

## 骨伤宁软膏的制备与质量控制

毛跟年<sup>1\*</sup>, 杜磊<sup>1</sup>, 王荣<sup>2</sup>, 杨文娟<sup>1</sup>, 牛阳<sup>2</sup>, 吕婧<sup>1</sup>, 张轲易<sup>1</sup>  
(1. 陕西科技大学, 西安 710021; 2. 宁夏医科大学, 银川 750004)

**[摘要]** **目的:**制备骨伤宁软膏并建立其质量控制方法。**方法:**采用乳化法制备骨伤宁软膏。利用 TLC 及沉淀反应对骨伤宁软膏进行定性分析。运用 HPLC 同时测定骨伤宁软膏中三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 的含量, 流动相乙腈(A)-水(B) (0~12 min, 19% A; 12~60 min, 19%~36% A; 60~70 min, 36%~19% A; 70~73 min, 19% A), 检测波长 203 nm。**结果:**骨伤宁软膏性状稳定, HPLC 含量测定中三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 能够完全分离, 线性范围分别为 0.15~3.75, 0.45~11.25, 0.42~10.5 μg, 平均加样回收率分别为 98.81% (RSD 3.65%), 101.18% (RSD 2.26%), 98.90% (RSD 2.92%)。**结论:**建立的定性方法准确可靠, HPLC 结果准确、回收率高、重复性好, 适用于骨伤宁软膏的质量控制。

**[关键词]** 骨伤宁软膏; 乳化法; 质量控制; 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 人参皂苷 R<sub>g1</sub>; 人参皂苷 R<sub>b1</sub>

**[中图分类号]** R283.6; R282.5; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0084-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014240084

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1402.005.html>

**[网络出版时间]** 2014-11-06 14:02

## Preparation and Quality Control of Gushangning Ointments

MAO Gen-nian<sup>1\*</sup>, DU Lei<sup>1</sup>, WANG Rong<sup>2</sup>, YANG Wen-juan<sup>1</sup>, NIU Yang<sup>2</sup>, LV Jing<sup>1</sup>, ZHANG Ke-yi<sup>1</sup>  
(1. Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;  
2. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare Gushangning ointments and establish its quality control method. **Method:** Gushangning ointments was prepared by emulsification method. Qualitative analysis of Gushangning ointments was detected by TLC and precipitation reaction. Contents of notoginsenoside R<sub>1</sub> and ginsenoside R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> in Gushangning ointments by HPLC, mobile phase consisted of acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-12 min, 19% A; 12-60 min, 19%-36% A; 60-70 min, 36%-19% A; 70-73 min, 19% A), detection wavelength was set at 203 nm. **Result:** Gushangning ointments had stable traits, linear ranges of notoginsenoside R<sub>1</sub> and ginsenoside R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> were 0.15-3.75, 0.45-11.25, 0.42-10.5 μg, average recoveries of these three components were 98.81% (RSD 3.65%), 101.18% (RSD 2.26%), 98.90% (RSD 2.92%), respectively. **Conclusion:** This established qualitative analysis is reliable and accurate, HPLC is reliable, simple and precise, which are suitable for quality control of Gushangning ointments.

**[Key words]** Gushangning ointments; emulsification method; quality control; notoginsenoside R<sub>1</sub>; ginsenoside R<sub>g1</sub>; ginsenoside R<sub>b1</sub>

骨伤宁软膏为回医正骨医院临床用于治疗骨折的有效制剂, 由海螵蛸、龙骨(煅)、当归、红花、三七、自然铜等 13 味药材组成, 能改善骨折部位的生

物力学性能, 对骨痂内骨胶原的积累和钙盐沉积有促进作用, 可改善蛋白代谢, 促进蛋白质多糖的合成及钙化, 加速骨痂的形成和骨折愈合时间。该制剂

**[收稿日期]** 20140604(006)

**[基金项目]** 宁夏回族自治区科技攻关项目([2010]088)

**[通讯作者]** \*毛跟年, 教授, 从事天然产物活性成分研究, Tel: 18710487265, E-mail: maogn@sust.edu.cn

不仅保证了骨折愈合、促进骨痂生长,还能防止骨不连发生<sup>[1]</sup>。骨伤宁软膏虽然临床疗效反应良好,但尚未制定质量控制标准。在前期研究基础上,为更好地控制该软膏的质量,本实验采用薄层色谱法和沉淀反应进行定性鉴别,利用 HPLC 对软膏中三七皂苷  $R_1$  和人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$  进行含量测定,为骨伤宁软膏的质量控制提供参考。

