

乌黄骨外散的质量标准提高研究^Δ

孙毅东^{1*}, 张美容², 詹亚坤¹, 张慧¹, 曾祥仲¹, 陈宝婷¹, 张素方¹, 林爱华¹ (1. 广东省中医院珠海医院药剂科, 广东 珠海 519015; 2. 中山大学附属第五医院药学部, 广东 珠海 519000)

中图分类号 R927.11; R932

文献标志码 A

文章编号 1672-2124(2021)11-1313-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.11.007

摘要 目的:提高乌黄骨外散的质量标准。方法:在现有质量标准的基础上,建立白芷、大黄的薄层色谱鉴定方法;建立乌头碱、次乌头碱含量测定的高效液相色谱法,色谱柱选用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Merck Purospher STAR RP-18 endcapped, 250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温为30℃,流速为0.8 ml/min。结果:大黄、白芷的薄层色谱斑点显色清晰,分离度好,阴性对照无干扰;乌头碱在1.00~6.00 μg/ml($r=0.999\ 8$)范围内线性良好,次乌头碱在15~90 μg/ml($r=0.999\ 9$)范围内线性良好,回收率分别为98.83%、99.87%,RSD分别为2.06%、2.63%。结论:该方法操作简便、准确可靠、重复性好,可用于乌黄骨外散的质量控制。

关键词 乌黄骨外散;乌头碱;次乌头碱;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法

Quality Standard Improvement for Wuhuang Guwai Powder^Δ

SUN Yidong¹, ZHANG Meirong², ZHAN Yakun¹, ZHANG Hui¹, ZENG Xiangzhong¹, CHEN Baoting¹, ZHANG Sufang¹, LIN Aihua¹ (1. Dept. of Pharmacy, Zhuhai Hospital of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Zhuhai 519015, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangdong Zhuhai 519000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To improve the quality standard of Wuhuang Guwai powder. **METHODS:** Based on the previous quality standard, TLC identification method was established for *radix angelicae dahuricae* and *radix et rhizoma rhei*. HPLC method was established for content determination of aconitine and hypaconitine. The column was octadecylsilane chemically bonded silica gel column(Merck Purospher STAR RP-18 endcapped, 250 mm×4.6 mm, 5 μm) at the flow rate of 0.8 ml/min, the column temperature was 30℃. **RESULTS:** The TLC spots of *radix angelicae dahuricae* and *radix et rhizoma rhei* were clear and well separated without negative interference. The linearity was good in the range from 1.00 to 6.00 μg/ml ($r=0.999\ 8$) for aconitine and from 15 to 90 μg/ml ($r=0.999\ 9$) for hypaconitine, with the recovery of 98.83% and 99.87% and the RSD of 2.06% and 2.63%, respectively. **CONCLUSIONS:** The method is simple, accurate, reliable and repeatable, which can be used for the quality evaluation of the Wuhuang Guwai powder.

KEYWORDS Wuhuang Guwai powder; Aconitine; Hypaconitine; Quality standard; TLC; HPLC

乌黄骨外散(批准文号:粤药制字Z20080297)由川乌、草乌、大黄和白芷等8味药材组合而成,具有活血化淤、舒筋活络和消肿止痛的功效,是由广东省中医院珠海医院国家中医药管理局重点专科骨科经验方研发而成的含毒性中药外用制剂,在治疗风湿、类风湿关节炎、骨伤和软组织挫伤等方面具有较好的疗效。中药外用制剂给药简便、生物利用度高,是有毒中药的重要应用形式,但目前对于有毒中药的外用剂量尚无统一标准^[1-3]。乌黄骨外散中川乌、草乌的主要有效成分和毒性成分为双酯型二萜生物碱乌头碱、次乌头碱,毒性强,

治疗窗窄^[4-7]。因此,制定该制剂中有毒成分的定量分析标准对保证临床使用安全尤为重要。本研究在优化大黄、白芷的薄层色谱鉴别方法的基础上,建立乌头碱、次乌头碱的高效液相色谱含量测定方法,为建立含川乌、草乌的外用制剂质量标准提供参考,现报告如下。

