

接骨灵贴膏质量标准的研究

袁 杰¹, 刘道芳²

(1. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051; 2. 安徽安科余良卿药业有限公司, 安徽 合肥 230088)

摘要: 目的 建立接骨灵贴膏(当归、骨碎补、续断等)的质量标准。方法 TLC法对接骨灵贴膏中的当归进行定性鉴别; GC法对其中冰片、樟脑、桉油精和水杨酸甲酯的含有量进行测定。结果 薄层色谱斑点清晰分离度良好, 无阴性干扰。冰片、樟脑、桉油精和水杨酸甲酯的回收率($n=6$)分别为96.7% (RSD=3.1%)、96.8% (RSD=1.3%)、96.4% (RSD=1.6%)和98.4% (RSD=1.4%)。结论 TLC法和GC法能有效监控接骨灵贴膏的质量。

关键词: 接骨灵贴膏; 当归; 冰片; 樟脑; 桉油精; 水杨酸甲酯; TLC; GC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)03-0575-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.03.020

Quality standard for Jieguling Emplastrum

YUAN Jie¹, LIU Dao-fang²

(1. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 2. Anhui Anke Yuliangqing Pharmaceutiel Co., Ltd., Hefei 230088, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a quality standard for Jieguling Emplastrum (*Angelicae Sinensis Radix*, *Drynariae Rhizoma*, *Dipsaci Radix*, etc.). **METHODS** *A. Sinensis* in Jieguling Emplastrum was identified by TLC. The contents of borneol, camphor, cineol and methyl salicylate in this preparation were determined by GC. **RESULTS** The clear TLC spots showed good resolution without interference from negative samples. The average recoveries ($n=6$) of borneol, camphor, cineol and methyl salicylate were 96.7% (RSD=3.1%), 96.8% (RSD=1.3%), 96.4% (RSD=1.6%) and 98.4% (RSD=1.4%), respectively. **CONCLUSION** TLC and GC can be applied to monitoring the quality of Jieguling Emplastrum.

KEY WORDS: Jieguling Emplastrum; *Angelicae Sinensis Radix*; borneol; camphor; cineol; methyl salicylate; TLC; GC

接骨灵贴膏最初收载于卫生部药品标准中药成方制剂第十三册^[1]中,由骨碎补、续断、土鳖虫、羌活、天南星、乳香、没药、当归、桃仁、五加皮、蒲公英、红花、冰片、樟脑、水杨酸甲酯、桉油(主要成分为桉油精)16味药材组成,经煎煮、渗漉、涂膏、盖衬等工艺,切成小块而得,可活血化瘀,舒筋通络,消肿止痛,主要用于各种闭合性新骨折、跌打损伤、扭挫伤等软组织损伤。前期曾有关于接骨灵贴膏质量标准的文献报道,对其中羌活、蒲公英、樟脑等成分进行了定性鉴别试验,并

对骨碎补中的柚皮苷进行了含有量测定^[2],但部颁标准中只有“鉴别”和“含膏量”等简单的项目。考虑到贴膏剂制备过程中的特点,为了保证临床疗效,本实验制定了当归的薄层色谱(TLC)鉴别方法,并采用气相色谱(GC)法对其中易挥发的冰片、樟脑、桉油精、水杨酸甲酯进行含有量测定,以建立较全面的质量标准。

1 仪器、试剂与试药

岛津 GC-2014C 气相色谱仪,包括氢火焰离子检测器、GC Solution 色谱工作站(日本岛津公

收稿日期: 2015-06-23

作者简介: 袁 杰(1974—),男,硕士生导师,研究方向为中药材及中成药质量分析。Tel: 13865959337, E-mail: dsyuanjie@126.com

司)。毛细管色谱柱以聚乙二醇 20000 (PEG-20M) 为固定相 (柱长 30 m, 内径 0.53 mm, 膜厚度 0.5 μm)。硅胶 G 薄层板 (青岛海洋化工有限公司、烟台大学生物科学与工程研究所、德国 Merck 公司); 薄层成像文件系统 (瑞士 CAMAG 公司)。

内标环己酮 (批号 111674-200401)、冰片 (批号 110743-200504, 供含有量测定用)、樟脑 (批号 110747-201008, 纯度 99.0%)、桉油精 (批号 110788-201004, 纯度 99.6%) 和水杨酸甲酯 (批号 110707-201011, 纯度 99.9%) 对照品 (中国食品药品检定研究院)。所用试剂均为分析纯。接骨灵贴膏 (批号 20140901、20140902、20140903, 安徽安科余良卿药业有限公司)。

