中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)01－0087－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.01.019

接骨丹片质量标准提升研究*

蔡秀娟，林向前△，林石明

（福建省漳州市中医院，福建 漳州　363000）

摘要：目的　提升接骨丹片的质量标准。**方法**　采用薄层色谱法鉴别制剂中的制马钱子和大黄；采用高效液相色谱法同时测定马钱子碱和士的宁的含量，色谱柱为 Kromasil 100－5－C_{18}柱（250 mm×4.6 cm，5 μm），流动相为乙腈－0.01 mol/L 庚烷磺酸钠与 0.02 mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液进行梯度洗脱，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 260 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL。**结果**　制马钱子、大黄的薄层色谱图斑点清晰，分离度高，且阴性对照无干扰。马钱子碱和士的宁的质量浓度分别在 1.46～116.73 μg/mL 和 1.60～128.30 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好（r = 0.999 5，0.999 7，n = 6）；精密度、重复性、稳定性试验结果的 *RSD* 均小于 2.0%（n = 6）；平均加样回收率分别为 97.28% 和 96.23%，*RSD* 分别为 1.16% 和 1.36%（n = 6）。**结论**　该方法专属性好，结果准确、可靠，可用于接骨丹片的质量评价。

关键词：接骨丹片；薄层色谱法；高效液相色谱法；质量标准

Improvement of Quality Standard for Jiegudan Tablets

CAI Xiujuan, LIN Xiangqian, LIN Shiming

(Zhangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangzhou, Fujian, China　363000)

Abstract: Objective　To improve the quality standard of Jiegudan Tablets. **Methods**　Processed Strychnine Semen and Rhei Radix et Rhizoma in the preparation were qualitatively identified by the thin－layer chromatography (TLC) method. The contents of brucine and strychnine in the preparation were determined by the high－performance liquid chromatography (HPLC) method, the chromatographic column was Kromasil 100－5－C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was mixed solution of the equal amount of acetonitrile－0.01 mol/L sodium heptanesulfonate and 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results**　The TLC chromatograms of processed Strychnine Semen and Rhei Radix et Rhizoma showed clear spots and good separation, with no interference from the negative reference. The linear ranges of brucine and strychnine were 1.46－116.73 μg/mL and 1.60－128.30 μg/mL (r = 0.999 5, 0.999 7, n = 6), respectively. The *RSD*s of precision, repeatability and stability test results were lower than 2.0% (n = 6). The average recoveries of brucine and strychnine were 97.28% and 96.23%, with *RSD*s of 1.16% and 1.36% (n = 6), respectively. **Conclusion**　The established method is accurate and reliable, which can be used for the quality evaluation of Jiegudan Tablets.

Key words: Jiegudan Tablets; TLC; HPLC; quality standard

接骨丹片由骨碎补、续断、制马钱子、大黄等18味　中药材组方，具有续筋接骨、活血化瘀等功效，用于治

*基金项目：福建省漳州市卫生健康委员会2023－2026年度市中医药科研课题[2023ZY01]。

第一作者：蔡秀娟，女，硕士研究生，主管药师，研究方向为院内制剂研发与质量标准，(电子信箱)568153603@qq.com。

△通信作者：林向前，男，大学本科，主任中药师，研究方向为中药制剂生产工艺与质量标准，(电子信箱)xiangqian95@sina.com。

19(12):2645－2648.

[7] 柯跃鸿，骆仁红，孙嘉嘉，等. HPLC 法测定氯雷他定糖浆中依地酸二钠的含量[J]. 海峡药学，2022，34(6):54－56.

[8] 姚晶晶，匡　钊，丁苏苏. 离子色谱法测定妥布霉素地塞米松滴眼液中依地酸二钠含量[J]. 中国药业，2021，30(24):78－80.

[9] 顾晓风，唐倩倩. HPLC 法测定注射用艾司奥美拉唑钠中依地酸二钠的含量[J]. 中国药品标准，2021，22(3):238－241.

[10] 姚枝玉，黄朝瑜，蔡美明，等. 高效液相色谱法测定咪达唑仑注射液中依地酸二钠的含量[J]. 中南药学，2020，18(1):102－104.

[11] 陈　达，居　斌，赵述强，等. HPLC 法考察硫酸奈替米星注射液中依地酸二钠的含量[J]. 药学研究，2018，37(1):23－26.