1 材料

1.1 仪器

BSA124S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-52 A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);TGL-16B型离心机(上海安亭科学仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);LHH-150GSP型综合药

Δ 基金项目:广东省中医药局中医药科研项目(No. 20202173)

* 副主任药师。研究方向:中药制剂、中药临床药学。E-mail: 15919192018@139.com

品稳定性试验箱(上海蓝豹试验设备有限公司);DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);WD-9403 型紫外分析仪(北京市六一仪器厂);LC-2010A HT 项高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

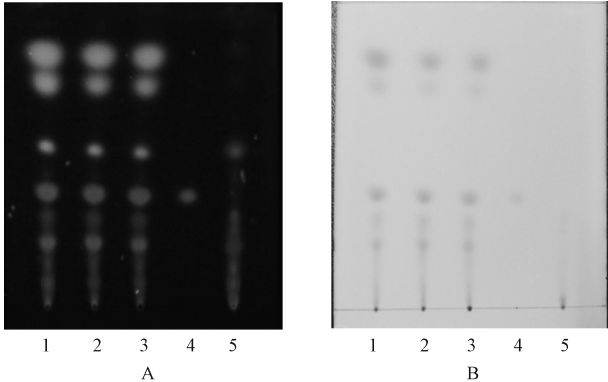
乌黄骨外散(广东省中医院珠海医院制剂室,批号为 120603、121005 和 131203);白芷对照药材(批号为 120945-201309),欧前胡素(批号为 110826-201214),异欧前胡素(批号为 110827-201109),大黄素(批号为 110756-200110),均购自中国食品药品检定研究院; C_2H_3N (色谱纯,德国 CNW 公司)、 C_4H_8O (色谱纯,德国 Merck 公司)、 $NH_3 \cdot H_2O$ 、 C_3H_8O 、 $C_4H_8O_2$ 、 $CHCl_3$ 、 CH_3COOH 、 HCl 和 CH_3COONH_4 等试剂均为分析纯,超纯水为 EPED-10TF 实验室超纯水器(南京易普达科技发展有限公司)制备。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 大黄:取样品 2.0 g,加 CH_3OH 20 ml,超声(功率为 500 W,频率为 40 kHz)处理 30 min,滤过,取续滤液 5 ml,40 ℃减压蒸干,残渣加水 15 ml、35%~38% HCl 1 ml,水浴回流 30 min,冷却,加 $(C_2H_5)_2O$ 15 ml 萃取 2 次,合并萃取液后挥干,残渣加 $CHCl_3$ 1 ml 溶解,作为供试品溶液^[8-10]。根据乌黄骨外散处方工艺制备不含大黄的阴性样品,同法制得阴性对照品溶液。取大黄素对照品适量,用 $CHCl_3$ 溶解稀释至 0.2 mg/ml,做为对照品溶液。参照《中华人民共和国药典:四部》(2020 年版)薄层色谱法,使用 25 μl 点样器吸取上述 4 种溶液各 5 μl ,分别点于同一硅胶 H 薄层板上,展开,展开剂为石油醚(PE,30~60 ℃)- $C_3H_6O_2$ - $HCOOH$ ($V:V:V=15:5:1$)的上层溶液,展距为 10 cm,取出,晾干,置于 365 nm 紫外光灯下检视。色谱图显示,供试品、对照药材和对照品显色点在对位位置上分别显示相同的黄色斑点,相关斑点氨蒸汽熏蒸后显红色;阴性对照显示无干扰,见图 1。

