

续骨油的质量标准研究

冯小映, 林静吟, 李丽月

广州市正骨医院, 广东 广州 510045

[摘要] 目的: 为建立续骨油的质量标准研究方法提供科学依据。方法: 采用薄层色谱法对续骨油中大黄、降香和闹羊花作定性鉴别, 采用高效液相色谱法对双酯型生物碱(乌头碱、次乌头碱、新乌头碱)总碱含量及土的宁含量作限量检查, 双酯型生物碱的检测流动相 A 是乙腈-四氢呋喃(5:3), 流动相 B 是 0.1 mol/L 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL), 检测波长为 235 nm; 土的宁的检测流动相 A 是乙腈, B 是 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02 mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液(用 10%磷酸调节 pH 值 2.8); 检测波长为 260 nm。结果: 大黄、降香、闹羊花的鉴别方法专属性强, 双酯型生物碱(乌头碱、次乌头碱、新乌头碱)总碱平均含量为 0.011 0 μg/mL, 土的宁的平均含量为 0.620 6 μg/mL, 均未超过规定要求。结论: 所建立的检验方法操作简便, 专属性强, 重现性较好, 可为续骨油质量标准的建立提供科学依据。

[关键词] 续骨油; 大黄; 降香; 闹羊花; 双酯型生物碱; 土的宁; 质量标准

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2016)12-0207-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.12.088

Research on Quality Standard of Xugu Oil

FENG Xiaoying, LIN Jingyin, LI Liyue

Abstract: Objective: To provide scientific evidence for establishing research method on quality standard of Xugu oil. **Methods:** Rhubarb, lignum acronychiae, flos Rhododendri Mollis in Xugu oil were identified by thin layer chromatography (TLC). Limit test for total alkaloid content in diester diterpenoid alkaloids (DDAs) (aconitine, hyaconitine, Mesaconitine) and content of Strychnine by high performance liquid chromatography (HPLC). Detection mobile phase A of DDAs was acetonitrile-tetrahydrofuran (5:3), mobile phase B was 0.1 mol/L ammonium acetic solution (add glacial acetic acid 0.5 mL per 1 000 mL), detection wavelength was 238 nm. Detection mobile phase A of Strychnine was acetonitrile, mobile phase B was equivalent mixed solution of 0.01 mol/L sodium heptanesulfonate and 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate (adjust the pH value to 2.8 With 10% phosphoric acid), detection wavelength was 260 nm. **Results:** Differentiation method of rhubarb, lignum acronychiae and flos Rhododendri Mollis were specific, average total alkaloid content of DDAs were 0.011 0 μg/mL, average content of strychnine was 0.620 6 μg/mL, did not exceed the specified requirements. **Conclusion:** Method for examination in the research is a simple, specific method with good reproducibility. It can provide scientific evidence for establishing quality standard of Xugu Oil.

Keywords: Xugu oil; Rhubarb; Lignum acronychiae; Flos Rhododendri Mollis; Diester diterpenoid alkaloids (DDAs); Strychnine; Quality standard

续骨油是本院使用多年的制剂, 在临床中, 疗效确切, 主要作用为活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨, 常用于急性慢性软组织挫伤、骨折、瘀血肿痛等病症。续骨油主要是由续断、降香、川乌、草乌、马钱子、大黄、闹羊花等味中药组成。处方中含有多种有毒中药材, 本试验利用高效液相法建立了川乌、草乌中的有毒成份乌头碱、次乌头碱和新乌头碱及马钱子中的

土的宁的限量检查方法; 同时建立了处方中大黄、降香、闹羊花的薄层色谱鉴别方法, 为该制剂的质量标准建立提供科学可靠的参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Thermo 高效液相色谱仪及色谱工作站(美国), Dionex Ultimate 检测器; Sartorius BSA224S 型电子分析天

