

消肿接骨贴中苷类成分的定性定量研究

张金红^{1*}, 房德敏^{1#}, 陈然², 高颖¹, 王巨存¹, 郑榕¹, 冯鑫¹, 赵薇¹, 虎冲²(1.天津市天津医院, 天津 300211; 2.天津医科大学临床医学院, 天津 300270)

中图分类号 R283.62[†]; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1037-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.27

摘要 目的:建立消肿接骨贴中苷类成分的定性定量方法。方法:应用薄层色谱(TLC)法对制剂中的续断和黄芪同时进行定性鉴别,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)的下层溶液为展开剂,10% (V/V)的硫酸乙醇溶液为显色剂。应用高效液相色谱(HPLC)法对制剂中的柚皮苷进行含量测定:色谱柱为Thermo C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(18:82, V/V),检测波长为283 nm。结果:续断和黄芪的TLC斑点清晰、分离良好,阴性对照无干扰。柚皮苷进样量在0.062 1~0.621 0 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.999 7$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为99.31%, RSD=1.73% ($n=9$)。结论:本研究建立的方法专属性强、灵敏度高、简便、准确、重复性好,可以用于消肿接骨贴中苷类成分的定性定量研究。

关键词 消肿接骨贴; 苷类; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

Qualitative and Quantitative Study of Glycosides in Xiaozhong Jiegu Plasters

ZHANG Jin-hong¹, FANG De-min¹, CHEN Ran², GAO Ying¹, WANG Ju-cun¹, ZHENG Rong¹, FENG Xin¹, ZHAO Wei¹, HU Chong²(1.Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 2.Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300270, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for qualitative and quantitative study of glycosides in Xiaozhong jiegu plaster. METHODS: *Dipsacus asper* and *Astragali Radix* were identified simultaneously by TLC using chloroform-methyl alcohol-water(13:7:2, V/V/V) as developing solvent and 10% (V/V) sulfuric acid ethanol as chromogenic agent. HPLC method was used to determine the content of naringin. The determination was performed on Thermo C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water(18:82, V/V) and the detection wavelength was set at 283 nm. RESULTS: TLC spots of *D. asper* and *Astragali Radix* were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of naringin was 0.062 1-0.621 0 μg ($r=0.999 7$) with an average recovery of 99.31% (RSD=1.73%, $n=9$). RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is specific, sensitive, simple, accurate and reproducible, and it is suitable for qualitative and quantitative identification of glycosides in Xiaozhong jiegu plasters.

KEYWORDS Xiaozhong jiegu plasters; Glycosides; TLC; HPLC

260 nm^[7-9],笔者通过对天钻药材的色谱图进行比较后,确定检测波长为260 nm。后又对色谱柱、流动相进行了筛选,最终确定文中色谱条件,且分离效果较好。

关于天钻中化学成分的研究较少,均完成于20世纪90年代以前,其有效成分至今尚未明确。本研究中,笔者选择天钻中含有肾毒性成分的马兜铃酸A作为指标进行含量测定,目的在于提示在天钻使用过程中应注意用药的安全性。本研究发现,购买的天钻药材中马兜铃酸A的质量分数均小于千分之一,这是否因放置时间太长或是受地域因素的影响,值得进一步研究。

综上所述,所建标准可用于天钻药材的质量控制。

参考文献

[1] 戴斌.中国现代瑶药[M].南宁:广西科学技术出版社,2009:79-81.

* 药师, 硕士。研究方向:临床药学、中药制剂。电话:022-28322056。E-mail:15222836926@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:药事管理、临床药学。电话:022-28317052。E-mail:fdm-wx@sohu.com

