

膝骨消痛膏的质量标准研究

冯伟红, 李曼玲*, 康 琛

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 采用薄层色谱法对膝骨消痛膏中的主要药味三七、血竭、大黄、胡椒进行鉴别, 并对膝骨消痛膏中的胡椒碱进行含量测定。方法: 薄层色谱法; 高效液相色谱法, 十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, 甲醇-水(70:30)为流动相, 检测波长为 343 nm。结果: 薄层色谱斑点清晰, 重现性好, 阴性对照无干扰; 胡椒碱的含量线性范围为 0.08~0.4 μg, $r = 0.999\ 988$, 回收率为 98.70%, RSD 为 0.55%。结论: 该方法比较专属、灵敏、可靠。

[关键词] 膝骨消痛膏; 薄层色谱法; 胡椒碱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)07-0004-03

膝骨消痛膏由牛膝、骨碎补、三七、血竭、大黄、胡椒、续断等多味中药组成。主要功能为活血散瘀, 消肿止痛。临床主要用于跌打肿痛, 腰膝痹痛及风湿关节炎。该处方中胡椒为胡椒科植物胡椒 *Piper nigrum* L. 的干燥近成熟果实, 其有效成分之一为胡椒碱。本实验采用高效液相色谱法测定膝骨消痛膏中胡椒碱的含量作为该制剂的质量检测指标, 现报道如下。

1 仪器与试剂

美国 HP1100 高效液相色谱仪, G1310A 单元泵, 7725 手动进样器, G1314A 紫外检测器及 HPCHEM 色谱工作站。化学试剂: 甲醇为 GR, 其它试剂均为 AR, 水为自制高纯水。胡椒碱对照品: 化学对照品(0775—9702), 人参皂苷 Rg1 对照品(0703—9914), 购于中国药品生物制品检定所, 供含量测定用。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 三七 取本品 4 片, 除去盖衬, 剪成小块, 置具塞锥形瓶中, 加氯仿 50 mL 浸泡 10 min, 倾出氯仿液, 加入乙醇 50 mL, 静置 30 min, 滤过, 蒸干。残渣转溶于 10 mL 水中, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取人参皂苷 Rg1 对照品, 加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法^[1] 试验。吸取上述供试品溶液 20 μL 和对照品溶液 3 μL, 分别点于同一以 CMC-Na 为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。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斑点; 置紫外光灯(365 nm)下检视, 显相同的荧光斑点, 见图 1。

2.1.2 血竭 取本品 4 片, 除去盖衬, 剪成小块, 置具塞锥形瓶中, 加乙醚 60 mL, 超声处理 10 min, 倾出乙醚液, 滤过, 加入乙醇 40 mL, 静置 30 min, 滤过, 滤液回收至干。残渣加乙醚 10 mL 超声使溶解, 滤过,

[收稿日期] 2006-09-25

[通讯作者] * 李曼玲, Tel: (010) 64014411-2939; E-mail:

limanling@sohu.com

滤液作为供试品溶液。另取血竭对照药材 0.1 g, 加乙醚 10 mL, 超声处理 10 min, 滤过, 滤液作为对照药材溶液。照薄层色谱法^[1] 试验。吸取上述供试品溶液 12 μ L 和对照品溶液 9 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇(19: 1) 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, 见图 2。

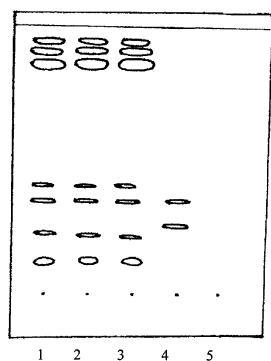


图1 膝骨消痛膏中三七的 TLC 图谱

1~ 3.3 批样品
4. 人参皂苷 Rg1 对照品
5. 阴性

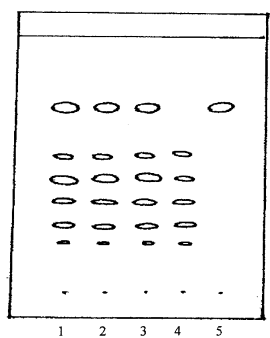


图2 膝骨消痛膏中血竭的 TLC 图谱

1~ 3.3 批样品
4. 血竭对照药材 5. 阴性

2.1.3 大黄 取本品 6 片, 除去盖衬, 剪成小块, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 60 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 加水 10 mL, 使溶解, 再加盐酸 1 mL, 置水浴中加热 30 min, 立即冷却, 加 40% NaOH 4 mL, 混匀, 用石油醚(60~ 90) $^{\circ}$ C 20 mL 提取一次, 弃去石油醚液, 水液加盐酸 2 mL 混匀, 用乙醚分 2 次提取, 每次 10 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取大黄对照药材 0.5 g, 加甲醇 20 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 加水 10 mL 使溶解, 再加盐酸 1 mL, 置水浴中加热 30 min, 立即冷却, 用乙醚分 2 次提取, 每次 10 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加醋酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法^[1] 试验。吸取供试品溶液 20 μ L 和对照药材溶液 3 μ L, 分别点于同一以 CMC-Na 为粘合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~ 90) $^{\circ}$ C-甲酸乙酯(4: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置氨蒸气中熏后, 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, 显相同的橙红色斑点, 见图 3。