[收稿日期] 2016-07-05

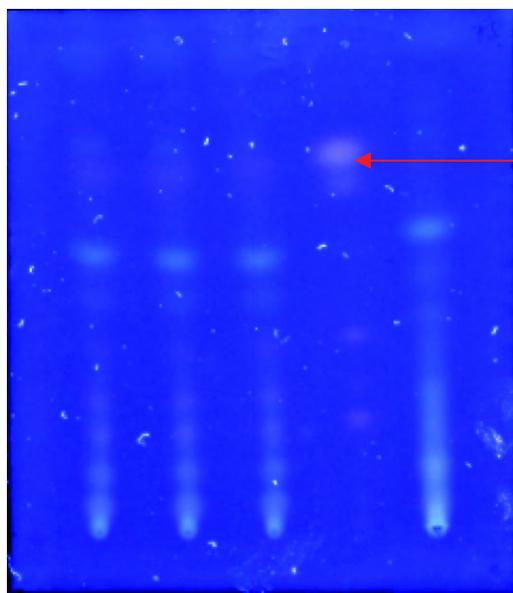
[作者简介] 冯小映(1975-), 女, 副主任中药师, 研究方向: 中药制剂。

平(德国);FA2004型电子天平(上海上天);超纯水处理系统(湖南科尔顿);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣);KQ-100B型超声波清洗器(东莞科桥);薄层层析硅胶G板(德国默克);薄层层析硅胶H板(青岛海洋化工)。

1.2 材料 对照药材降香(批号:121272-201103)、闹羊花(批号:121174-200802)、大黄(批号:120984-201202)及对照品乌头碱(批号:110720-201111)、新乌头碱(批号:110799-201106)、次乌头碱(批号:110798-201307)及土的宁(批号:110705-201307)均来源于中国药品生物制品检定所;试剂除乙腈为色谱纯外,其余均为分析纯;续骨油样品(批号:20150601、20150901、20151101)及其阴性对照品均由广州市正骨医院制剂室制备。

2 鉴别

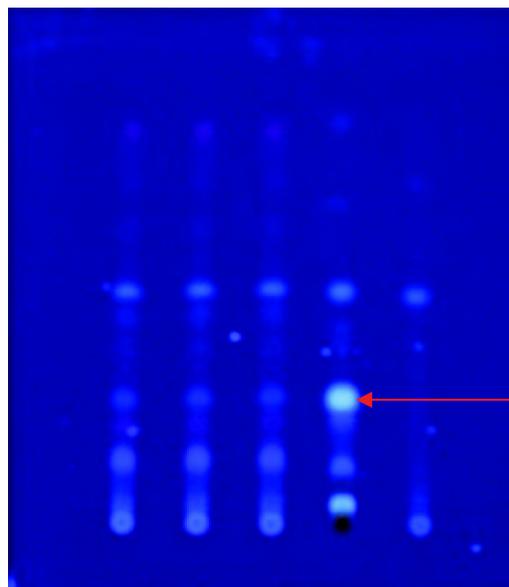
2.1 大黄^[1] 取续骨油样品30 mL,加甲醇30 mL,浸泡1 h,滤过,分取滤液,蒸干甲醇,残渣加水10 mL使溶解,转入圆底烧瓶,滴加盐酸1 mL,加热回流提取30 min,立即冷却,用无水乙醚萃取2次,每次20 mL,合并无水乙醚萃取液,挥干无水乙醚,残渣加三氯甲烷1 mL使溶解,作为供试品溶液。分别取缺大黄的阴性样品30 mL及大黄对照药材0.1 g,按供试品溶液的制备方法制成缺大黄的阴性对照溶液和大黄对照药材溶液。吸取上述三种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶H薄层板,以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的橙黄色荧光斑点,阴性对照溶液色谱未见相同斑点(见图1)。