## 1 材料

1525 型高效液相色谱仪(1525 型泵,2487 型紫外检测器,Empowers 色谱数据工作站,美国 Waters 公司),DHG-912A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),BS224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂)。

当归、红花、三七等药材均购于西安鸣鹿中药饮片厂,经陕西科技大学生命科学与工程学院杨文娟讲师检定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求;三七皂苷  $R_1$  和人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$  对照品(批号分别为 110745-200707, 110703-200824, 110704-200818,中国食品药品检定研究院),乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 骨伤宁软膏的制备** 在前期研究基础上,确定软膏处方为硬脂酸 5.0 g,单硬脂酸甘油酯 1.8 g,蓖麻油 9.0 g,甘油 5.0 g,三乙醇胺 1.0 g,乙醇 3.14 mL,尼泊金乙酯 0.06 g,水 22.8 mL,水提药物 0.8 g,醇提药物 1.0 g,象皮、儿茶、血竭药粉合计 0.4 g。取尼泊金乙酯 0.06 g 与乙醇 1.14 mL 置于同一容器内,加水 4.0 mL,得尼泊金乙酯醇溶液。将水溶性成分(甘油 5.0 g,水提药物 0.8 g)溶于水(16.97 g)中,加热至 55 °C 与尼泊金乙酯醇溶液混合,得水相;将油性成分(硬脂酸 5.0 g,单硬脂酸甘油酯 1.8 g,蓖麻油 9.0 g,醇提药物 1.0 g)加热至 55 °C,用 4 层纱布滤过,滤渣加入乙醇 2.0 mL 和水 1.38 mL,搅拌使其充分溶解,与滤液混合,作为油相;将油相慢慢加入水相中,不停搅拌,加入三乙醇胺,边加边搅,至成膏为止,待温度降至 40 °C 时加入药粉 0.4 g,搅拌至室温,即得骨伤宁软膏。

### 2.2 鉴别

**2.2.1 阴性样品的制备** 称取处方量海螵蛸、龙骨(煅),加 10 倍量水在常温下浸泡 30 min,加入处方量红花;按水提药材的总量(包括海螵蛸、龙骨、自然铜和红花)加 15 倍量水在 70 °C 下温浸 90 min,抽滤,滤液留用;药渣加 15 倍量水于 70 °C 温浸

90 min,抽滤;合并滤液,浓缩,干燥,得水提干膏,作为缺自然铜的阴性样品。按处方量称取不含某味药材的其他醇提药材(共 6 味),加 8 倍量 60% 乙醇加热回流 120 min,抽滤,滤液留用,药渣加 8 倍量 60% 乙醇加热回流 120 min,抽滤;合并 2 次滤液,浓缩,干燥,得醇提干膏,作为该药材的阴性样品。

**2.2.2 自然铜沉淀反应** 取本品软膏 3 g,加 80% 丙酮 60 mL,超声处理 10 min,弃去上清液。加稀盐酸 20 mL,振摇,滤过,滤液作为供试品溶液;另取自然铜阴性样品 0.8 g,同法制得阴性样品溶液。量取上述 2 种溶液,分别滴加亚铁氰化钾试液,结果表明供试品溶液有蓝绿色沉淀生成,阴性样品溶液则无沉淀生成。

**2.2.3 三七 TLC 鉴别**<sup>[2]</sup> 取本品软膏 8 g,加水饱和的正丁醇 30 mL,密塞,超声处理 1 h,过滤,取滤液,加入 2 倍量正丁醇饱和的水,摇匀,放置使分层,取正丁醇层,蒸干,残渣加甲醇 3 mL 使溶解,作为供试品溶液;另取缺三七的阴性样品 1 g,加入水饱和的正丁醇 5 mL,同法制备阴性样品溶液;称取三七皂苷  $R_1$  和人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$  对照品,加甲醇制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的混合对照品溶液。照 TLC 试验,精密吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)于 <10 °C 放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,于 105 °C 加热至斑点显色清晰。结果显示供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同的紫红色斑点,阴性样品则无此斑点。

