

· 研究报告 ·

活骨丸质量标准研究

叶盛英¹, 郭琪², 雷虹², 杨莹² (1. 解放军 254 医院药剂科, 天津 300142; 2. 北京军区联勤部药品仪器检验所, 北京 100071)

[摘要] 目的 对活骨丸进行质量标准研究。方法 采用薄层色谱法, 对制剂中丹参、地黄、当归、川芎、三七、土鳖虫、制草乌进行专属性鉴别; 采用高效液相色谱(HPLC)法对方三七有效成分人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 进行含量测定。以乙腈和水按不同比例混合后进行梯度洗脱, 流速每为 1.0 ml/min; 柱温 30 ℃; 检测波长为 203 nm; 进样量为 10 μl。结果 丹参、地黄、当归、川芎、三七、土鳖虫、制草乌等的薄层图谱特征斑点清晰, 分离度好, 阴性对照无干扰。三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1} 和 R_{g1} 分别在 39.92~399.2、84.28~842.8 μg/ml 和 135.86~1358.6 μg/ml 范围内有良好的线性关系; 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_{g1} 的平均回收率分别为 102.35%、103.84%、102.97%, RSD 均小于 2.0%。结论 所建立的质量标准准确、重复性良好, 可用于活骨丸的质量控制。

[关键词] 活骨丸; 人参皂苷 R_{g1}; 人参皂苷 R_{b1}; 三七皂苷 R₁; 高效液相色谱; 薄层色谱; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)02-0156-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.012

Research on quality control of Huoguan

YE Shengying¹, GUO Qi², LEI Hong², YANG Ying² (1. No. 254 Hospital of PLA, Tianjin 300142, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control of Beijing Military Area Command, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective** To establish the quality control method for Huoguan. **Methods** TLC was applied to detect the component of Danshen, Dihuang, Danggui, Chuanxiong, Sanqi, Tubiechong, and Zhicao Wu in this compound preparation. HPLC was used to measure the concentration of Renshenzaogan R_{g1}, R_{b1} and Sanqizaogan R₁. Unitary C₁₈ analytical column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water as the mobile phase (Flow rate: 1.0 ml/min, column temperature: 30 ℃, wavelength: 203 nm). **Results** Each component showed distinct spots on TLC without interference. There are good linear relationship for Sanqizaogan R₁ in the range of 39.92-399.2 μg/ml, Renshenzaogan R_{b1} in 84.28-842.8 μg/ml and Renshenzaogan R_{g1} in 135.86-1358.6 μg/ml. The recovery was 102.35%, 103.84% and 102.97% respectively. **Conclusion** The above described procedure was accurate and reproducible, which can be used as a method for the quality control of Huoguan.

[Key words] Huoguan; Renshenzaogan R_{g1}; Renshenzaogan R_{b1}; Sanqizaogan R₁; HPLC; TLC; quality control

活骨丸是由三七、熟地黄、丹参、土鳖虫、川芎、当归、制川乌和制草乌等十味中药组成的复方制剂, 具有舒筋活骨, 散瘀止痛的功效。用于股骨头无菌性坏死、骨质疏松、脱钙、肢体疼痛、麻木拘挛、腰膝无力、步履艰难等症状者。该制剂为 66400 部队骨病专科医院制剂室自制, 在临床应用多年, 取得了很好的治疗效果, 为更好地对药品质量进行监控, 本研

究拟建立活骨丸质量控制标准, 既含有有效成分的测定, 也包括对毒性成分的控制。在有效成分测定上, 笔者对君药三七中所含的 3 种皂苷进行含量测定, 对其余几味药材采用薄层色谱(TLC)法进行快速检测^[1,2]; 在安全性的控制上, 对方中制川乌、制草乌所含剧毒成分乌头碱进行限量检测^[3,4]。

1 仪器、试药与药品

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, VWD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站。

1.2 试药

甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水。三七皂苷 R₁ 对照品(批号: 110745-200415), 人参皂苷 R_{g1} 对

[基金项目] 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(13ZJ10)

[作者简介] 叶盛英, 博士, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 中药制剂及药事管理, Tel: 13512069393, Email: 13512069393@163.com

[通讯作者] 郭琪, 硕士, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 中药药物分析研究, Tel: 13801306094, Email: guoqi_yjs@sina.com

