

痹痛消巴布膏的质量标准研究

詹强¹, 陈红梅¹, 俞忠明², 王娜妮²(1.杭州市中医院, 杭州 310007; 2.浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要: 目的 建立痹痛消巴布膏的质量标准。方法 按照中国药典一部规定, 进行薄层色谱鉴别和含量测定研究。以槲皮素为指标, 建立桑寄生的鉴别方法; 以红花药材为对照, 建立红花的鉴别方法; 以丹酚酸 B 为指标, 建立丹参的 HPLC 含量测定方法。结果 采用甲醇-水提取, 酸水解, 以甲苯(水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1)为展开剂, 可鉴别巴布膏中的桑寄生; 采用 80%丙酮溶液提取, 以乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇(7:2:3:0.4)为展开剂, 可鉴别巴布膏中的红花。在 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈(3:1)为有机相(A), 1.7%甲酸水溶液为水相(B), A:B=30%:70%等度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 检测波长 286 nm 条件下, 巴布膏中丹酚酸 B 能有效分离, 方法学考察符合含量测定要求。结论 建立的质量标准能够用于痹痛消巴布膏的质量控制。

关键词: 痹痛消巴布膏; 质量标准; 桑寄生; 红花; 丹参; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.11 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)07-1050-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.023

引用本文: 詹强, 陈红梅, 俞忠明, 等. 痹痛消巴布膏的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1050-1053.

Quality Standard Research of Bitongxiao Cataplasms

ZHAN Qiang¹, CHEN Hongmei¹, YU Zhongming², WANG Nani²(1.Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2. Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standard of Bitongxiao cataplasms. **METHODS** With the guide of Chinese Pharmacopoeia, research work for TLC identification and quantitative analysis was carried out. The TLC identification for *Taxillus chinensis* and *Carthamus tinctorius* was improved based on reference methods, quercetin and safflower medicinals were used as indexes and controls, respectively. The content of *Salvia miltiorrhiza* was determined by HPLC with salvianolic acid B as an indicator. **RESULTS** *Taxillus chinensis* could be identified with toluene(water saturation)-ethyl acetate-formic acid(5:4:1) as developing agent. *Carthamus tinctorius* could be identified by TLC method with ethyl acetate-formic acid-water-methanol(7:2:3:0.4) as developing agent. The separation of salvianolic acid B had effective separation on the HPLC condition as follows: the Diamonsil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase containing methanol and acetonitrile(3:1) as the organic phase(A), 1.7% formic acid aqueous solution as the water phase(B), A:B=30%:70% of elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the temperature of column was 30 ℃, injection volume was 10 μL, and the detection wavelength was 286 nm. Methodological investigation accorded with the requirement of content determination. **CONCLUSION** The established quality standard of Bitongxiao cataplasms is suitable for the quality control.

KEY WORDS: Bitongxiao cataplasms; quality standard; *Taxillus chinensis*; *Carthamus tinctorius*; *Salvia miltiorrhiza*; HPLC

痹痛消巴布膏为笔者多年临床实践的经验方, 目前已申请国家发明专利, 它具有补益肝肾、强筋壮骨、活血化瘀、通络止痛之功效。方中独活、桑寄生补肝肾, 强筋骨, 祛风湿^[1-2], 为君药。细辛、丹参、当归协助君药发挥补气生血, 通经络, 除风湿, 散瘀消肿之功效^[3-4], 为臣药。川芎、红花、乳香、没药皆能止痛, 消肿, 生肌, 以上诸药合为佐药。芥子辛散功窜, 消皮里膜外之痰^[5], 使药直达病所, 故为使药。诸药合理配伍, 标本兼治。巴布膏剂的质量控制指标一般包括含膏量、

黏附性、药物成分含量等^[6-7]。痹痛消巴布膏君药独活中含有二氢欧山芹醇当归酸酯、蛇床子素等主要成分, 桑寄生中含有槲皮苷等黄酮类成分; 丹参中含有丹酚酸 B 等酚酸类成分及丹参酮成分; 红花中含有红花黄色素等有效成分, 可作为痹痛消巴布膏的定性及定量指标。由于巴布膏以水溶性高分子为基质, 为了使药材提取物与基质相容, 药材的提取以极性溶剂为主。前期对含量测定指标进行选择, 发现臣药丹参中的丹酚酸 B 含量较高, 可作为含量测定指标。