[12] 郑俊民. 药用辅料手册[M]. 北京：化学工业出版社，2005:263.

[13] 陆　滢. 反相高效液相色谱法测定替硝唑氯化钠注射液中乙二胺四乙酸二钠含量[J]. 中国药业，2013，22(24):37－38.

[14] 李发美. 分析化学[M]. 北京：人民卫生出版社，2011:85.

[15] 刘晓强，刘　毅，唐丽丹. 常用注射剂中依地酸二钠添加量合理性评价[J]. 中国医院药学杂志，2022，42(23):2471－2475.

（收稿日期：2023－02－16；修回日期：2023－08－02）

疗骨折中、后期和急性软组织挫伤，疗效确切，安全可靠。接骨丹片是根据本院骨伤科创始人、福建省名老中医章宝春多年经验方制备而成的特色院内制剂，临床已应用60余年。接骨丹片原质量标准仅有性状、鉴别和检查项目，缺乏可控性。为按要求对医疗机构应用传统工艺配制的中药制剂进行备案制管理，同时全面、科学、有效地控制接骨丹片的质量[1]，本研究中在原接骨丹片的质量标准基础上，增加了高效液相色谱法测定制剂中马钱子碱和士的宁的含量，为提升接骨丹片的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪（美国Agilent科技有限公司）；SQP型电子天平（精度为0.1 mg），TE412－L型电子天平（精度为十万分之一），均购于德国Sartorius科学仪器有限公司；KQ－500DA型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司，功率为500 W，频率为40 kHz）；硅胶G板、以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶H薄层板（青岛海洋化工有限公司）。

1.2 试药

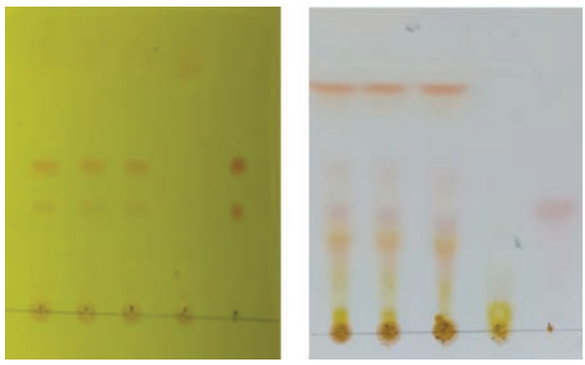
马钱子总生物碱对照提取物（批号为CBYU－6D02，含量以马钱子碱45.40%、士的宁49.90%计），大黄酸对照品（批号为XVHV－WSVX，含量为99.3%），均购于中国食品药品检定研究院；接骨丹片（医院制剂，批号分别为20221001，20221002，20221003，规格为每片0.3 g）；乙腈、甲醇均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别[2－10]

制马钱子：取样品35片，研磨成细粉，过100目筛，加入15 mL三氯甲烷－乙醇溶液（10∶1，*V*/*V*）和1.5 mL浓氨试液密塞，振荡15 min，室温下静置2 h，过滤，蒸干滤液残留物中加入1 mL三氯甲烷使溶解，即得供试品溶液。按处方比例及制备工艺制备缺马钱子的阴性样品，并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取马钱子总生物碱对照提取物适量，加入三氯甲烷配制成质量浓度为2 mg/mL的对照品溶液。分别吸取上述2种溶液各10 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以甲苯－丙酮－乙醇－浓氨试液（4∶5∶0.6∶0.4，*V*/*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷淋稀释的碘化铋钾试液使显色。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰。详见图1 A。

大黄：取样品10片，研磨成细粉，过100目筛，加入20 mL甲醇，滤过，取10 mL滤液，蒸干，将残留物溶于10 mL超纯水中，加入1 mL盐酸，水浴加热30 min，即刻冷却，用20 mL乙醚分2次提取，合并乙醚提取液，蒸干，残留物加1 mL三氯甲烷使溶解，即得供试品溶液。按处方比例及制备工艺制备缺熟大黄的阴性样品，并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取大黄酸对照品适量，加甲醇制成质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。分别取上述2种溶液各4 μL，点于同一硅胶H薄层板上，以石油醚－甲酸乙酯－甲酸（15∶5∶1，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点，且阴性对照无干扰。详见图1 B。