照品(批号:110703-201027,纯度:96.3%),人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号:110704-201223,纯度:95.9%),丹参酮 IIA 对照品(110766-200619),乌头碱对照品(110720-200410),丹参对照药材(120923-200408),地黄对照药材(121180-200604),当归对照药材(120927-201014),川芎对照药材(120918-200406),三七对照药材(120941-201108),土鳖虫对照药材(121533-200702)均购自中国食品药品检定研究院;制川乌对照药材(130624),制草乌对照药材(130624)均购自北京博雅开元科技开发有限公司。

1.3 药品

活骨丸(批号:20121113、20120301、20130313、20130903)及阴性样品均由 66400 部队骨病专科医院制剂室提供。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 丹参的 TLC 鉴别

取本品 2 丸,剪碎,加甲醇 30 ml,超声 1 h,过滤,滤液浓缩至 5 ml,作为供试品溶液;参照《中华人民共和国药典》方法制备丹参对照药材溶液和丹参酮 IIA 对照品溶液^[1]。按照 TLC 法试验^[1,5],吸取上述 3 种溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-二氯甲烷-丙酮(5:4:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性样品无干扰(图 1)。

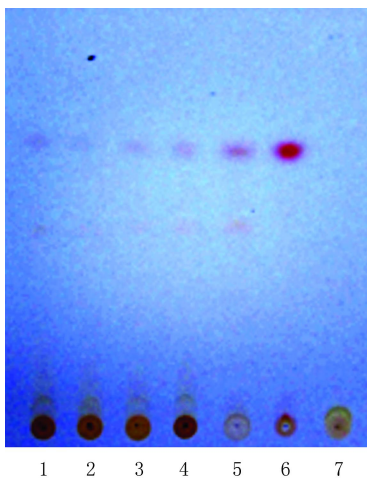


图 1 丹参 TLC 图

1~4. 供试品溶液;5. 丹参对照药材;
6. 丹参酮 IIA 对照品;7. 缺丹参阴性对照

2.1.2 地黄的 TLC 鉴别

取本品 2 丸,剪碎,加乙醚 30 ml,加热回流 1 h,回收乙醚至 0.5 ml,作为供试品溶液。取地黄 1 g,同法制成地黄对照药材溶液^[1]。按照 TLC 法试验。吸取上述两种溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-氨水(16:4:2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。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。阴性样品无干扰(图 2)。

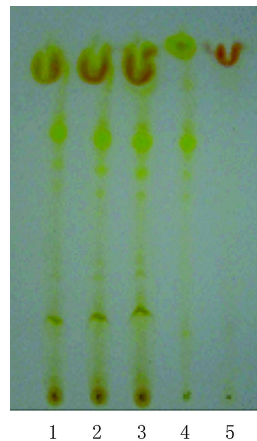


图 2 地黄 TLC 图

1~3. 供试品溶液;4. 地黄对照药材;
5. 缺生地黄和熟地黄的阴性对照

2.1.3 当归、川芎的 TLC 鉴别

取本品 2 丸,剪碎,加乙醚 30 ml,加热回流 1 h,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。取当归、川芎各 1 g,同法制成对照药材溶液。按照 TLC 法试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,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。阴性样品无干扰(图 3)。

2.1.4 三七的 TLC 鉴别

取本品 1 丸,剪碎,加甲醇 20 ml,超声 30 min,滤过,滤液浓缩至 1 ml,作为供试品溶液。参照《中国药典》方法制备三七对照药材溶液和三种皂苷的混合对照溶液(三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_{g1})^[1]。按照 TLC 法试验^[5],吸取上述 3 种溶液各 5 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。取 1 ml 硫酸溶液,用水定容至 10 ml,用稀释后的硫酸溶液喷在展开的硅胶板上,在 105 °C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显紫红色的斑点。阴性样品无干扰(图 4)。