2 TLC 法鉴别接骨灵贴膏中的当归

2.1 供试品溶液制备 取本品 5 片, 加三氯甲烷 40 mL, 不时振摇以使贴膏脱膏, 倾取膏液, 加甲醇 30 mL, 边加边搅拌, 离心 5 min, 取上清液, 低温蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 溶解, 离心 (10 000 r/min) 2 min, 取上清液, 即得。

2.2 对照品溶液制备 取当归药材 0.5 g, 加乙醇 10 mL, 超声 10 min, 滤过, 滤液即为对照品溶液。

2.3 阴性对照溶液制备 取原药材适量, 按处方制得缺当归的阴性样品, 按“2.1”项下方法制得阴性对照溶液。

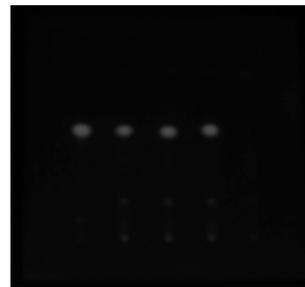
2.4 TLC 鉴别 吸取供试品、对照品、阴性对照溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (60~90 $^{\circ}\text{C}$) - 乙酸乙酯 (4:1) 为展开剂展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。结果, 供试品色谱在与对照品相应的位置上, 呈相同颜色的荧光斑点, 而阴性对照品在相应的位置无斑点。由此可知, 该方法阴性对照无干扰, 可以用于鉴别当归, 见图 1。

3 冰片、樟脑、桉油精、水杨酸甲酯含有量测定

3.1 色谱条件 聚乙二醇 20000 (PEG-20M) 毛细管柱 (柱长 30 m, 内径 0.53 mm, 膜厚度 0.5 μm)。进样口温度 230 $^{\circ}\text{C}$; 检测器温度 240 $^{\circ}\text{C}$; 氮气体积流量 2 mL/min, 氢气 40 mL/min, 氧气 400 mL/min; 程序升温 (初始 90 $^{\circ}\text{C}$, 保持 4 min, 以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升至 170 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min。理论塔板数按樟脑峰计算, 应不低于 10 000。

3.2 溶液制备方法

3.2.1 对照品溶液制备 精密称取环己酮适量,



1 2 3 4 5

1. 当归 2. 样品 (20140901) 3. 样品 (20140902) 4. 样品 (20140903) 5. 阴性对照品 (缺当归)

1. *Angelicae Sinensis Radix* 2. sample (20140901) 3. sample (20140902) 4. sample (20140903) 5. negative reference substance without *Angelicae Sinensis Radix*

图 1 接骨灵贴膏中当归的薄层色谱图

Fig. 1 TLC chromatograms of *Angelicae Sinensis Radix* in Jieguling Emplastrum

加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 25 mg 样品的溶液, 作为内标溶液。另取樟脑 25 mg、冰片 5 mg、桉油精 6 mg 和水杨酸甲酯 12.5 mg, 置同一 25 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 加乙酸乙酯溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3.2.2 供试品溶液制备 取本品 5 片, 剪成小块, 除去盖衬, 置 1 000 mL 烧瓶中, 连接挥发油测定器, 自测定器上端加水 400 mL, 使水充满刻度部分, 再加乙酸乙酯 4 mL, 加热回流 2 h, 放冷, 分取刻度中的乙酸乙酯, 挥发油测定器用适量乙酸乙酯洗涤, 合并乙酸乙酯液。通过铺有 2 g 无水硫酸钠的漏斗, 转移至 25 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 再加乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3.2.3 阴性对照溶液制备 按处方量制成缺樟脑、冰片、桉油精、水杨酸甲酯的阴性对照品, 按“2.1”项下方法操作, 即得。

3.3 含量测定的专属性试验 分别精密吸取“3.2”项下对照品、供试品和阴性对照溶液各 1 μL , 注入气相色谱仪中, 记录色谱图, 见图 2。由图可知, 在供试品色谱中, 呈现与对照品保留时间相同的色谱峰, 而阴性对照溶液色谱中未呈现, 并且无干扰物质。

3.4 线性关系考察 精密称取环己酮适量, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 10 mg 样品的溶液, 作为内标溶液。精密称取樟脑 62.01 mg、冰片 46.51 mg、桉油精 21.89 mg 和水杨酸甲酯对照品 33.38 mg, 置于同一 25 mL 量瓶中, 加乙酸乙酯溶解, 制成混合对照品溶液。分别精密吸取 0.5、1、2、3、5、