1、2、3 为供试品溶液 4 大黄对照药材 5 缺大黄的阴性对照溶液

图1 大黄 TLC 图谱

2.2 降香^[1] 取续骨油样品60 mL,加甲醇50 mL,超声处理30 min,分取上层溶液,蒸干甲醇,残留物加甲醇2 mL使溶解,静置,取上层液1 mL作为供试品溶液。取不含降香的阴性样品,同法制成缺降香的阴性对照溶液。再取降香对照药材0.5 g,加甲醇5 mL,超声波提取30 min,滤过,取滤液作为对照药材溶液。吸取上述的降香供试品溶液及缺降香的阴性对照溶液各5 μ L,降香对照药材溶液2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,展开剂是甲苯-二氯甲烷-丙酮(5:5:0.5),展开,取出,晾干,在紫外光(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与降香对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照溶液色谱未见相同斑点(见图2)。



1、2、3 为供试品溶液 4 降香对照药材 5 缺降香的阴性对照溶液

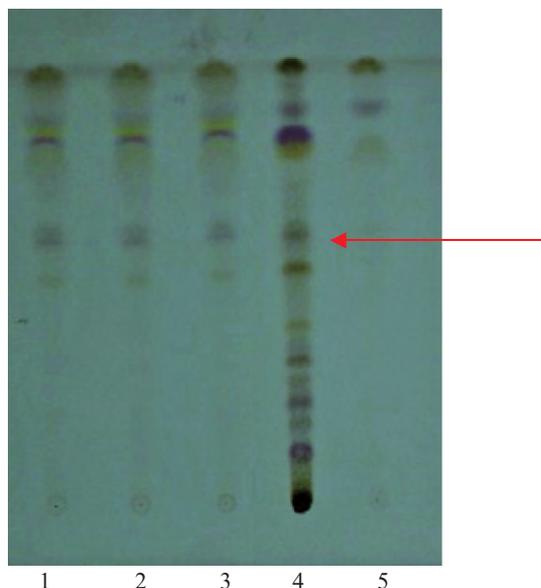
图2 降香 TLC 图谱

2.3 闹羊花^[2] 先取缺闹羊花的阴性样品,照上述2.2项下降香的供试品溶液的制备方法制成缺闹羊花的阴性对照溶液;再取闹羊花对照药材1 g,加水饱和和正丁醇50 mL,超声波提取30 min,静置,取上层液蒸干,残渣加无水乙醇1 mL使溶解,作为闹羊花对照药材溶液。吸取2.2项下的续骨油供试品溶液及上述的缺闹羊花的阴性对照溶液各5 μ L、闹羊花对照药材溶液2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,展开剂是三氯甲烷-甲醇(10:1),展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色清晰,在日光下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照溶液色谱未见相同斑点(见图3)。

3 乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的限量检查^[1,2]

3.1 色谱条件 色谱柱:Dionex Acclaim™120, C₁₈(5 μ m, 4.6 mm×250 mm);流动相A:乙腈-四氢呋喃(5:3);流动相B:0.1 mol/L 醋酸铵溶液(每1 000 mL加冰醋酸0.5 mL);

波长：235 nm；理论板数按乌头碱峰计算应不低于2000；进样量：10 μL。按表1进行梯度洗脱。



1、2、3为供试品溶液 4 闹羊花对照药材 5 缺闹羊花的阴性对照溶液

图3 闹羊花 TLC 图谱

表1 梯度洗脱比例

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~48	15→25	85→75
48~49	26→35	75→65
49~58	35	65
58~65	35→15	65→85

3.2 混合对照品溶液的制备 取乌头碱、新乌头碱及次乌头碱对照品各适量，精密称定，混合，再加异丙醇-三氯甲烷(1:1)溶解，制成每1 mL分别含乌头碱0.136 mg、新乌头碱0.136 mg及次乌头碱0.42 mg的混合溶液，即得。

3.3 供试品溶液的制备 取续骨油样品150 mL，用2%盐酸溶液100 mL振摇，静置30 min，分取下层酸水液，用无水乙醚洗涤提取3次，每次50 mL，上层无水乙醚液弃去，下层酸水液加入浓氨试液，调节pH值至10~11后，再用无水乙醚萃取3次，每次50 mL，最后合并所有的无水乙醚提取液，再在45℃以下减压回收无水乙醚至干，残渣用异丙醇-三氯甲烷(1:1)混合溶液2 mL使溶解，即得。