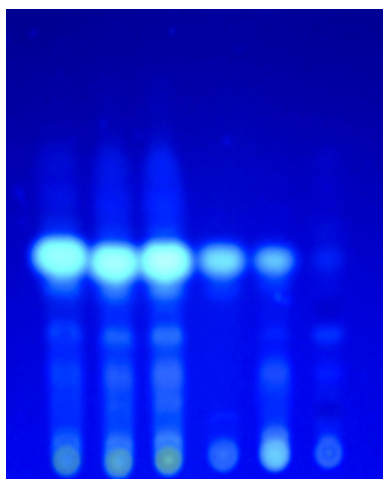


图3 当归、川芎 TLC图

1~3. 供试品溶液;4. 当归对照药材;
5. 川芎对照药材;6. 缺当归、川芎的阴性对照

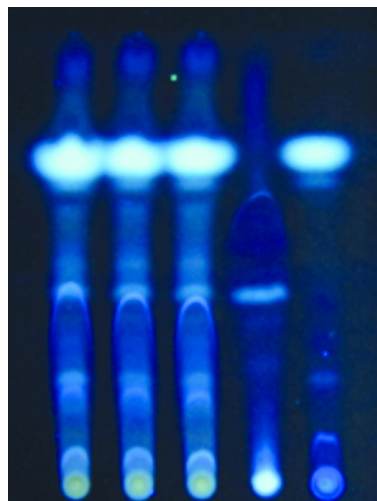


图5 土鳖虫 TLC图

1~3. 供试品溶液;4. 土鳖虫对照药材;
5. 缺土鳖虫的阴性对照

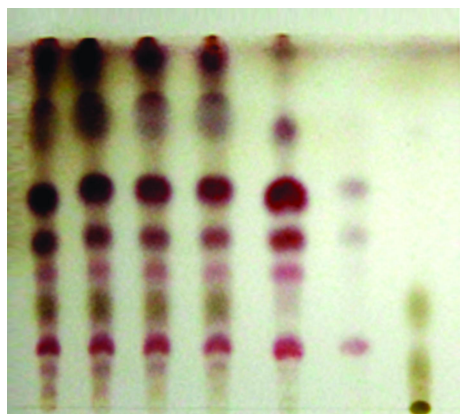


图4 三七 TLC图

1~4. 供试品溶液;5. 三七对照药材;6. 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1}和人参皂苷 R_{g1}的混合对照品;7. 缺三七的阴性对照

2.1.5 土鳖虫的 TLC 鉴别

取本品 2 丸,剪碎,加乙醚 30 ml,加热回流 1 h,滤过,滤液浓缩至约 1 ml,作为供试品溶液。取土鳖虫 1 g,同法制成对照药材溶液。按照 TLC 法试验^[1],吸取上述两种溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-二氯甲烷-丙酮(5:5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(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。阴性样品无干扰(图 5)。

2.1.6 制川乌、制草乌的 TLC 鉴别

取本品 7 丸,剪碎,加乙醚 100 ml,振摇 5 min,再加氨试液 50 ml,振摇 5 min,放置过夜,滤过,分取乙醚层,残渣用乙醚 20 ml 洗涤,合并乙醚液,挥

干,残渣用无水乙醇溶解,定容至 5 ml,作为供试品溶液。另取制川乌、制草乌对照药材 0.5 g,加乙醚 20 ml,振摇 5 min,再加氨试液 2 ml,同法制成 2 ml 对照药材溶液。按照 TLC 法试验^[7],吸取上述两种溶液各 30 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-甲醇(6.4:3.6:1)为展开剂,置氨蒸气饱和 20 min 的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以稀碘化铋钾试液,放置在碘缸中熏至斑点清晰。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。阴性样品无干扰(图 6)。

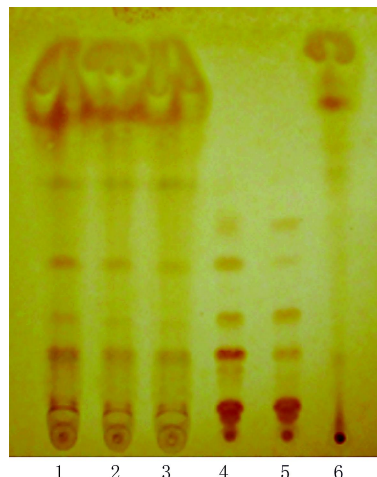


图6 制川乌、制草乌 TLC图

1~3. 供试品溶液;4. 制川乌对照药材;5. 制草乌对照药材;6. 缺制川乌、制草乌的阴性对照

2.2 乌头碱的限量检测

取本品 7 丸,剪碎,加乙醚 100 ml,振摇 5 min,再加氨试液 50 ml,振摇 5 min,放置过夜,滤过,分

取乙醚层,残渣用乙醚 20 ml 洗涤,合并乙醚液,挥干,残渣加无水乙醇溶解,并定容至 5 ml,作为供试品溶液。另取乌头碱对照品适量,加无水乙醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。按照 TLC 法试验,吸取供试品溶液 5 μ l,对照品溶液 2.5、5、10 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-甲醇(6.4 : 3.6 : 1)为展开剂,置氨蒸气饱和 20 min 的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以稀碘化铋钾试液,放置在碘缸中熏至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上出现的斑点小于对照品的斑点,或不出现斑点(图 7)。