基金项目: 浙江省经贸委中药现代化专项(31)

作者简介: 詹强, 男, 硕士, 主任中医师 Tel: (0571)85827931

E-mail: zqtow@163.com

本研究针对痹痛消巴布膏制备工艺及剂型特点,按照中国药典 2015 年版一部规定,开展质量标准研究,确定了桑寄生、红花的薄层鉴别方法,建立了丹参中丹酚酸 B 的 HPLC 含量测定方法^[8],期望为痹痛消巴布膏的质量标准制定和制剂研发提供实验依据。

1 仪器与试药

TLC scanner3 薄层色谱扫描仪(瑞典卡玛); LC-20A vp 高效液相色谱仪、SPD-20A UV 检测器(日本岛津); METELLER 电子分析天平(瑞士梅特勒)。槲皮素对照品(批号: 100081-200406; 纯度>99%)、丹酚酸 B 对照品(批号: 111562-2003, 纯度>99%)、红花对照药材均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为去离子水, 其余均为分析纯。痹痛消巴布膏由浙江省中医药研究院中药中心制备, 批号: 151020, 151025, 151029, 151103。

2 方法与结果

2.1 鉴别研究

2.1.1 桑寄生 取痹痛消巴布膏膏体 25 g, 加甲醇-水(1.2:1)100 mL, 加热回流 1 h。趁热滤过, 滤液浓缩至约 20 mL, 加水 10 mL, 再加稀硫酸约 0.5 mL, 煮沸回流 1 h, 放冷, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 30 mL, 合并乙酸乙酯提取液, 浓缩至 1 mL, 作为供试品溶液。另取槲皮素对照品, 加乙酸乙酯制成每 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 2015 年版通则 0502)试验, 吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μ L, 分别点于同一 0.5%氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上, 以甲苯(水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液, 置紫外光灯(365 nm)下检视, 见图 1A。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。缺味样品无干扰。

2.1.2 红花 取本品膏体约 10 g, 精密称定, 加硅藻土研磨混合, 加 80%丙酮溶液 10 mL, 密塞, 振摇 15 min, 静置, 取上清液, 作为供试品溶液。另取红花对照药材 0.5 g, 加 80%丙酮溶液 5 mL, 密塞, 振摇 15 min, 静置, 取上清液制成对照药材溶液。照薄层色谱法(中国药典 2015 年版通则 0502)试验, 吸取上述 2 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 H 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇(7:2:3:0.4)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。如

图 1B 所示, 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。缺味样品无干扰。

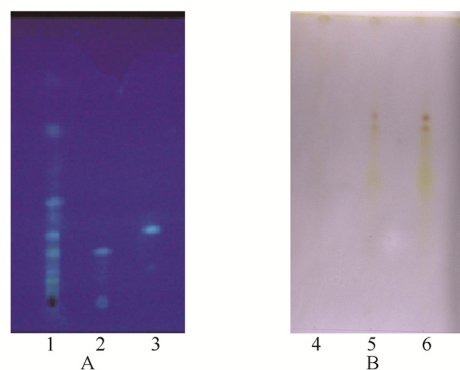


图 1 痹痛消巴布膏中桑寄生和红花的 TLC 鉴别色谱图
A-桑寄生; B-红花; 1-痹痛消巴布膏; 2-缺桑寄生; 3-槲皮素; 4-缺红花; 5-痹痛消巴布膏; 6-红花对照药材。

Fig. 1 TLC identification of *Taxillus chinensis* and *Carthamus tinctorius* in Bitongxiao catapasm

A-*Taxillus chinensis*; B-*Carthamus tinctorius*; 1-Bitongxiao catapasm; 2-sample lack of *Taxillus chinensis*; 3-quercetin; 4-sample lack of *Carthamus tinctorius*; 5-Bitongxiao catapasm; 6-*Carthamus tinctorius* (reference).