3.4 专属性考察 按处方量称取缺草乌、川乌的其它药材，照续骨油生产工艺制成缺草乌、川乌的阴性样品，根据3.3项下供试品溶液的制备方法制成缺草乌、川乌的阴性对照溶液；照上述相应的色谱条件测定，在与对照品溶液相应的色谱图中，未见乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的色谱峰，结果显示方法专属性良好。

3.5 精密度试验 平行量取6个续骨油样品(批号：20150901)，精密量取，按上述的高效液相色谱法检测，测定乌头碱、新乌头碱及次乌头碱的总含量，结果RSDO 2.27%，表明仪器的精密度良好。

3.6 检测限试验 见表2。取3.2项下的混合对照品溶液，按上述3.1项下的色谱条件，吸取0.25 μL注入高效液相色谱仪，根据所得峰面积折成3倍信噪比，计算。

表2 双酯型生物碱检测限结果

对照品	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱
测定液浓度/(g/L)	0.136	0.136	0.42
信号/噪音	3.7	5.8	11.7
仪器检出限/μg	0.0276	0.0176	0.0269

3.7 耐用性试验 取续骨油(批号：20150601)供试液，另取岛津C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱，照上述高效液相色谱法进行实验，结果供试品色谱中峰形及分离度均良好。

3.8 样品中双酯型生物碱的限量检查 见表3。精密量取续骨油样品(批号：20150601、20150901、20151101)，按3.3项下方法制成供试品溶液，再按上述的双酯型生物碱的限量检测方法检测乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的总碱含量。

表3 续骨油中双酯型生物碱量度检查结果

批号	取样量/mL	总碱(乌头碱、新乌头碱、次乌头碱)含量/μg/mL
20150601	150	0.0108
20150901	150	0.0111
20151101	150	0.0112

4 士的宁的限量检查^[4]

4.1 色谱条件 色谱柱：Dionex Acclaim™120，C₁₈(5 μm, 4.6 mm×250 mm)；流动相：A是乙腈，B是0.01 mol/L庚烷磺酸钠与0.02 mol/L磷酸二氢钾等量混合溶液(用10%磷酸调节pH值2.8)；检测波长：260 nm；理论板数按士的宁峰计算应不低于5000；进样量：士的宁对照品溶液1 μL，续骨油供试品溶液10 μL。

4.2 对照品溶液的制备 取士的宁对照品适量，精密称定，加三氯甲烷适量使溶解，然后加入甲醇稀释到刻度，制成每1 mL含士的宁0.15 mg的对照品溶液，即得。

4.3 供试品溶液的制备 取续骨油样品60 mL，置250 mL具塞锥形瓶中，加入0.5%盐酸溶液50 mL，回流提取2 h，转至分流漏斗中，锥形瓶用0.5%盐酸30 mL反复洗涤，合并，静置，分取下层液，加浓氨试液调节pH值9~10，再用三氯甲烷萃取3次，每次20 mL，合并所有的三氯甲烷萃取液，蒸干，残渣用甲醇溶解并定容至10 mL，即得。

4.4 专属性考察 按处方量称取缺马钱子的其它药材，照续骨油生产工艺制成不含马钱子的阴性对照样品，按4.3项下供试品溶液的制备方法制成缺马钱子的阴性对照溶液，照4.1项下的

色谱条件测定,结果显示在与对照品溶液相应的色谱图中,未见土的宁的色谱峰,说明方法专属可行。

4.5 精密度试验 平行精密量取6个续骨油样品(批号:20150901)各约150 mL,按上述的土的宁限度检查方法检测,测定样品中土的宁含量,结果RSD为1.87%,表明仪器精密度良好。