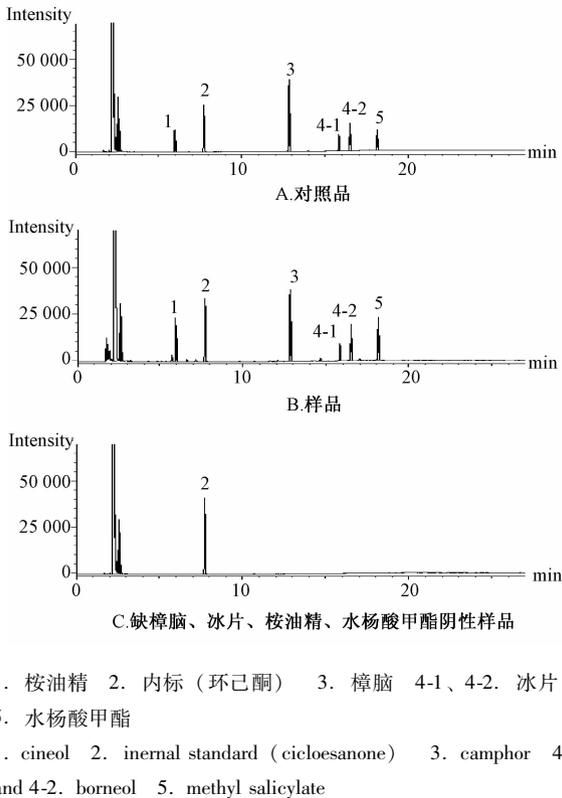


图2 GC 色谱图

Fig. 2 GC chromatograms

8 mL 混合对照品溶液，置于 10 mL 量瓶中，精密加入内标溶液 1 mL，加乙酸乙酯溶解，并稀释至刻度，摇匀，分别精密吸取 1 μ L，注入气相色谱仪，记录色谱峰。以对照品质量浓度与内标质量浓度的比值为横坐标 (X)，峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得到接骨灵贴膏中 4 种成分的标准曲线方程、相关系数 (r) 和线性范围，结果见表 1，表明四者在一定质量浓度范围内均有良好的线性关系。

表 1 接骨灵贴膏中 4 种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of four constituents in Jieguling Emplastrum

成分	回归方程	r	线性范围/ μ g
樟脑	$Y = 3.005X + 0.7757$	0.9999	0.124 ~ 1.984
冰片	$Y = 3.854X + 0.6097$	0.9999	0.093 ~ 1.488
桉油精	$Y = 3.859X + 0.3119$	0.9998	0.044 ~ 0.701
水杨酸甲酯	$Y = 5.762X + 0.4267$	0.9999	0.067 ~ 1.068

3.5 精密度试验 取“3.4”项下混合对照品溶液，连续进样 5 次，测定峰面积，计算校正因子。结果，樟脑 RSD 为 0.56%、冰片 RSD 为 0.51%、桉油精 RSD 为 0.76%、水杨酸甲酯 RSD 为 0.65%，表明仪器精密度良好。

3.6 重复性试验 精密称取同一样品 (批号 20140901) 6 份，按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液，进行测定。结果，樟脑平均含有量 3.675 mg/片，RSD 为 0.83%；冰片 1.068 mg/片，RSD 为 0.98%；桉油精 0.823 mg/片，RSD 为 1.03%；水杨酸甲酯 1.324 mg/片，RSD 为 0.49%，表明该方法重复性良好。

3.7 稳定性试验 精密称取同一样品 (批号 20140901) 1 份，按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、1、2、4、8、12 h 进样 1 μ L，测定峰面积。结果，樟脑的峰面积 RSD 为 0.34%，冰片为 0.65%、桉油精为 0.97%、水杨酸甲酯为 0.79%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

3.8 加样回收率试验 取含有量已知的样品 (批号 20140901，樟脑 3.675 mg/片，冰片 1.068 mg/片，桉油精 0.823 mg/片，水杨酸甲酯 1.324 mg/片) 6 份，各 2 片，除去盖衬，剪成小块，置于 1 000 mL 烧瓶中，加水 300 mL，加入混合对照品溶液 (含 7.654 mg/mL 樟脑、2.142 mg/mL 冰片、1.763 mg/mL 桉油精、2.578 mg/mL 水杨酸甲酯) 1 mL，按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液，吸取 1 μ L，注入气相色谱仪，计算回收率，结果见表 2。

3.9 含有量测定 取 3 批样品，按上述方法进行分析测定，结果见表 3。

表 3 含有量测定结果

Tab. 3 Results of content determination

批号	樟脑/ (mg·片 ⁻¹)	冰片/ (mg·片 ⁻¹)	桉油精/ (mg·片 ⁻¹)	水杨酸甲酯/ (mg·片 ⁻¹)
20140901	3.675	1.068	0.823	1.324
20140902	3.681	1.061	0.826	1.328
20140903	3.664	1.077	0.821	1.319

4 讨论

樟脑、冰片、桉油精和水杨酸甲酯是在基质融化 (70 $^{\circ}$ C 左右) 时加入，根据样品的测定数据可以发现，樟脑、冰片、桉油精和水杨酸甲酯等成分有一定程度的挥发。另外，批间的差异性较小，说明工艺较稳定，加上临床使用多年，疗效确切，故可以认为处方和工艺较合理^[3]。