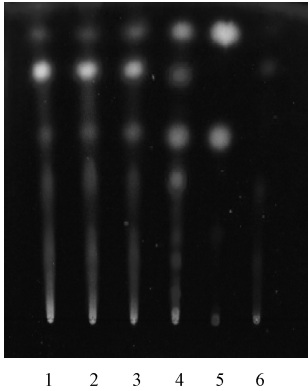
2.1.2 白芷:取样品 3.2 g,加 $(C_2H_5)_2O$ 20 ml,超声(功率为 500 W,频率为 40 kHz)处理 30 min,加适量 $(C_2H_5)_2O$ 补足质量,滤过,滤液用 0.2% $NaOH$ 30 ml 萃取 3 次,分离的 $(C_2H_5)_2O$ 层挥干后加 $C_4H_8O_2$ 1 ml 溶解,作为供试品溶液^[10-12]。取白芷对照药材 0.5 g,按上述方法制成对照药材溶液。按乌黄骨外散处方工艺制备不含白芷的阴性样品,同法制得阴性对照品溶液。取欧前胡素、异欧前胡素对照品各适量,加 $C_4H_8O_2$ 制得质量浓度均为 1 mg/ml 的单一对照品溶液。参照《中华人民共和国药典:四部》(2020 年版)薄层色谱法,使用 25 μl 点样器分别吸取上述 4 种溶液各 5 μl ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上展开,展开剂为石油醚(PE,30~60 ℃)- $(C_2H_5)_2O$ ($V:V=1:1$),展距为 8 cm,取出晾干后置波长为 365、254 nm 的紫外光灯下检视。色谱图显示,供试品、对照药材和对照品显色点在对位位置上分别显示相同的浅黄绿色及浅绿色荧光斑点;阴性对照显示无干扰,见图 2。



A. 紫外灯(365 nm)检视;B. 日光检视;1—3. 供试品(批号:120603、121005 和 131203);4. 对照品(大黄素);5. 阴性对照品
A. ultraviolet lamp (365 nm); B. sunlight; from 1 to 3. test solution (batch number: 120603, 121005 and 131203); 4. reference solution (Frangula emodin); 5. negative reference

图 1 大黄的薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms of radix et rhizoma rhei



1—3. 供试品(批号:120603、121005 和 131203);4. 白芷对照药材;
5. 对照品(欧前胡素、异欧前胡素);6. 阴性对照品
from 1 to 3. test solution (batch number: 120603, 121005 and 131203);
4. radix angelicae dahuricae reference; 5. reference solution (imperatorin, isoimperatorin); 6. negative reference

图 2 白芷的薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatograms of radix angelicae dahuricae

2.2 含量测定

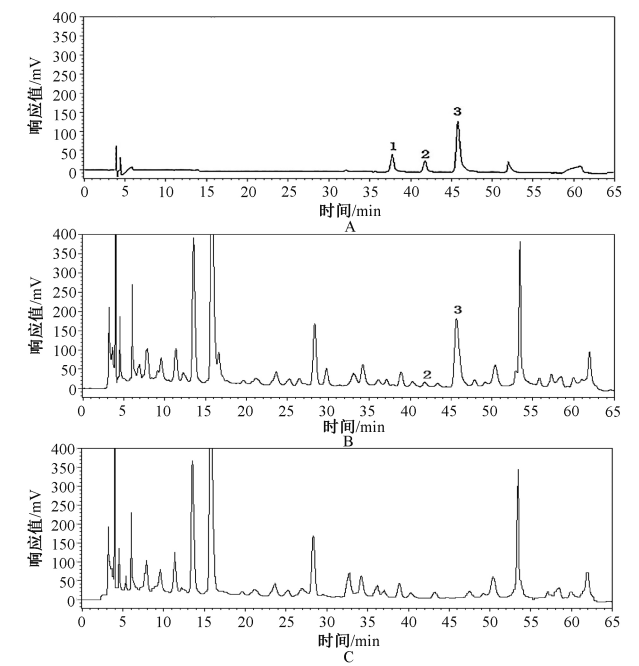
2.2.1 色谱条件:色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Merck Purospher STAR RP-18 endcapped, 250 mm×4.6 mm, 5 μm);以 C_2H_3N - C_4H_8O ($V:V=25:15$)为流动相 A,以 0.1 mol/L CH_3COONH_4 为流动相 B,梯度洗脱(洗脱程序见表 1);检测波长为 235 nm;柱温为 30 ℃;流速为 0.8 ml/min;理论塔板数按乌头碱计算 ≤ 2000 ,进样体积为 10 μl ^[10,13-14]。
2.2.2 溶液制备:精密称取次乌头碱、乌头碱对照品各适量,加 C_3H_8O - $CHCl_3$ ($V:V=1:1$)溶解,制得每 1 ml 含次乌头碱 45 μg 、乌头碱 300 μg 的混合对照品溶液。精密称定乌黄骨外散(过三号筛)6 g,加入 C_3H_8O - $C_4H_8O_2$ ($V:V=1:1$)混合溶液 100 ml,振摇,加入浓 NH_4OH 10 ml,25 ℃ 以下超声(功率为