2.2 丹酚酸 B 的 HPLC 含量测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为有机相 A: 甲醇-乙腈(3:1); 水相 B: 1.7%甲酸水溶液; A:B=30%:70%, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L, 检测波长 286 nm。

2.2.2 对照品溶液制备 取丹酚酸 B 对照品, 精密称定, 加 75%甲醇制成 1 mL 含丹酚酸 B 0.155 mg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取痹痛消巴布膏膏体约 10 g, 精密称定, 加 2 倍硅藻土研磨, 使膏体分散均匀, 精密加入 75%甲醇 50 mL, 超声提取 1 h, 称重, 用 75%甲醇补充损失质量, 过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2.4 缺味供试品溶液的制备 按照痹痛消巴布膏处方中药材比例, 取除丹参外的其余药材, 制得缺丹参的痹痛消巴布膏, 按照“2.2.3”项下方法制得缺丹参供试品溶液。

2.2.5 方法专属性考察 取对照品溶液, 供试品溶液及缺味供试品溶液, 按照“2.2.1”项条件测定, 色谱图见图 2, 表明在上述色谱条件下, 巴布膏中其他成分对丹酚酸 B 没有干扰, 含量测定方法符合专属性要求。

2.2.6 方法学考察

2.2.6.1 工作曲线及线性范围 取“2.2.2”项下对

照品溶液，稀释成梯度浓度，对丹酚酸 B 的系列对照品溶液进行测定，以峰面积(y)对丹酚酸 B 的质量浓度(x , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行线性回归，得到线性方程 $y=191.2x+0.0227$ ($R^2=0.9999$)，表明丹酚酸 B 在 $0.011 \sim 0.110 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内，与峰面积呈良好线性关系。

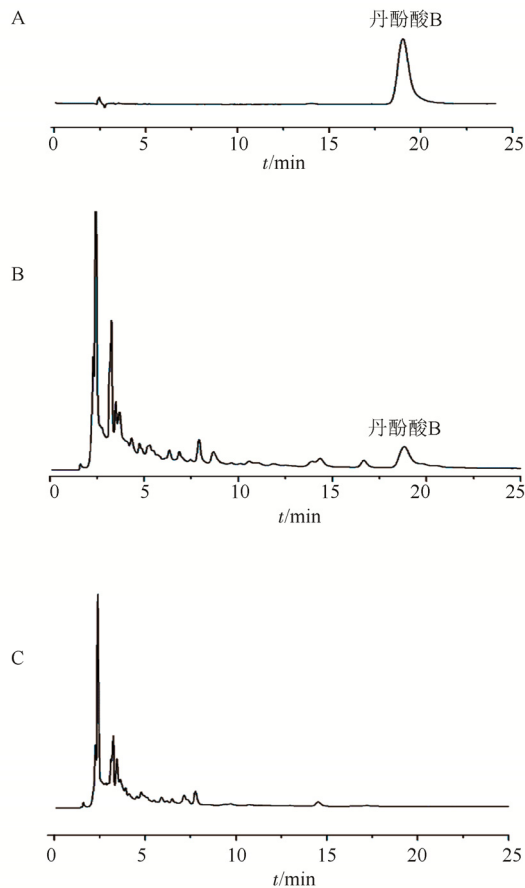


图 2 痹痛消 HPLC 色谱图
A—丹酚酸 B 对照品；B—痹痛消巴布膏；C—缺丹参样品。
Fig. 2 HPLC chromatogram of Bitongxiao cataplasms
A—standard substance; B—sample of Bitongxiao cataplasms; C—sample lack of *Salvia miltiorrhiza*.

2.2.6.2 仪器精密度试验 取“2.2.3”项下同一供试品溶液，按“2.2.1”项色谱条件，连续进样 6 次，记录丹酚酸 B 的峰面积，RSD 为 2.01%。

2.2.6.3 稳定性试验 取“2.2.3”项下同一供试品溶液，在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h，按“2.2.1”项色谱条件进样测定，记录丹酚酸 B 的峰面积，RSD 为 1.45%。

2.2.6.4 重复性试验 取批号为 151020 的痹痛消巴布膏样品 6 份，按照“2.2.3”项供试品溶液制备方法操作，制得供试品溶液，按照“2.2.1”项色谱条件测定，记录丹酚酸 B 的峰面积，计算含量，RSD 为 2.52%。

2.2.6.5 加样回收率试验 取已知含量的痹痛消巴布膏 9 份，每份约 5 g，按高、中、低比例，每组 3 份，分别精确加入丹酚酸 B 对照品，按照“2.2.3”项供试品溶液制备方法，制得供试品溶液，按“2.2.1”项色谱条件进样测定，丹酚酸 B 的平均加样回收率为 101.32%，RSD 为 2.26%。

2.2.7 样品测定 取痹痛消巴布膏，按照“2.2.3”项供试品溶液制备方法操作，另取“2.2.2”项下对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行测定，样品测定结果见表 1。