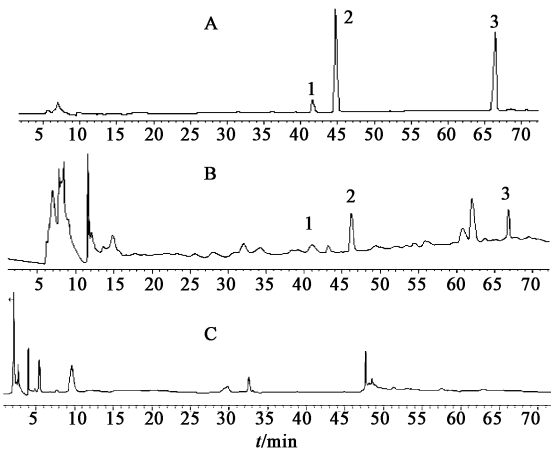
**2.2.4 红花 TLC 鉴别**<sup>[3]</sup> 取本品软膏 4 g,加 80% 丙酮溶液 40 mL,密塞,超声处理 10 min,过滤,滤液作为供试品溶液;另取红花对照药材及阴性样品各 1 g,加 80% 丙酮溶液 10 mL,同法制成对照药材溶液及阴性样品溶液。精密吸取上述 3 种溶液各 10  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇(7:2:3:1.5)为展开剂,展开,取出,晾干。结果显示供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,阴性样品则无此斑点。

**2.2.5 当归 TLC 鉴别**<sup>[4]</sup> 取本品软膏 6 g,加正己烷 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取当归对照药材及阴性样品各 1 g,加正己烷 20 mL,同法制成对照药材溶液及阴性样品溶液。精密吸取上述 3 种

溶液各 2  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果发现供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点, 阴性样品则无此斑点。

### 2.3 有效成分的含量测定<sup>[5-6]</sup>

**2.3.1 色谱条件** 迪马-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈(A)-水(B)(0 ~ 12 min, 19% A; 12 ~ 60 min, 19% ~ 36% A; 60 ~ 70 min, 36% ~ 19% A; 70 ~ 73 min, 19% A), 柱温室温, 检测波长 203 nm, 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品;

1. 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 2. 人参皂苷 R<sub>g1</sub>; 3. 人参皂苷 R<sub>b1</sub>

图 1 骨伤宁软膏 HPLC

**2.3.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取三七皂苷 R<sub>1</sub> 和人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.15, 0.45, 0.42 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 精密称取本品 10.0 g, 加石油醚 100 mL, 超声处理 2 次, 每次 1 h, 过滤; 残渣挥干溶剂, 加甲醇 200 mL, 超声处理, 合并 2 次滤液, 浓缩至干, 加水 100 mL 微热使溶解, 用水饱和的正丁醇液振摇提取 4 次, 每次 100 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液、水饱和的正丁醇液各洗涤 1 次, 每次 100 mL, 弃去洗涤液, 残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.3.4 阴性样品溶液的制备** 取不含三七的醇提膏 0.71 g, 加甲醇 50 mL, 密塞, 超声提取 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.3.5 线性关系考察** 精密量取 2.3.2 项下混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{L}$ , 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 以峰面积积分值为纵坐标, 进样量为横坐标, 得三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 回归方程分别为  $Y = 251\ 632X - 8\ 142.2$  ( $R^2 = 0.999\ 9$ ),  $Y = 358\ 929X + 9\ 219$  ( $R^2 = 0.999\ 9$ ),  $Y = 244\ 259X + 7\ 932.9$  ( $R^2 = 0.999\ 7$ ), 线性范围分别为 0.15 ~ 3.75, 0.45 ~ 11.25, 0.42 ~ 10.5  $\mu\text{g}$ 。

**2.3.6 精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液适量, 按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 5 次, 计算三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 峰面积积分值的 RSD 分别为 0.1%, 1.1%, 1.5%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.7 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 分别于 0, 75, 150, 225, 300, 375, 450 min 进样, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 峰面积积分值的 RSD 分别为 1.3%, 1.6%, 1.2%, 表明供试品溶液在 450 min 内稳定性良好。

**2.3.8 重复性试验** 取同批样品 5 份, 按 2.3.3 项下方法平行制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 峰面积积分值的 RSD 分别为 1.5%, 1.5%, 1.3%, 表明本法重复性良好。

**2.3.9 加样回收率试验** 精密称取已知含量的样品适量, 共 18 份, 分别精密加入三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g1</sub>, R<sub>b1</sub> 对照品适量, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果见表 1。

**2.3.10 样品测定** 取 10 批样品, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果见表 2。

## 3 讨论

骨伤宁软膏为回药治疗骨伤的传统方, 在回族用于临床已有 30 多年, 具有显著的活血化瘀、消肿镇痛、行血散结、生皮长肉之功效, 用于治疗跌打损伤、扭挫伤、风湿疼痛、颈肩腰腿痛等。本文对制备的骨伤宁软膏进行质量控制方法研究, 根据药材主要成分确定其中的自然铜采用理化方法鉴别(沉淀反应), 三七、红花、当归等采用 TLC 鉴别, 确定的鉴别方法简便、快速且阴性对照无干扰, 可作为方中药味的专属鉴别。