1－3. 供试品溶液（批号分别为20221001，20221002，20221003） 4. 阴性对照品溶液 5. 对照品溶液 A. 制马钱子 B. 大黄

图1 薄层色谱图

1－3. Test solution (batch numbers: 20221001, 20221002, 20221003) 4. Negative reference solution 5. Reference solution A. Processed Strychnine Semen B. Rhei Radix et Rhizoma

Fig. 1 TLC chromatograms

2.2 马钱子碱和士的宁含量测定

2.2.1 色谱条件[11－15]

色谱柱：Kromasil 100－5－C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）－0.01 mol/L庚烷磺酸钠与0.02 mol/L磷酸二氢钾等量混合溶液（B），梯度洗脱（程序见表1）；流速：1.0 mL/min；检测波长：260 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序（%）

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase (%)

时间	流动相A	流动相B	时间	流动相A	流动相B
0 min	21	79	30.0 min	90	10
22.0 min	21	79	30.1 min	21	79
22.1 min	90	10	45.0 min	21	79

2.2.2 溶液制备

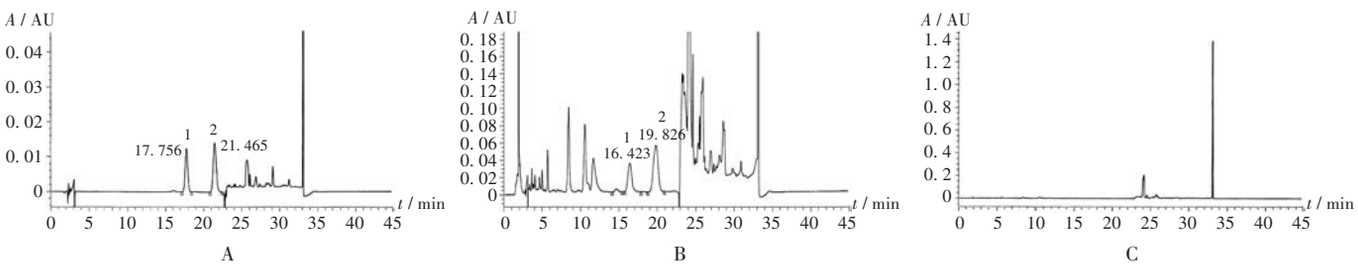
取样品粉末1 g，精密称定，置带塞的锥形瓶中，用3 mL浓氨水浸湿，静置30 min，精密加入25 mL三氯甲烷，密塞，摇匀，称定质量，超声处理30 min，冷却至室

温，用三氯甲烷补足减失的质量，摇匀，滤过，即得供试品溶液。

取常温减压干燥 24 h 的马钱子总生物碱对照提取物 15 mg，精密称定，置 50 mL 容量瓶中，加适量三氯甲烷溶解并定容，摇匀，作为对照品贮备液；精密量取 1.5 mL 对照品贮备液，置 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容，摇匀，即得对照品溶液。按处方工艺及比例制备缺制马钱子的阴性样品[16]，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 *方法学考察*[17-22]

专属性试验：取 2.2.2 项下 3 种溶液各适量，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果供试品溶液与对照品溶液色谱图中，马钱子碱和士的宁在各自的保留时间处均有吸收峰，且阴性对照无干扰。马钱子碱峰和士的宁峰的理论板数均大于 5 000，分离度均大于 1.5，表明专属性良好。详见图 2。



1. 马钱子碱　2. 士的宁

A. 对照品溶液　B. 供试品溶液　C. 阴性对照品溶液

图 2　高效液相色谱图

1. Brucine　2. Strychnine

A. Reference solution　B. Test solution　C. Negative reference solution

Fig. 2　HPLC chromatograms

线性关系考察：取 2.2.2 项下对照品贮备液适量，加三氯甲烷稀释，得马钱子碱质量浓度分别为 1.46，7.30，14.59，43.78，78.79，116.73 μg/mL，士的宁质量浓度分别为 1.60，8.02，16.04，48.11，86.60，128.30 μg/mL 的系列混合溶液，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。以质量浓度（X，μg/mL）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y_{马}$ = 14 911.3$X_{马}$ − 14 390.8（r = 0.999 5，n = 6），$Y_{士}$ = 18 265.8$X_{士}$ − 17 404.8（r = 0.999 7，n = 6）。结果表明，马钱子碱和士的宁质量浓度分别在 1.46～116.73 μg/mL 和 1.60～128.30 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：取 2.2.2 项下对照品溶液适量，按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果马钱子碱和士的宁峰面积的 *RSD* 分别为 0.76% 和 0.38%（n = 6），表明仪器精密度良好。