表 1 痹痛消巴布膏中丹酚酸 B 含量测定结果($n=3$)
Tab. 1 Content determination results of salvianolic acid B in Bitongxiao cataplasms($n=3$)

编号	批号	取样量/g	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	百分含量/%
1	151020	8.4915	0.2800	0.028
2	151025	8.5578	0.2790	0.028
3	151029	8.8472	0.2775	0.028
4	151103	8.6545	0.2806	0.028

3 讨论

痹痛消巴布膏的鉴别研究中，曾经以二氢欧山芹醇当归酸酯、蛇床子素等指标，摸索了独活的鉴别条件；以阿魏酸等为指标，摸索了当归的鉴别条件；以细辛脂素为指标，摸索了细辛的鉴别条件；以欧当归内酯 A 和川芎嗪等为指标，摸索了川芎的鉴别条件；以芥子碱硫氰酸盐为指标，摸索了芥子的鉴别条件，均未获得满意结果。分析原因，首先是痹痛消巴布膏的药材组成较为复杂，其中部分药材在处方中用量较小，指标成分经提取后有所损失，导致含量过低，无法鉴别；其次是巴布膏采用的是水溶性基质，因而前期药材提取以水煎煮提取为主，上述指标成分有较多为脂溶性成分，无法充分提取。最终本研究确定了君药桑寄生和佐药红花的鉴别方法。

桑寄生中含有槲皮苷等黄酮类成分，槲皮素为槲皮苷经水解后的苷元。而独活、红花等药材中均含有黄酮苷成分。为了避免其他黄酮类成分干扰，对提取及水解的条件进行了比较，确定供试品提取溶剂中甲醇-水的比例，并进一步优化了薄层色谱条件，最终确定本研究中的鉴别条件。在该条件下，能够鉴别痹痛消巴布膏中桑寄生里的槲皮素，缺桑寄生样品无干扰。

丹酚酸 B 的含量测定研究较多，项目组曾经开展了复方制剂中丹酚酸 B 的含量测定研究^[9]，

在前期建立方法的基础上,优化了色谱条件。由于巴布膏膏体黏稠,指标成分难以溶出,因此在供试品溶液制备时,加入了 2 倍量硅藻土研磨,使膏体疏松并分散均匀,有助于后续的成分提取。对提取溶剂、提取时间分别进行考察,结果显示 75%甲醇提取效率高,杂质干扰少,超声提取 1 h 内随着提取时间的延长,提取率明显增高,1~1.5 h 提取率基本趋于稳定,1.5 h 后提取率下降。

巴布膏作为新型的外用制剂,具有载药量大、贴敷舒适度高等优点^[10],中药巴布膏的研制具有临床应用价值及开发前景,质量控制研究是其中重要的内容。本实验总结的质量标准研究,能够为痹痛消巴布膏的质量标准制订提供客观依据。

REFERENCES

- [1] ZHOU G, MA B H. The development on the study of Radix Angelicae Pubescentis [J]. China Mod Med(中国当代医药), 2012, 19(16): 15-16.
- [2] SU B W, ZHANG X J, ZHU K X, et al. Optimization of extraction technology of quercitrin from *Taxillus chinensis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(2): 8-10.
- [3] WANG X L, JIN L J, XU F X, et al. Research progress of Chinese herb-asarum [J]. Asia-pac Tradit Med(亚太传统医药), 2013, 9(7): 68-71.
- [4] 李曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [5] 崔国静, 孙欢欢. 芥子的鉴别及炮制应[J]. 首都医药, 2014, 21(11): 44.
- [6] 刘明海. 近年国内巴布剂体外透皮性能研究现状及进展[J]. 中成药, 2011, 33(6): 1033-1036.
- [7] HU Y H, LIU A Q, LI J, et al. Study on the matrix of Chinese medicine patcher [J]. Med Recap(医学综述), 2012, 18(13): 2093-2096.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2015: 76-77.
- [9] SHOU D, YU Z M, LI Y P, et al. Determination of salvianolic acid B in Fuben Zengmai granules by high performance liquid chromatography with direct current amperometric detection [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2012, 27(1): 234-237.
- [10] DU L N, ZHU W N, LIU X Y, et al. Preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of cataplast of white mustard seed varnish to prevent asthma [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(23): 4596-4602.

收稿日期: 2017-10-31
(本文责编: 李艳芳)