- [2] 周法兴,梁培瑜,瞿赐荆,等.广西马兜铃的化学成分研究[J].药学学报,1981,16(8):638.
- [3] 广西医药研究所化学室.圆叶马兜铃等三种中草药的镇痛有效部位研究[J].中草药通讯,1977,8(17):39.
- [4] 广西医药研究所化学室.圆叶马兜铃等三种中草药的镇痛实验和临床观察小结[J].中草药通讯,1977,8(10):30.
- [5] 洪庚辛,韦宝伟,贾文才,等.圆叶马兜铃总生物碱镇痛作用机制的研究[J].中国中药杂志,1985,10(1):38.
- [6] 苟蓉,周莉,刘芳.马兜铃酸肾病发病机制的研究进展[J].中国中西医结合杂志,2010,30(2):215.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录34、附录52、附录53、附录62.
- [8] 雷沛霖,李烧烧,黄兰岚.芫花药材质量标准研究[J].药物分析杂志,2008,28(5):834.
- [9] 沈洁,徐向辉,徐军.贝母新咳合剂的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(31):2939.

(收稿日期:2013-10-31 修回日期:2014-01-26)

消肿接骨贴是依据天津市天津医院骨科专家的经验处方,经改良制备工艺后制成的中药复方制剂,具有舒筋活血、化瘀、补肾壮骨、促进骨折愈合、消肿止痛之功效,临床上对各种类型的骨折、跌打损伤和骨质疏松等症均具有显著的疗效。该方由骨碎补、苏木、续断、羌活、川芎、赤芍、黄芪等十几味中药提取精制而成,各种成分互相干扰,给质量标准的制定带来了一定程度上的困难。组方分析显示,该方中骨碎补、续断和黄芪均含苷类有效成分。其中,君药骨碎补具有良好的促进骨折愈合、抗骨质疏松、抗炎等活性^[1],其主要药效成分之一为黄酮类化合物柚皮苷。君药续断的主要药效成分为续断皂苷,具有抗骨质疏松、增加骨密度和促进骨损伤愈合的作用^[2]。佐药黄芪具有增强骨碱性磷酸酶活性,抑制骨胶原、骨磷的丢失以防治骨质疏松的作用^[3],其主要药效成分之一为黄芪甲苷。笔者参照《中国药典》^[4]及相关文献^[5-6],对组方中某些含苷类成分的药物进行定性、定量研究,建立了续断和黄芪同时定性鉴别和柚皮苷含量测定的方法。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱(HPLC)仪,含512型泵、486型紫外检测器、Millennium 2010型色谱工作站(美国Waters公司);SKF-24A型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率:1 000 W,频率:25 kHz);SLD-1型薄层色谱(TLC)摄影仪、硅胶G预制板(天津市思利达科技有限公司);BL-220H型电子天平(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

消肿接骨贴(批号:20120113、20120126、20120218)及其阴性样品均由天津市天津医院制剂室自制;川续断皂苷VI、黄芪甲苷、柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111685-2004001、110781-200613、110722-201111);乙腈、甲醇为色谱纯,水为经二次蒸馏的纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 续断和黄芪的TLC同时鉴别

取本品1贴,弃去背衬,剪碎,置于100 ml具塞锥形瓶中,加入甲醇50 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml使溶解并转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇振荡提取3次,每次30 ml,合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次30 ml,合并正丁醇液并蒸干,残渣加甲醇使溶解并定容于25 ml棕色量瓶中,摇匀,即得供试品溶液。分别取缺黄芪和缺续断的其他药材各一份,按相同生产工艺及供试品溶液制备方法分别制成缺黄芪和缺续断的阴性对照溶液。另取川续断皂苷VI和黄芪甲苷对照品各适量,分别加甲醇制成每1 ml含1 mg的对照品溶液。照TLC法^[4]试验,分别吸取黄芪甲苷对照品溶液、缺黄芪的阴性对照溶液、供试品溶液、缺续断的阴性对照溶液和川续断皂苷VI对照品溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)的下层溶液为展开剂,预平衡15 min,展开,取出,晾干,喷以10%(V/V)硫酸乙醇溶液,于105℃加热至斑点显色清晰。结果显示,供试品色谱中,在与黄芪甲苷对照品和川续断皂苷VI对照品相应位置上,日光下均显相同颜色的斑点,紫外光灯(365 nm)下均显