2.1.4 胡椒 取本品 6 片, 除去盖衬, 剪成小块, 置具塞锥形瓶中, 加无水乙醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 用石油醚(60~ 90) $^{\circ}$ C 10 mL 洗涤残

渣一次, 弃去石油醚, 残渣加无水乙醇 1 mL, 使溶解, 作为供试品溶液。取胡椒药材粉末 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加无水乙醇 5 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液作为对照药材溶液。另取胡椒碱对照品, 置棕色量瓶中, 加无水乙醇制成每 1 mL 含 4 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法^[1] 试验。吸取供试品溶液 10 μ L、对照药材溶液 2 μ L 和对照品溶液 2 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以苯-醋酸乙酯-丙酮(7: 2: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 见图 4。

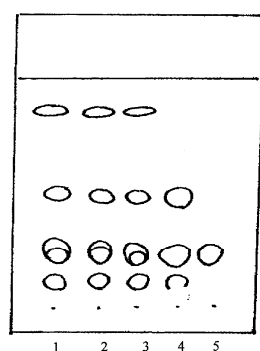


图3 膝骨消痛膏中大黄的 TLC 图谱

1~ 3.3 批样品
4. 大黄对照药材 5. 阴性

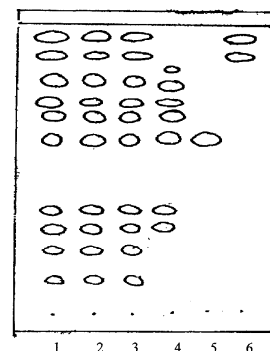


图4 膝骨消痛膏中胡椒的 TLC 图谱

1~ 3.3 批样品
4. 胡椒对照品药材 5. 胡椒碱对照品 6. 阴性

2.2 含量测定

2.2.1 检测波长的确定 称取胡椒碱对照品适量, 置棕色量瓶中, 用无水乙醇配制成 0.04 mg/mL 的溶液, 在(190~ 800) nm 波长处扫描, 结果胡椒碱在 343 nm 波长处有最大吸收, 故检测波长定为 343 nm。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶(Luna C₁₈ 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水(70: 30) 为流动相, 流速: 1.0 mL/min, 室温, 检测波长为 343 nm。理论塔板数按胡椒碱峰计算, 应不低于 3 000, 分离度大于 2.0。见图 5~ 7。

2.2.3 供试品溶液的制备 取膝骨消痛膏 1 张, 揭去盖衬, 称定重量后, 剪成小片, 置 50 mL 锥形瓶中。精密加入 25 mL 无水乙醇, 称定重量, 避光加热回流 1 h, 取出, 放冷, 再称定重量, 用无水乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μ m) 滤过, 置棕色样品瓶中, 滤液作为供试品溶液, 即得。

2.2.4 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的胡椒碱对照品约 2 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加无

水乙醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含胡椒碱 0.04 mg)。

2.2.5 空白试验 取自制不含胡椒的空白制剂样品, 按照供试品溶液制备方法制备, 依法测定, 结果在对照品胡椒碱出峰的位置无其他干扰峰出现, 证明其它药材对胡椒碱峰无干扰。见图 8。