表 1 流动相洗脱程序

Tab 1 Gradient elution programs of mobile phase		
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~48	15→26	85→74
48~49	26→35	74→65
49~58	35	65
58~65	35→15	65→85

500 W,频率为 40 kHz) 处理 30 min,用 C₃H₈O-C₄H₈O₂ (V : V= 1 : 1) 混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 50 ml,40 ℃ 以下回收溶剂至干,残渣加入 C₃H₈O-CHCl₃ (V : V= 1 : 1) 混合溶液 3 ml 溶解,以 0.22 μm 有机滤头滤过,取续滤液于 4 ℃ 环境中静置 1 h,20 000 r/min 离心(离心半径为 11 cm)5 min,取上清液,即得供试品溶液。按乌黄骨外散处方工艺制备不含川乌、草乌的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察:(1) 专属性试验。各取适量对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液,依“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图 3。结果显示,乌头碱、次乌头碱保留时间 T_R 分别为 45.655、41.791 min,与周围杂峰分离度 R_s 分别为 2.374、1.750,理论塔板数分别为 27 853、40 041。(2) 线性关系考察。精密称取乌头碱、次乌头碱各适量,加 C₃H₈O-CHCl₃ (V : V= 1 : 1) 制成每 1 ml 各含乌头碱 1 000 μg、次乌头碱 150 μg 的混合对照品母液;分别精密量取 1、2、3、4、5 和 6 ml,置于 10 ml 容量瓶中,加 C₃H₈O-CHCl₃ (V : V= 1 : 1) 稀释至刻度,摇匀即得。分别精密吸取上述 6 种对照品溶液各 10 μl,依“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积。以待测成分质量浓度 (X, μg/ml) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标,绘制标准曲线,得到乌头碱、次乌头碱回归方程, $Y_1 = 14\,590 X_1 + 1.7 \times 10^5$ ($r_1 = 0.999\,8$), $Y_2 = 14\,979 X_2 + 37\,543$ ($r = 0.999\,9$)。结果显示,乌头碱、次乌头碱分别在 100~600 μg/ml、15~90 μg/ml 范围内线性良好。(3) 精密度试验。精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,连续进样 6 次,依法测定峰面积。结果显示,乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.07%、0.94% ($n=6$),表明仪器精密度良好。(4) 稳定性试验。精密吸取“2.2.2”项下同一批(批号:131203)样品,分别在 0、4、8、12、16、20 和 24 h 时进样测定。结果显示,乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 0.59%、1.35% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。(5) 重复性试验。取乌黄骨外散同一批号(批号:131203)样品依法制得 6 份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,测定每份样品中乌头碱、次乌头碱含量。结果显示,样品中乌头碱、次乌头碱平均含量分别为 518.60、28.97 μg/g, RSD 分别为 1.46%、1.99% ($n=6$),表明方法重复性良好。(6) 加样回收率试验。精密量取同一批号(批号:131203)样品 1.5 g 各 6 份,分别精密加入 1 mg/ml 乌头碱对照品溶液 0.75 ml、75 μg/ml 次乌头碱对照品溶液 0.56 ml。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依法测定含量,并计算加样回收率,结果见表 2。



A. 对照品溶液;B. 供试品溶液;C. 阴性对照品溶液;
1. 新乌头碱;2. 次乌头碱;3. 乌头碱
A. reference solution; B. test solution; C. negative reference solution; 1. mesaconitine; 2. hyaconitine; 3. aconitine