同时，对以上 4 种成分进行含有量测定，由于篇幅所限，没有把缺每味药的阴性对照图谱一一列出，而在实验中分别作了缺单味药材的阴性对照，结果证明均无干扰^[4-14]。而且，采用了《中国药典》2010 版一部挥发油测定的方法，应注意各部

表2 加样回收率试验结果
Tab. 2 Results of recovery tests

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
樟脑	7.350	7.654	14.623	95.02	96.8	1.3
	7.350	7.654	14.797	97.30		
	7.350	7.654	14.876	98.33		
	7.350	7.654	14.654	95.43		
	7.350	7.654	14.816	97.54		
	7.350	7.654	14.793	97.24		
冰片	2.136	2.142	4.154	94.21	96.7	3.1
	2.136	2.142	4.251	98.74		
	2.136	2.142	4.196	96.12		
	2.136	2.142	4.316	101.77		
	2.136	2.142	4.176	95.24		
	2.136	2.142	4.151	94.07		
桉油精	1.646	1.763	3.301	93.87	96.4	1.6
	1.646	1.763	3.361	97.28		
	1.646	1.763	3.343	96.26		
	1.646	1.763	3.368	97.67		
	1.646	1.763	3.373	97.96		
	1.646	1.763	3.326	95.29		
水杨酸甲酯	2.648	2.578	5.126	96.12	98.4	1.4
	2.648	2.578	5.208	99.30		
	2.648	2.578	5.216	99.61		
	2.648	2.578	5.187	98.49		
	2.648	2.578	5.210	99.38		
	2.648	2.578	5.154	97.21		

件装配的严密性问题,不能有漏气现象,否则测定结果不准确^[15]。

接骨灵贴膏中的冰片使用的是合成龙脑,为左旋和右旋龙脑的混合物,在气相色谱中出现两个峰,故以两峰的峰面积之和来计算其含量。

该制剂由16味药组成,本实验还对骨碎补、羌活、乳香、没药等进行了薄层色谱研究。结果发现,骨碎补、羌活阴性样品有干扰,而乳香、没药的薄层结果没有找到专属性的斑点,因此无法准确进行鉴别。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂):第13册[S]. 北京:人民卫生出版社,1993:147.
- [2] 赵琰玲,潘星火. 接骨灵巴布膏的质量标准研究[J]. 广东药学院学报,2006,2(5):495-498.
- [3] 朱静,贾晓斌,郑智音,等. 挥发性成分在橡胶膏剂处方中的作用及如何提高其稳定性[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1360-1364.
- [4] 田红红,乙引,柳立伟,等. 气相色谱法同时测定重楼解毒酊中5个成分[J]. 中成药,2014,36(10):2091-2094.
- [5] 杨琼,柳立伟,乙引,等. GC法同时测定金喉健喷雾剂中4个有效成分[J]. 中成药,2014,36(8):1666-1669.
- [6] 张一鸣,王洁,胡明勋,等. 毛细管气相色谱法测定红药贴膏中4种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):47-50.
- [7] 单婷婷,曹红,邢俊波,等. GC法测定伤湿止痛膏中樟脑、冰片、薄荷脑、水杨酸甲酯的含量[J]. 解放军药学报,2014,30(6):525-526.
- [8] 浦益琼,张彤,项乐源. 毛细管气相色谱法测定伤湿止痛膏中樟脑、冰片、薄荷脑和水杨酸甲酯的含量[J]. 中成药,2009,31(8):1224-1226.
- [9] 李彦超,李宜鲜,姚令文,等. GC法同时测定通络去痛膏中樟脑、薄荷脑和冰片的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(4):672-675.
- [10] 万丽,周立,胡娟,等. 气相色谱法测定麝香舒活精中樟脑、薄荷脑、冰片含量[J]. 成都中医药大学学报,2007,30(4):50-52.
- [11] 罗双辉,徐志伟,冯婉姗. 骨友灵贴膏质量标准研究[J]. 今日药学,2009,19(7):8-10.
- [12] 黄杰伟,冯婉姗,罗双辉. 气相色谱法测定骨友灵贴膏中冰片的含量[J]. 今日药学,2008,18(1):56-57.
- [13] 蔡铝铝,潘星火,金芝兰. GC测定镇江巴布膏中冰片、薄荷脑、樟脑和水杨酸甲酯的含量[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(1):54-57.
- [14] 刘翔,孙飞. 气相法测定麝香壮骨膏中樟脑、冰片、水杨酸甲酯含量[J]. 中成药,2009,31(2):231-234.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录63.