相同颜色的荧光斑点,而缺黄芪和缺续断的阴性对照溶液均无此特征斑点。黄芪和续断的TLC图见图1。

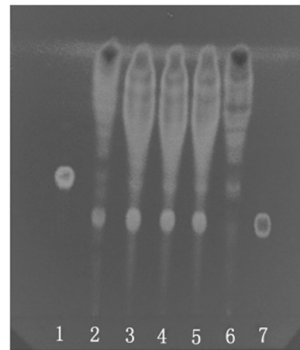


图1 黄芪和续断的TLC图

1. 黄芪甲苷对照品;2. 缺黄芪阴性对照;3~5. 供试品;6. 缺续断阴性对照;7. 川续断皂苷VI对照品

Fig 1 TLC of *D. asper* and *Astragali Radix*

1. astragaloside IV control; 2. negative control without *Astragali Radix*; 3-5. test samples; 6. negative control without *D. asper*; 7. asperosaponin VI control

2.2 柚皮苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Thermo C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(18:82, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:283 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。

2.2.2 对照品溶液的制备 取经五氧化二磷减压干燥36 h的柚皮苷对照品约10 mg,精密称定,置于10 ml干燥的棕色量瓶中,加适量甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取1.5 ml,置50 ml干燥的棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得质量浓度为31.05 μg/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取同一批号的消肿接骨贴10片,弃去背衬,称定质量,剪碎,取膏贴约5 g,精密称定,置于100 ml具塞锥形瓶中,精密加甲醇25 ml,称定质量,超声提取30 min,取出,放至室温,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按相同处方比例制备不含骨碎补的阴性样品,再按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.2.5 系统适用性试验 取柚皮苷对照品、供试品与阴性对照溶液各适量,按上述色谱条件进样测定。结果表明,供试品中柚皮苷色谱峰与相邻成分的色谱峰可达基线分离,处方中其他成分对测定无干扰。理论板数以柚皮苷峰计算应不小于3 000,分离度>1.5。色谱见图2。

2.2.6 线性关系考察 分别精密吸取柚皮苷对照品溶液2、4、8、10、12、16、20 μl,按上述色谱条件依次进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,进样量(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 1\ 636\ 650.072\ 2x - 20\ 518.985\ 9$ ($r = 0.999\ 7, n = 7$)。结果表明,柚皮苷进样量在0.062 1~0.621 0 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.2.7 精密密度试验 精密吸取对照品溶液适量,按上述色谱条件进样10 μl,重复进样6次,测定柚皮苷峰面积。结果显示, RSD=1.12% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一批号的供试品溶液适量,分别在

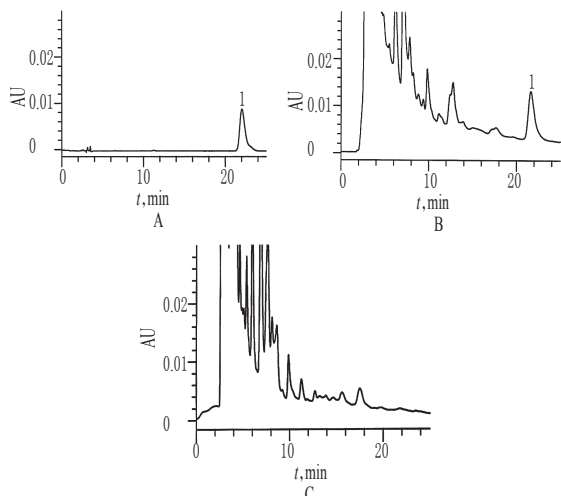


图2 高效液相色谱图

A. 柚皮苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 柚皮苷

Fig 2 HPLC chromatograms

A. naringin control; B. test sample; C. negative control; 1. naringin

制备后0、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样10 μl,测定柚皮苷峰面积。结果显示,RSD=1.34% (n=6),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批号的消肿接骨贴样品6份,每份5.0 g,精密称定,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果显示,样品中柚皮苷的平均含量为0.142 5 mg/g, RSD=1.41% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 称取已知含量(0.144 0 mg/g)的同一批号消肿接骨贴样品9份,每份约2.5 g,精密称定,每3份为一组,按高、中、低3个不同的量级分别精密加入一定量的柚皮苷对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