图 3 高效液相色谱图
Fig 3 HPLC chromatograms

表 2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab 2 Results of recovery test (n=6)						
成分	样品含量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
乌头碱	1 534.71	1 500.00	2 993.34	97.30	98.83	2.06
	1 554.90	1 500.00	2 987.62	95.73		
	1 573.86	1 500.00	3 078.68	100.31		
	1 545.72	1 500.00	3 038.82	99.55		
	1 569.84	1 500.00	3 088.80	101.21		
	1 555.86	1 500.00	3 038.87	98.91		
次乌头碱	86.73	84.00	171.89	101.34	99.87	2.63
	88.11	84.00	170.87	98.59		
	87.84	84.00	172.55	100.81		
	87.00	84.00	166.85	95.23		
	86.25	84.00	170.71	100.53		
	86.88	84.00	173.22	102.69		

2.2.4 样品含量测定:精密称取 3 批样品(批号:131203、121005 和 120603)各适量,分别按“2.2.2”项下操作制备供试品溶液,对照品溶液和供试品溶液各进样 10 μl,平行测定 3 次,记录峰面积,以外标法计算样品中乌头碱、次乌头碱含量,取平均值,结果见表 3。

表 3 乌头碱、次乌头碱的含量测定结果 (μg/g, n=3)

Tab 3 Content determination of aconitine and hyaconitine (μg/g, n=3)		
批号	乌头碱含量	次乌头碱含量
131203	43.90	315.60
121005	44.12	318.75
120603	44.27	319.09

3 讨论

毒性药材的使用是中药外用制剂的特点之一^[15]。由于缺乏中药医院制剂标准规范化体系,检测指标水平偏低,导致制剂质量可控性差,进而导致临床使用存在安全风险是目前医院制剂存在的主要问题^[16-18]。乌黄骨外散现行质量标准未对毒性生物碱进行定量控制,质控指标单一,难以保证有效性和安全性。因此,参考《中华人民共和国药典:一部》(2020 年版),本研究以活性成分为对照,建立主要指标成分的含量测定方法。

3.1 主要指标成分的选取

乌黄骨外散方中以川乌、草乌为君药,二者合用,可祛风散寒、温经止痛;白芷祛风燥湿止痛,兼能消肿,可加强川乌、草乌散寒止痛之功,为臣药;大黄性味苦寒,活血祛瘀、清热消肿,使瘀血去,新血生,而肿胀自消,既为佐制,亦为佐助,为佐药。故本研究主要修订制剂中主要成分白芷、大黄的薄层色谱定性鉴别方法,建立川乌、草乌有毒成分乌头碱、次乌头碱的高效液相色谱定量测定方法。

3.2 薄层色谱法鉴别方法的改进

本研究中,白芷、大黄的薄层色谱法鉴别主要参考《中华人民共和国药典:一部》(2020 年版)的方法,分别对温度、湿度、薄层板和展开剂进行了考察,并对展开条件进行耐用性试验。

3.2.1 白芷展开条件的筛选:本研究分别采用薄层层析硅胶板 Si60[默克化工技术(上海)有限公司,规格为 10 cm×20 cm]和硅胶板试剂 G(青岛海洋化工厂分厂,规格为 10 cm×20 cm),石油醚(30~60℃)-乙醚(V:V=1:1)和石油醚(30~60℃)-乙醚(V:V=3:2)进行研究。结果显示,硅胶板试剂 G 比硅胶板 Si60 在常温(20℃)下对白芷的分离效果更好,但硅胶板 Si60 的点更清晰,考虑到成本与分离效果,本研究采用青岛海洋化工厂分厂生产的硅胶板试剂 G,以石油醚(30~60℃)-乙醚(V:V=1:1)为展开剂,耐用性好。

