》2015 年版一部中黄柏 TLC 条件,以三氯甲烷-甲醇-水(30:15:4)的下层液为展开剂^[1],结果供试品色谱背景干扰较大,斑点不清晰;后尝试用文献报道的乙

表 2 样品含量测定结果 (mg/g, n=3)

Table 2 Results of content determination (mg/g, n=3)

批号 Batch No.	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol
20130404	0.3321	0.1207
20130615	0.3315	0.1232
20131120	0.3404	0.1182

酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:6:1:1)为展开剂^[3],结果斑点清晰,阴性对照无干扰,容易判断。

在 HPLC 法测定方中大黄的主要成分时,基本参照《中国药典》2015 年版一部中大黄含量测定项^[1]下色谱条件,研究过程中虽对流动相及其比例作了多次尝试,但该制剂中大黄所含的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚分离效果均不理想,且相关复方中药制剂中测定大黄有效成分多以大黄酚和大黄素含量计^[4-6],因此,本研究以测定制剂中大黄酚和大黄素的含量为该制剂定量控制指标。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 23, 305, 257.
- Liu QH (刘起华), Zhang X (张萱), Wen J (文谨). Determination of the contents of emodin and chrysophanol in Si-huang Gao by HPLC. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2007, 24: 65-67.
- Wang LJ (王丽军), Liu LP (刘丽萍). TLC identification of *Phellodendron amurense* and *Sophora flavescens* in Huang-bai Zhiyang lotion. *Shanxi J Tradit Chin Med* (陕西中医), 2011, 32: 1407-1408.
- Chen Y (陈勇). Study on quality specification of bazheng capsule. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2015, 35: 179-182.
- Liu EL (刘恩荔), Zhang MY (张美玉), Liang TG (梁泰刚), et al. Studies on quality standard of Shexiang Niu Huang pills. *Chin Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2010, 16(7): 55-58.
- Yuan M (袁铭), Xiang Y (向阳), Xia LS (夏林霜), et al. Quality standards for Zhichuang capsules. *Chin Pharm* (中国药师), 2014, 17: 585-588.
- (上接第 185 页)
- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 401.
- Xu SY (徐淑云), Bian RL (卞如濂), Chen X (陈修). Methodology of Pharmacological Experiment (药理实验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2001. 884.
- Yang YJ (杨宇杰), Wang CM (王春民), Yuan YF (袁亚非), et al. Analgesic sites of total alkaloids in *Papaver nudicaule*. *Chinese Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36: 554-557.
- Zhang Y (张毅), Wang XG (王旭光), Yang Z (杨展), et al. Anti-inflammatory mechanism of luteolin in-vivo. *Journal of Guangdong Medical College* (广东医学院学报), 2009, 27: 606-609.
- Morteza-Semnani K, Saeedi M, Hamidian M, et al. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. *J Ethnopharmacology*, 2002, 80: 181-6.
- Wen HX (文怀秀), Shao Y (邵贇), Tao YD (陶燕铎), et al. RP-HPLC determination of protopine in Tibet medicine *Hypocoum leptocarpum* Hook f. et Thoms. . *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29: 137-139.
- Saeed SA, Gilani AH, Majoo RU, et al. Anti-thrombotic and anti-inflammatory activities of protopine. *Pharmacological Research*, 1997, 36: 1-7.
- Wang CR, Guo ZM, Zhang J, et al. High-performance purification of quaternary alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang using a new polar-copolymerized stationary phase. *J Sep Sci*, 2011, 34: 53-8.