重复性试验：取样品（批号为 20221001）6 份，依法制备供试品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算马钱子碱和士的宁的含量。结果马钱子碱和士的宁的含量分别为 0.44 mg/g 和 0.27 mg/g，*RSD* 分别为 1.49% 和 1.63%（n = 6），表明方法重复性良好。

稳定性试验：取样品（批号为 20221001），依法制备供试品溶液，分别于 0，2，4，8，16，24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果马钱子碱和士的宁峰面积的 *RSD* 分别为 1.12% 和 0.95%（n = 6），表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验：取 6 份阴性样品，精密称定，分别加入适量对照品溶液，按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，并计算回收率。结果见表 2。

表 2　加样回收试验结果（n = 6）

Tab. 2　Results of the recovery test (n = 6)

加入量(mg/L)		测得量(mg/L)		回收率(%)		$\bar{X}$(%)		*RSD*(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.010 4	0.011 5	0.009 9	0.010 8	95.19	93.91	97.28	96.23	1.16	1.36
0.010 4	0.011 5	0.010 2	0.011 1	98.08	96.52				
0.010 4	0.011 5	0.010 1	0.011 0	97.12	95.65				
0.010 4	0.011 5	0.010 1	0.011 2	97.12	97.39				
0.010 4	0.011 5	0.010 2	0.011 2	98.08	97.39				
0.010 4	0.011 5	0.010 2	0.011 1	98.08	96.52				

注：A 为马钱子碱，B 为士的宁。

Note: A refers to brucine, and B refers to strychnine.

2.2.4 *样品含量测定*

取样品（批号分别为 20221001，20221002，20221003），依法制备供试品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果 3 批样品中士的宁含量分别为 0.44，0.45，0.45 mg/g，马钱子碱含量分别为 0.27，0.24，0.25 mg/g。

3　讨论

3.1　指标性成分选择

制马钱子为方中臣药，其主要成分马钱子碱和士

的宁既是有效成分也是毒性成分[23-24]。士的宁对中枢神经系统毒性较大，口服5～10 mg即出现中毒症状；马钱子碱的含量仅次于士的宁，可阻断神经肌肉传导，出现箭毒性[25-26]。故选择制马钱子主要成分马钱子碱和士的宁作为接骨丹片含量测定的指标性成分。

3.2 提取方法选择

曾考察3种提取方法（超声提取、冷浸提取、回流提取）对接骨丹片中马钱子碱和士的宁提取效果的影响。结果表明，冷浸过夜提取的含量较低；回流提取的成分较多，干扰样品检测；而超声提取操作简便，提取时间短，提取成分较少，色谱分离效果好。确定提取方式后，曾考察超声时间对提取效果的影响，结果超声提取15 min时马钱子碱和士的宁的含量均较低，超声提取30 min时其含量基本不再增加。故选择超声提取30 min。

3.3 色谱条件选择

色谱柱：在其他相同色谱条件下，考察Kromasil、中谱红、Agilent、Sepax等不同厂家的色谱柱对测定结果的影响，发现Kromasil 100-5-C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）分离效果和重复性好。故选择此色谱柱。

流动相：供试品溶液中成分多样，极性差异大。参照2020年版《中国药典（一部）》马钱子含量测定方法，以乙腈-0.01 mol/L庚烷磺酸钠与0.02 mol/L磷酸二氢钾等量混合溶液（21∶79，*V*/*V*）为流动相进行等度洗脱，通过延长分析时间，极性小的成分仍无法及时洗脱，干扰样品检测结果。故调整洗脱程序为梯度洗脱。