3.2.2 大黄展开条件的筛选:本研究以掌叶大黄为对照药材,以大黄素和大黄酸为对照品,鉴别乌黄骨外散中的大黄。预实验分别以硅胶板试剂 H(青岛海洋化工厂分厂,规格为 10 cm×20 cm)和自制硅胶 H 板(固定相为青岛海洋化工有限公司生产的薄层层析硅胶 HG/T2354-2010,固定相:0.5% CMC-Na=1 g:3 ml,规格为 10 cm×20 cm),结果显示,在常温条件下两者分离效果相当,考虑实验通用性,选用青岛海洋化工厂分厂生产的硅胶板试剂 H。在低温(4℃)、低湿度(30%)和高湿度(80%)3 种条件下的耐用性考察中发现,大黄酸斑点与相邻主成分斑点分离度分别为 0.77、0.86 和 1.10,大黄素斑点与相邻主成分斑点分离度分别为 2.07、1.31 和 1.62,最终使用大黄素作为对照。

3.3 乌头类生物碱含量限度的制定

乌黄骨外散处方中,川乌、草乌的用量(g)共占处方总用

量(g)的 30.82%,鉴于本品为生粉入药,按照国家药典委员会的要求(生粉入药按 80%转移率计算),参照《中华人民共和国药典:一部》(2020 年版)川乌、草乌项下含量限度计算,每 1 g 乌黄骨外散含川乌、草乌以乌头碱、次乌头碱总量计,为 180~900 μg,即 0.018%~0.090%。

参考文献

[1] 武晏屹,白明,田硕,等.大毒中药外用方法现状及特点分析[J].中华中医药杂志,2021,36(2):1045-1048.

[2] 赖静怡.近 10 年中药外用制剂质量标准的研究进展[J].中国医药指南,2019,17(28):14-16.

[3] 王萍,方晓艳,魏珍珍,等.基于数据挖掘的中药外用不良反应分析及思考[J].中药药理与临床,2021,37(1):221-229.

[4] 王丹,贾德贤,李真真,等.草乌的安全性评价与风险控制措施的探讨[J].中国中药杂志,2018,43(15):3093-3100.

[5] 张晓朦,李凡,张冰,等.数据挖掘乌头类中成药不良反应特点与合理用药警戒[J].中国中药杂志,2018,43(2):216-221.

[6] 赵梓邯,张琳,李文斌,等.中药毒性与安全性评价研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(20):208-216.

[7] 郝丽丽,梁国欣,魏洪鑫,等.中药附子的毒理学安全性研究进展[J].毒理学杂志,2020,34(6):435-440.

[8] 张昱,刘美欣,陈鸿英,等.中药“洗一号”涂膜剂定性、定量质量研究[J].沈阳药科大学学报,2021,38(2):141-146.

[9] 黄振忠,袁经权,唐炳兰,等.洗四方袋泡剂质量标准研究[J].中国药业,2020,29(15):64-67.

[10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020 年版.北京:中国医药科技出版社,2020.

[11] 刘水婷,朱卫丰,李佳莉,等.蛇伤外敷超微散质量标准的研究[J].江西中医药大学学报,2020,32(6):81-86.

[12] 高丽新,王丕明.白芷川芎鼻给药剂质量标准研究[J].亚太传统医药,2019,15(6):73-76.

[13] 徐冰,张玉修,曹胜男,等.乌头类药材及其中成药乌头碱类化合物的含量测定[J].济宁医学院学报,2020,43(4):238-241,247.

[14] 高珊,唐蕾,赵伟国,等.止痛擦剂中新乌头碱、次乌头碱和乌头碱含量测定研究[J].今日药学,2020,30(9):616-619.

[15] 朱朝军,吕佳康,张朝晖.中医外用药新研发的思考[J].中国临床药理学杂志,2017,33(6):574-576.

[16] 陈家润,江映珠,吴雪龙.广东省医疗机构制剂质量标准修订存在问题及对策[J].中国药事,2016,30(3):209-214.

[17] 石炳娟.提高和保障医疗机构中药制剂质量的思考[J].中国药物警戒,2018,15(5):276-279.

[18] 刘潇潇,隆颖,戴忠,等.《广东省医疗机构制剂规范》中的中药制剂质量标准的分析与探讨[J].中国药房,2019,30(15):2027-2030.

(收稿日期:2021-03-17)

欢迎订阅《中国医院用药评价与分析》杂志!