编号	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	2.508	0.3610	0.3002	0.6576	98.80		
2	2.508	0.3610	0.3002	0.6542	97.68		
3	2.503	0.3603	0.3002	0.6522	97.26		
4	2.501	0.3600	0.3830	0.7436	100.17		
5	2.501	0.3600	0.3830	0.7410	99.47	99.31	1.73
6	2.502	0.3602	0.3830	0.7327	97.28		
7	2.506	0.3608	0.4658	0.8358	102.00		
8	2.507	0.3609	0.4658	0.8257	99.80		
9	2.504	0.3605	0.4658	0.8325	101.35		

2.2.11 样品含量测定 分别取3批消肿接骨贴样品各适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中柚皮苷的含量,结果见表2。

3 讨论

续断的TLC鉴别曾采用2010年版《中国药典》(一部)续断药材的鉴别方法^[4],结果TLC呈带状,无明显特征斑点;后采用饱和和正丁醇萃取的方法对样品适当纯化,结果在与川续断

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

批号	柚皮苷含量,mg/g	RSD,%
20120113	0.144 1	1.18
20120126	0.142 9	1.71
20120218	0.141 1	1.34

皂苷VI对照品色谱相应位置呈现特征斑点,但斑点不够清晰。笔者在摸索黄芪的TLC鉴别试验时,发现续断和黄芪可以采用同一供试品制备方法和展开系统,两者特征斑点均分离良好。此方法减轻了谱带底色,消除了斑点拖尾的弊端,特征斑点清晰,并且一块薄层板在相同条件下可以同时鉴定两种药材成分。

由于消肿接骨贴组方复杂,在摸索消肿接骨贴中柚皮苷的含量测定方法时,笔者曾采用甲醇-冰醋酸-水(35:4:60, V/V)^[7]、乙腈-0.1%磷酸溶液(20:80, V/V)^[8]和乙腈-水(20:80, V/V)^[9]为流动相,通过对各流动相及其不同配比的试验,综合考虑柚皮苷主峰和相邻峰的分度,以及保留时间和操作的简便性,最终确定乙腈-水(18:82, V/V)作为试验所用流动相。

中医理论讲究整体协同作用,讲究君臣佐使,中药复方制剂常采用君药或用剂量较大的药味作为质量控制的指标,但这种方法较为片面。本试验选择消肿接骨贴中君药骨碎补、续断和佐药黄芪等3味药中的苷类成分作为质量控制指标,对TLC鉴别中样品的前处理方法和色谱条件,含量测定中样品的提取方法、流动相种类与比例等进行逐一的摸索试验,建立了文中质控方法。试验结果表明,所建方法操作简便、专属性强、重复性好,可为消肿接骨贴的质量控制提供有效、可行的操作标准。

参考文献

- [1] 刘玲玲,曲玮,梁敬钰.骨碎补化学成分和药理作用研究进展[J].海峡药学,2012,24(1):4.
- [2] 谭洪根,林生,张启伟,等.高效液相色谱法测定续断药材中川续断皂苷VI的含量[J].中国中药杂志,2006,31(9):726.
- [3] 潘静华,张海啸,李芳芳,等.黄芪对去卵巢大鼠骨组织的动态影响[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(3):251.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:88、附录34、309.
- [5] 刘玉魁,余卫兵,刘燕娟.黄芪生脉口服液的质量控制[J].中国药师,2010,13(2):188.
- [6] 高颖,房德敏,王巨存,等.苏氏接骨胶囊中骨碎补和菟丝子的质量控制[J].中国医院药学杂志,2010,30(4):333.
- [7] 蔡晔芬.HPLC法测定橘红枇杷颗粒中柚皮苷的含量[J].中国药房,2011,22(19):1798.
- [8] 王光忠,刘艳菊,刘焱文.小儿喜食糖浆的质量控制研究[J].中国医院药学杂志,2008,28(23):2056.
- [9] 王明礼,刘志刚,黄雪峰.反相HPLC法测定升降胶囊中柚皮苷的含量[J].广州医药,2009,40(6):55.

(收稿日期:2013-03-01 修回日期:2013-05-27)