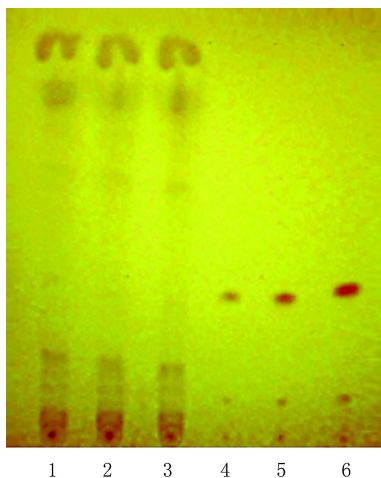


图 7 乌头碱限量的 TLC 图

1~3. 供试品溶液;4~6. 乌头碱对照品溶液(2.5、5、10 μ l)

2.3 HPLC 法测定 3 种皂苷的含量

2.3.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱为 Unitary C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),以乙腈为流动相 A,水为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;流速为 1.0 ml/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长为 203 nm。按三七皂苷 R₁ 峰计算理论板数不得低于 4 000,人参皂苷 R_{g1} 峰和三七皂苷 R₁ 峰的分度应大于 2.0。

表 1 分离皂苷的梯度洗脱程序

| 时间 (t/min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
|---------------|--------------|--------------|
| 0~10 | 19 | 81 |
| 10~25 | 19~36 | 81~64 |

2.3.2 供试品溶液的制备

取重量差异项(批号:20120313)下的本品 5 丸,剪碎,混匀,取约 3.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 ml,密塞,超声处理(功率 300 W,频率 45 kHz)45 min,放冷至室温,用甲醇补足减失

的重量,摇匀,滤过,即得。

2.3.3 阴性对照溶液的制备

按处方量配制缺三七药材的阴性对照样品,按“2.3.2”项下条件制备阴性对照溶液。

2.3.4 对照品溶液的制备

分别精密称取 3 种皂苷对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含三七皂苷 R₁ 0.16 mg、人参皂苷 R_{g1} 0.55 mg、人参皂苷 R_{b1} 0.35 mg 的混合溶液,即得。

2.3.5 专属性试验

取阴性对照溶液、供试品溶液和对照品溶液分别进样,并记录色谱图,结果表明,样品中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_{g1} 峰与其他组分色谱峰能达到基线分离,阴性对照液中色谱峰对测定无干扰(图 8)。

2.3.6 稳定性试验

精密称取供试品(批号:20120313)3090.1 mg,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,于 0、1、2、3、6、20 h 测定 3 种皂苷的峰面积。结果表明,三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的 RSD 分别为 1.74%、1.56%、1.17%,均小于 2.0%,表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.3.7 精密度试验^[8]

取混合皂苷溶液,连续进样 6 次,以峰面积计算,测得三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_{g1} 的 RSD 分别为 0.21%、0.12% 和 0.14%。

2.3.8 重复性试验

取同一批次(批号:20130313)的活骨丸 6 份,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,并进行测定。结果三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的平均含量分别为 0.68、2.64、1.69 mg/g, RSD 分别为 0.61%、1.29%、1.44%。

2.3.9 线性关系的考察

分别精密称取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 对照品 9.98、35.27、21.97 mg 至 25 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备溶液。分别精密量取对照品储备溶液 0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、4.0 ml 分别置 5 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。按“2.3.1”项下色谱条件测定峰面积,分别以对照品浓度(μ g/ml)为横坐标(X),峰面积(Y)为纵坐标,进行回归处理,绘制标准曲线。

三七皂苷 R₁ 的线性方程为:

$$Y=2.2987X+1.3211, r=0.9996;$$

人参皂苷 R_{g1} 的线性方程为:

$$Y=2.5853X+46.9620, r=0.9997;$$

人参皂苷 R_{b1} 的线性方程为:

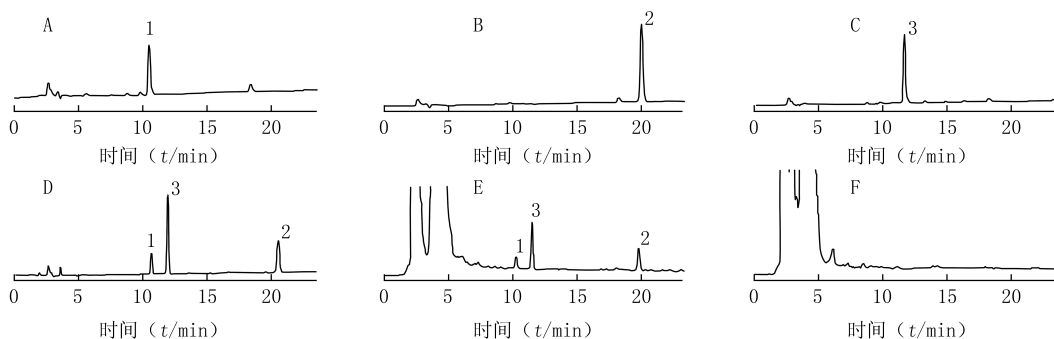


图8 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_{g1} 专属性实验

A. 三七皂苷 R₁ 对照品; B. 人参皂苷 R_{b1} 对照品; C. 人参皂苷 R_{g1} 对照品; D. 混合对照品; E. 样品(批号:20121113); F. 阴性对照; 1. 三七皂苷 R₁; 2. 人参皂苷 R_{b1}; 3. 人参皂苷 R_{g1}

$$Y = 2.3497X + 14.0359, r = 0.9998.$$

结果表明,三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和 R_{b1} 分别在 39.92~399.2 μg/ml, 135.86~1358.6 μg/ml 和 84.28~842.8 μg/ml 浓度范围内有良好的线性关系。

2.3.10 加样回收率试验

称取已知含量的同一批样品(批号:20120313)约 2.5 g(6份),按 100% 比例分别精密加入 3 种皂苷的混合对照品溶液(0.399 2、1.358 6、0.842 8 mg/ml) 5 ml,按“2.3.3”项下供试品溶液的制备方法,依色谱条件测定并计算回收率。结果见表 2。

表2 加样回收率试验(n=6)

| 化合物 | 取样量(m/mg) | 加入量(m/mg) | 测得量(%) | 回收率(%) | RSD(%) |
|----------------------|-----------|-----------|--------|--------|--------|
| 三七皂苷 R ₁ | 1.738 | 1.996 | 3.691 | 97.85 | 1.47 |
| | 1.728 | 1.996 | 3.588 | 93.19 | |
| | 1.743 | 1.996 | 3.678 | 96.94 | |
| | 1.758 | 1.996 | 3.826 | 103.61 | |
| | 1.752 | 1.996 | 3.826 | 103.91 | |
| | 1.734 | 1.996 | 3.746 | 100.80 | |
| 人参皂苷 R _{g1} | 6.748 | 6.793 | 13.798 | 103.78 | 0.63 |
| | 6.709 | 6.793 | 13.702 | 102.94 | |
| | 6.767 | 6.793 | 13.861 | 104.43 | |
| | 6.827 | 6.793 | 13.880 | 103.83 | |
| | 6.804 | 6.793 | 13.915 | 104.68 | |
| | 6.731 | 6.793 | 13.752 | 103.36 | |
| 人参皂苷 R _{b1} | 4.320 | 4.214 | 8.573 | 100.93 | 1.57 |
| | 4.295 | 4.214 | 8.488 | 99.50 | |
| | 4.332 | 4.214 | 8.502 | 98.96 | |
| | 4.370 | 4.214 | 8.653 | 101.64 | |
| | 4.355 | 4.214 | 8.694 | 102.97 | |
| | 4.309 | 4.214 | 8.623 | 102.37 | |

2.3.11 含量测定

按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,共测定 4 批样品的含量,如表 3 所示。

表3 样品含量测定结果(mg/g)

| 批号 | 三七皂苷 R ₁ | 人参皂苷 R _{g1} | 人参皂苷 R _{b1} | 总量 |
|----------|---------------------|----------------------|----------------------|------|
| 20120313 | 0.68 | 2.64 | 1.69 | 5.01 |
| 20120301 | 0.75 | 3.24 | 1.93 | 5.92 |
| 20130903 | 0.70 | 2.92 | 1.85 | 5.47 |
| 20121113 | 0.80 | 3.29 | 1.94 | 6.03 |

3 讨论

3.1 定性鉴别

通过实验,确定了活骨丸中丹参、地黄、三七、土鳖虫、当归、川芎、制川乌、制草乌的 TLC 鉴别方法,且相应的阴性样品均没有干扰,表明所建立方法专属性好。在对丹参和地黄的鉴别中,笔者将《中国药典》方法中所用到的三氯甲烷展开剂替换为毒性较低的二氯甲烷,并不影响分离效果,因此对原有方法进行了修订。