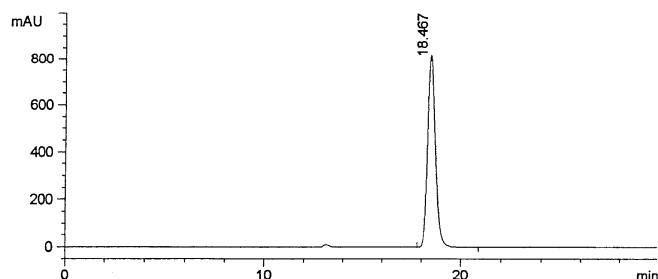


图 5 对照品胡椒碱的色谱图

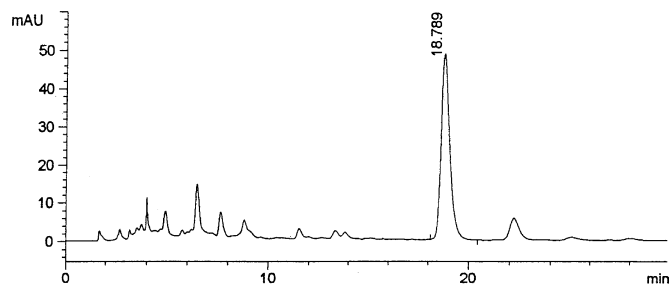


图 6 膝骨止痛膏的色谱图

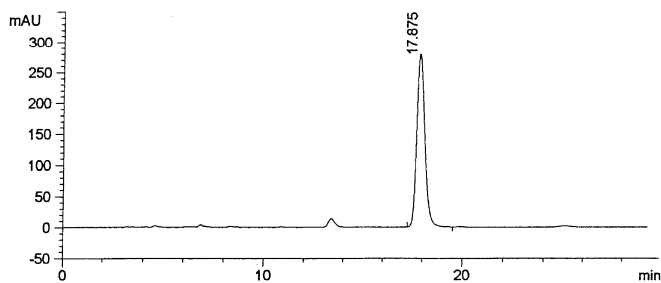


图 7 胡椒对照药材的色谱图

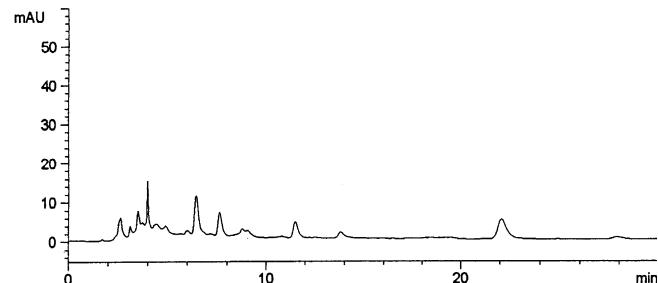


图 8 膝骨止痛膏中胡椒空白的色谱图

2.2.6 线性关系的考察 分别精密吸取对照品溶液(0.04 mg/mL) 2, 4, 6, 8, 10 μ L 进样, 依上述色谱条件测定胡椒碱峰面积, 结果见表 1。以峰面积积分为纵坐标, 胡椒碱含量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $Y = 12.7056 + 1.02 \times 10^4 X$, $r =$

0.99999, 表明胡椒碱在 0.08~0.4 μ g 范围内呈线性关系。

2.2.7 精密度试验 精密吸取供试品溶液, 重复进样 5 次, $RSD = 1.29\%$ 。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批号的供试品 5 份, 依前法制备, 测定结果 $RSD = 1.91\%$ 。

2.2.9 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于配制后 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 依法测定, 结果在 24 h 内 $RSD = 1.046\%$ 。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取 5 份除去盖衬且已知胡椒碱含量的膝骨止痛膏(7 \times 9) cm, 称定重量后置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入等量对照品溶液, 按 2.2.3 方法制备, 依法测定。结果见表 1。

表 1 回收率测定

取样量 (mg)	制剂中含 量 (mg)	加入量 (mg)	测得总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
2.2001	0.603	0.400	0.996	98.25		
2.2002	0.603	0.400	0.999	99.00		
2.2002	0.598	0.400	0.992	98.50	98.70	0.55
2.2000	0.598	0.400	0.911	98.25		
2.2005	0.612	0.400	1.010	99.50		

2.2.11 供试品测定 膝骨止痛膏依法制备, 测定, 结果 3 批膝骨止痛膏中胡椒碱含量为 0.482, 0.558, 0.564(mg/张, $n = 2$)。

3 讨论

在对胡椒碱测定色谱条件的流动相进行选择时, 曾对甲醇-水(67:73)、甲醇-水(75:25)作了比较研究, 结果表明选用甲醇-水(70:30)作为流动相胡椒碱与其他组分均能达到基线分离。

对提取溶媒、溶媒加入量做了比较试验, 结果表明选用无水乙醇, 加入 25 mL 为最佳条件。

对不同提取方法(冷浸、加热回流、超声提取)及提取时间进行了选择, 结果加热回流 1 h 测得的胡椒碱含量最高。

文献中胡椒碱的含量测定多采用内标法计算含量, 本试验采用高效液相色谱法对胡椒药材及膝骨止痛膏中的胡椒建立了采用十八烷基硅烷键合硅胶(ODS)色谱柱, 外标法计算, 测定药材及成品中的胡椒碱含量的方法, 比较专属、灵敏、可靠、稳定。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 31.
[2] 赵陆华. 高效液相色谱法分析中药成分手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 376.