4.6 检测限试验 见表4。精密称取土的宁对照品,稀释成每1 mL分别含0.010 1 mg的溶液,按检查方法的色谱条件,吸取1 μ L注入液相色谱仪,测得其信噪比为2.9,确定其检出限为0.010 1 μ g。

表4 土的宁检测限结果

对照品名称	土的宁
测定液浓度/(g/L)	0.010 1
信号/噪音	2.9
仪器检出限/ μ g	0.010 1

4.7 耐用性试验 取续骨油(批号:20150601)供试液,另取岛津C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)色谱柱按上述的高效液相色谱法进行实验,结果供试品色谱中峰形及分离度均良好。

4.8 样品中土的宁的限量检查 见表5。精密量取续骨油样品(批号:20150601、20150901、20151101),按4.3项下方法制成供试品溶液,再按上述的土的宁的限量检测方法检测土的宁的含量。

表5 续骨油中土的宁限量检查结果

批号	取样量(mL)	土的宁含量(μ g/mL)
20150601	60	0.666 4
20150901	60	0.517 0
20151101	60	0.678 5

5 讨论

本实验采用薄层层析色谱法鉴别了续骨油中大黄、降香、闹羊花,结果显示,该三个药材所得的薄层层析色谱斑点清晰可见,续骨油供试品色谱在与各对照药材色谱相应的位置上斑点对应良好,且专属性强,阴性对照无干扰,检验方法准确可行。

续骨油处方中川乌、草乌为国家规定的28味有毒中药材,为了保证患者临床用药的安全有效性,避免和减少不良反

应的发生,本研究采用高效液相色谱法对3批次续骨油作了双酯型生物碱(乌头碱、次乌头碱、新乌头碱)的限量检查,结果显示其平均含量为0.011 0 μ g/mL。根据2010年版《中国药典》制川乌项下规定,双酯型生物碱含量限度为含乌头碱、次乌头碱及新乌头碱总量不得超过0.040%,其“用法用量”项下规定制川乌的每天最大服用量为3 g,折算后乌头碱、次乌头碱及新乌头碱总量每天服用量限度约为1.2 mg,即为每天最大安全服用量。续骨油为外用制剂,说明书规定每天使用3~5次,按每次常用量为10 mL,即每日最大使用量应为50 mL。综合药材质量等因素,因此设定样品每毫升含乌头碱、次乌头碱及新乌头碱总量不得超过24 μ g。结果显示符合双酯型生物碱含量限度标准。

同时,续骨油处方中马钱子也是具有较强毒性的中药材,本研究也利用高效液相色谱法对3批次的续骨油作了土的宁的限量检查,结果显示土的宁的平均含量为0.620 6 μ g/mL。依据《中国药典》马钱子粉项下规定,土的宁含量限度不得超过0.82%,其“用法用量”项下规定马钱子的服用量为0.6 g,折算后土的宁每天服用量约为4.92 mg,即每天最大安全服用量。本制剂为外用制剂,每天使用3~5次,按每次常用量为10 mL,即每天最大使用量为50 mL。按理论计算样品每1 mL含土的宁应不得过264 μ g;为保证临床用药安全,降低患者的不良反应,按《中国药典》马钱子粉项下土的宁含量限度计算,并结合实际的试验结果,把实际样品每1 mL含土的宁设置为应不得过98.4 μ g。结果显示符合土的宁含量限度标准。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 1部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 22, 36, 47, 210, 213, 附录34, 附录36.
- [2] 朱秀奎, 袁春芳, 董文慧, 等. 镇痛口服液中间闹羊花、姜黄的薄层色谱鉴别[J]. 中成药, 1994(11): 54.
- [3] 周敏杰, 陈奕伸, 林静吟, 等. 万应理伤膏质量标准研究[J]. 中药材, 2015, 38(2): 395-397.
- [4] 李嘉华, 陈奕伸, 冯小映, 等. 双香贴膏质量标准研究[J]. 中药材, 2014, 37(11): 2096-2098.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)