根据国家药品监督管理局《新药审批办法》, 规定检测方法应以方中君药、臣药、贵重药及剧毒药为

表1 骨伤宁软膏中有效成分含量测定的加样回收率试验

组分	称样量 /g	加入量 /μg	样品 中量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
三七皂苷 R <sub>1</sub>	0.998	0.39	0.84	1.20	96.43	98.81	3.6
	0.998	0.39	0.84	1.19	95.24		
	1.003	0.76	0.84	1.64	104.76		
	1.003	0.76	0.84	1.61	101.19		
	1.002	1.50	0.84	2.33	98.81		
	1.002	1.50	0.84	2.31	96.43		
人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	1.000	0.90	1.13	2.08	104.42	101.18	2.3
	1.000	0.90	1.13	2.05	101.77		
	1.002	2.23	1.13	3.39	102.65		
	1.002	2.23	1.13	3.34	98.23		
	1.002	4.56	1.13	5.70	100.88		
	1.002	4.56	1.13	5.68	99.12		
人参皂苷 R <sub>b<sub>1</sub></sub>	1.000	0.89	1.06	1.98	102.83	98.90	2.9
	1.000	0.89	1.06	1.93	98.11		
	1.002	2.05	1.06	3.09	98.11		
	1.002	2.05	1.06	3.06	95.28		
	1.001	4.27	1.06	5.30	97.17		
	1.001	4.27	1.06	5.35	101.89		

表2 骨伤宁软膏中有效成分的含量测定 mg·g<sup>-1</sup>

批号	三七皂苷 R <sub>1</sub>	人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	人参皂苷 R <sub>b<sub>1</sub></sub>	总量	平均值
131204	0.162	0.229	0.218	0.610	0.570
131202	0.158	0.215	0.205	0.578	
131206	0.194	0.221	0.187	0.601	
131210	0.178	0.219	0.157	0.554	
131208	0.198	0.198	0.174	0.570	
131211	0.172	0.210	0.153	0.536	
131214	0.155	0.189	0.205	0.550	
131205	0.187	0.203	0.194	0.585	
131212	0.180	0.204	0.161	0.545	
131213	0.165	0.201	0.206	0.571	

主。三七为方中君药,主要活性成分为三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, R<sub>b<sub>1</sub></sub>,故本品采用 HPLC 测定骨伤宁软膏中此 3 种成分的含量,并以此作为质量控制指标,这也与 2010 年版《中国药典》的规定相符。在含量测定方法考察时发现,与人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 保留时间相邻有一小峰,根据资料推断其为人参皂苷 Re<sup>[7]</sup>,但经过多次预试验发现该峰的稳定性较差且峰面积较小,故未列为该软膏的质量控制成分,而是以稳定性及含量均较高的三七皂苷 R<sub>1</sub> 及人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的总含量为质量评价指标。经方法学考察,结果表明本法简便、准确、重复性好,可有效控制本品的质量。

## [参考文献]

- [1] 马英锋,张金军,牛阳,等. 回药张氏正骨膏治疗骨不连 60 例疗效观察[J]. 宁夏医科大学学报,2009,31(1):125.
- [2] 于建,陆继伟,王柯,等. 复方丹参片和复方丹参颗粒中三七薄层色谱鉴别的研究[J]. 中国药品标准,2012,13(4):249.
- [3] 马玉花,李生花. 藏药八味石榴散中四味药材的薄层色谱鉴别[J]. 时珍国医国药,2009,20(10):2529.
- [4] 谢仲德,方应权,李文烈,等. 当归调经胶囊的薄层鉴别与阿魏酸、芍药苷的测定[J]. 中成药,2013,35(2):427.
- [5] 胡琴,孙娥,徐凤娟,等. HPLC 双波长法同时测定 ZJHX 橡胶膏中三七皂苷 R<sub>1</sub>, 人参皂苷 Re, R<sub>g<sub>1</sub></sub>, R<sub>b<sub>1</sub></sub> 和血竭素的含量[J]. 中国中药杂志,2013,38(17):2793.
- [6] 沙东旭,张满来. HPLC-ELSD 测定三七药材及其制剂中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 及 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的含量[J]. 中国中药杂志,2005,30(2):112.
- [7] 何选林,王群英. 三七胶囊含量测定方法的改进[J]. 中成药,2011,33(3):461.

[责任编辑 刘德文]