3.4 方法评价

本研究在原质量标准的基础上增加了马钱子碱和士的宁的含量测定方法，所建立的方法操作简便、结果准确、精密度与重复性良好，可为改进接骨丹片的质量标准提供参考。

参考文献

[1] 刘 彦，韩德强，付玮辰，等. 续仲接骨散的薄层色谱鉴别和含量测定[J]. 中国中医药科技，2022，29(5)：770-773.
[2] 王 婧. 祛喘胶囊质量标准研究[J]. 中国药业，2021，30(12)：71-75.
[3] 范莹莹，才 毛，杨凤梅. 七味马钱子丸的质量标准提高研究[J]. 中国药房，2018，29(2)：163-167.
[4] 刘东升，刘婷婷，姚世霞，等. 风湿关节炎片的质量标准提升研究[J]. 中国现代中药，2021，23(11)：1982-1987.
[5] 李向欣，王法宇，高梓漠，等. 祛风止痛贴膏薄层鉴别方法的建立[J]. 吉林中医药，2020，40(1)：108-111.
[6] 姜 旭，赵跃东，梁娟娟，等. 小儿参术健脾丸质量标准提升研究[J]. 中国药业，2023，32(14)：77-81.
[7] 范 莹，吕 凌，谢宜名. 灵丹草口服液中洋艾素薄层鉴别和含量测定[J]. 实用医药杂志，2014，31(3)：242-244.
[8] 薛彩红，刘 睿，滕 明. 复方紫草解毒软膏的质量标准研究[J]. 中医药导报，2023，29(4)：24-29.
[9] 李德斌，黄志芳，刘云华，等. 黄药子质量标准研究[J]. 中成药，2014，36(5)：1037-1040.
[10] 李晓妮，胡 爽，葛 新，等. HPLC法测定风湿关节炎片中士的宁和马钱子碱的含量[J]. 中草药，2003，34(10)：53-55.
[11] 沈春生，唐元军，李美月. HPLC法测定接骨丹片中士的宁和马钱子碱的含量[J]. 海峡药学，2008，20(1)：44-45.
[12] 雷宁波，董 林，彭冉东，等. 骨刺消巴布剂质量标准研究[J]. 中国处方药，2017，15(3)：21-23.
[13] 刘丽丽，史烟女，方 蕾，等. 马钱子总碱-白芍总苷脂质立方液晶纳米粒制备及体外评价[J]. 中草药，2019，50(17)：4076-4083.
[14] 王菲菲，张聿梅，郑笑为，等. 骨刺片中士的宁和马钱子碱含量测定方法的研究[J]. 药物分析杂志，2018，38(10)：1824-1829.
[15] 杨艳娇，刘雅敏，白月明，等. HPLC法测定骨痹舒片中士的宁和马钱子碱的含量[J]. 风湿病与关节炎，2013，2(12)：39-41.
[16] 向春燕，况 刚，盘思颖，等. 小儿健脾丸质量标准研究[J]. 中国药业，2021，30(23)：62-65.
[17] 李美延，彭 伟，陈 宇，等. 益气通络胶囊质量标准研究[J]. 中药与临床，2022，13(6)：34-38.
[18] 魏清芳，王嘉林，辛爱玲. 非离子对型反相高效液相色谱法同时测定龙马风湿丸中士的宁和马钱子碱的含量[J]. 河南中医，2011，31(5)：551-553.
[19] 李广胜，覃 芳，杨季菱，等. HPLC法测定当归补血配方颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药房，2015，26(36)：5131-5133.
[20] 马 鹏，张远哲，黄宁川. 毒龙丹中马钱子炮制前后主要成分含量变化的UPLC法分析[J]. 广州化工，2022，50(15)：125-127.
[21] 李 灿，曾 娟，龙雨青，等. 基于化学模式识别和网络药理学预测枳实潜在质量标志物[J]. 中国新药杂志，2023，32(12)：1243-1252.
[22] 刘信秋，李思光，尹安坤，等. 柴芍理气和胃合剂质量标准研究[J]. 中国药业，2023，32(12)：72-75.
[23] 黄以蓉. 消炎止痛膏质量标准新研究[J]. 西部中医药，2014，27(11)：34-38.
[24] 陈继英，蓬展鹏，吴 谋，等. 高效液相色谱法测定万应跌打酒中士的宁含量[J]. 中国药业，2021，30(4)：63-65.
[25] 王 蕾. RP-HPLC法测定痹痛宁胶囊中士的宁和马钱子碱的含量[J]. 药学与临床研究，2012，20(4)：377-378.
[26] 刘 君. 马钱子传统炮制方法不同炮制品中士的宁和马钱子碱含量比较研究[J]. 医学信息，2017，30(12)：108-109.

（收稿日期：2023-08-07；修回日期：2023-09-08）