3.2 色谱条件

在确定色谱条件时,考察了甲醇作为溶剂时的不同处理方法(超声、冷浸、回流提取)以及处理时间(30、45、60 min)对样品含量测定的影响,综合考虑后选择超声处理 45 min 为最优结果。

3.3 耐用性实验

比较了 4 种不同类型色谱柱:① Unitary C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);② Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);③ Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);④ DIKMA Inertsil ODS-3(4.6 mm×250 mm, 5 μm)对样品中

皂苷的分离效果,结果显示所测定的3种皂苷的分离度和理论塔板数均能符合要求,表明该方法适用于多个型号的C₁₈色谱柱,见图9。

比较样品在相同色谱柱[色谱柱:Unitary C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)]不同仪器上的分离状态,结果表明该方法仪器耐用性较好,见图10。

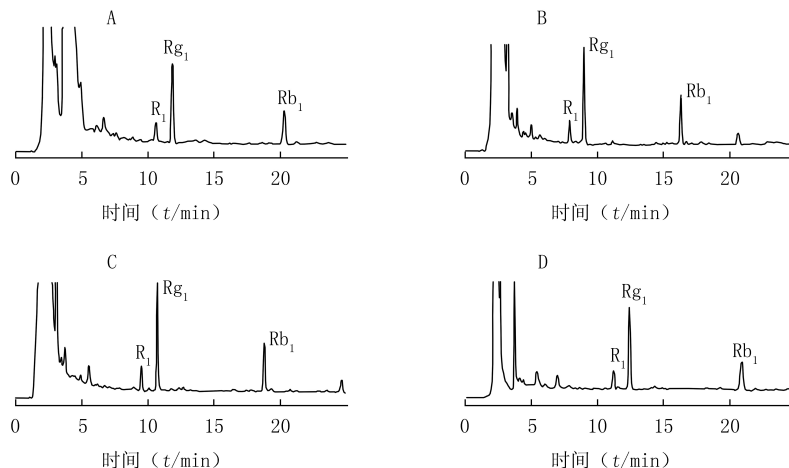


图9 不同色谱柱的比较

A. Unitary C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);B. Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);
C. Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);D. DIKMA Inertsil ODS-3(4.6 mm×250 mm,5 μm)

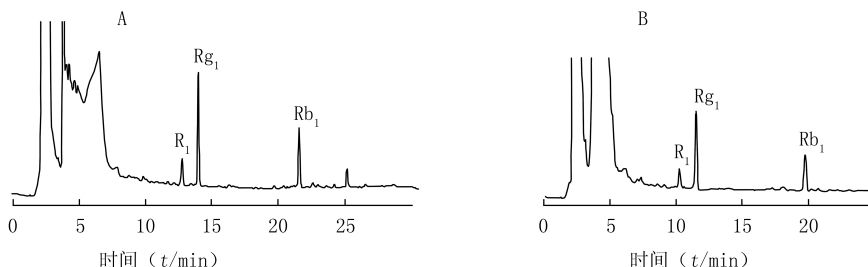


图10 不同HPLC仪分离效果的比较

A. 岛津;B. Agilent 1100

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部):2015年版[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:76,11.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典中药材薄层色谱彩色图集[M].北京:人民卫生出版社,2008:144.
[3] 张宏桂,马辰,巫毅,等. 复方酒剂中乌头碱含量的测定及其中毒剂量的研究[J]. 吉林大学学报(理学版),2005,43(5):677-679.
[4] 魏玉辉,王晓华,沈明谦,等. 藤药中乌头碱含量测定HPLC方法的建立[J]. 中成药,2008,30(1):130-131.

[5] 严楚顺,张雪静,尤晓燕. 复方参桂胶囊的质量标准研究[J]. 中成药,2007,29(9):1321-1324.
[6] 李嘉华,林静伶,冯小映,等. 活络止痛膏的质量标准研究[J]. 中医药导报,2015(12):20-23.
[7] 王东孝. 雪上一枝蒿化学成分与药物质量控制研究[D]. 郑州:河南大学,2013.
[8] 熊梅,闫倩玲,杨文芬. 高效液相色谱梯度洗脱法测定血塞通胶囊中三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、Rb₁的含量[J]. 时珍国医国药,2004,15(3):134-135.

【收稿日期】 2017-06-13 【修回日期】 2017-11-14

【本文编辑】 李睿旻