

· 研究报告 ·

风寒湿灵散质量标准研究

曹红, 单婷婷, 胡丹, 张贵英 (中央军委后勤保障部卫生局药品仪器检验所, 北京 100071)

[摘要] 目的 修订风寒湿灵散的质量控制方法。方法 采用薄层色谱(TLC)法对方中狼毒、白芷、三七、赤芍、姜黄等药材进行定性鉴别;采用HPLC法测定处方中欧前胡素的含量。结果 在TLC色谱中,可鉴别制剂中的狼毒、白芷、三七、赤芍、姜黄;欧前胡素在 $0.0336\sim 0.2690\mu\text{g}$ 范围内呈良好的线性关系, r 值为 0.9999 ;样品中欧前胡素的平均加样回收率为 96.77% (RSD为 1.63%)。结论 此方法简便、准确性好,为控制风寒湿灵散的质量提供了科学依据。

[关键词] 高效液相色谱;薄层色谱;风寒湿灵散;欧前胡素

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0343-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.012

Study on the quality standard for Fenghan Shiling San

CAO Hong, SHAN Tingting, HU Dan, ZHANG Guiying (The Institute for Drug and Instrument Control of Directorate of Medical Services and Logistics Support, Central Military Commission of PRC, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective** To revise and improve the quality standard for Fenghan Shiling San. **Methods** The thin layer chromatography was used to identify euphorbiae ebracteolatae radix, angelicae dahuricae radix, notoginseng radix et rhizome, radix paeoniae rubra and rhizoma curcumae longae. The high-performance liquid chromatography was applied to determine the contents of imperatorin in Fenghan Shiling San. **Results** Euphorbiae ebracteolatae radix, angelicae dahuricae radix, notoginseng radix et rhizome, radix paeoniae rubra and rhizoma curcumae longae can be identified by TLC. Imperatorin showed a good linear relationship in a range of $0.0336\sim 0.2690\mu\text{g}$, $r=0.9999$. The average recovery of imperatorin was 96.77% (RSD= 1.63% , $n=6$). **Conclusion** This accurate and quick method can be used for the quality control of Fenghan Shiling San.

[Key words] HPLC; TLC; Fenghan Shiling San; imperatorin

风寒湿灵散是由狼毒、白芷、三七、赤芍、姜黄等十三味中药组成的复方非标准制剂。具有温经活血,祛风散寒,散瘀消肿之功效。主治急慢性腰痛,腰椎间盘突出,颈椎病,髌、膝、踝、足跟骨刺增生及坐骨神经痛。原质量标准中只有检查项,内容过于简单,无法全面控制制剂的质量,根据全军医疗机构制剂标准提高课题的要求,在原有质量标准基础上,增加了对君药狼毒和臣药白芷、三七、赤芍的鉴别,以及使药姜黄的薄层色谱(TLC)鉴别,由于君药狼毒无专属性测定成分,故选择臣药白芷进行含量测定的研究,即采用HPLC法测定了风寒湿灵散中欧前胡素的含量,结果较为满意,提高后的质量标准可基本控制该制剂的质量。

1 仪器与试药

仪器:Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国)。

Satorious 电子分析天平(德国赛多利斯股份公司);KQ3200E 医用超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

试药:风寒湿灵散由原解放军南京政治学院门诊部提供(批号:20140623、20140707、20150318)。

欧前胡素对照品(批号:110826-201013,含量 99.6%)、狼毒对照药材(批号:121331-201303)、三七对照药材(批号:120941-201409)、白芷对照药材(批号:120945-201510)、赤芍对照药材(批号:121093-201303)、姜黄对照药材(批号:121188-201304)均由中国食品药品检定研究院提供。

甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 狼毒^[1]

取本品 5g ,加甲醇 30ml ,超声处理 40min ,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2ml 使溶解,作为供试品溶液。另取狼毒对照药材 2g ,同上述方法操作,作

[基金项目] 全军医疗机构制剂标准提高重点课题(13ZJZ16)

[作者简介] 曹红,主任药师,研究方向:药物分析, Tel: (010) 66949080, Email: caohong6699@sina.com

为对照药材溶液。另按处方量制备缺狼毒的阴性对照样品,同法制成阴性对照溶液。按照 TLC 法(《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则 0502^[1])实验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(8.5 : 1.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 的硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 烘数分钟,置紫外光(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照未见干扰,见图 1。

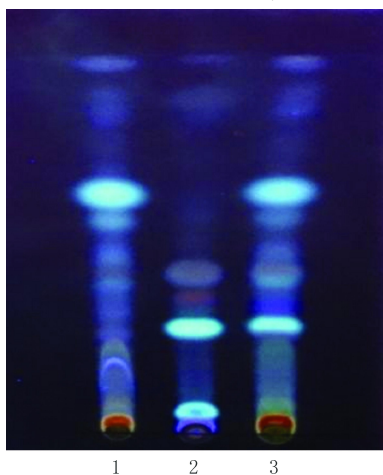


图 1 狼毒 TLC 图
1. 缺狼毒的阴性对照样品;
2. 供试品; 3. 狼毒对照药材

2.1.2 三七^[1]

取本品 5 g,加甲醇 30 ml,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 ml 使溶解,溶液移至分液漏斗中,用乙醚提取 2 次,每次 10 ml,弃去乙醚液,水层用水饱和的正丁醇提取 3 次,每次 20 ml,合并正丁醇提取液,水浴蒸干,残渣加甲醇 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取三七总皂苷对照品,加甲醇制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。另按处方量制备缺三七的阴性对照品,同法制成阴性对照溶液。按照 TLC 法实验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-正丁醇-水(2 : 1 : 4 : 2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 的香草醛硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘数分钟。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,阴性对照品未见干扰,见图 2。

2.1.3 白芷^[1]

取本品 5 g,加乙醚 10 ml,浸泡 1 h,时时振摇,滤过,滤液蒸干,残渣加乙酸乙酯 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取白芷对照药材 0.5 g,同上述方法操作,制备对照药材溶液。另按处方量制备缺白芷

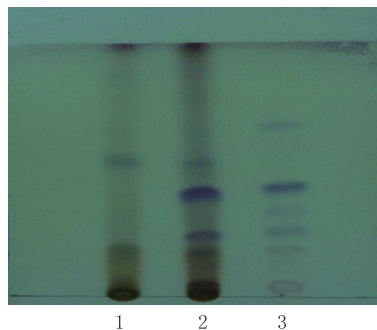


图 2 三七 TLC 图
1. 缺三七的阴性对照品;
2. 供试品; 3. 三七总皂苷对照品

的阴性对照品,同法制成阴性对照溶液。按照 TLC 法实验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-乙醚(3 : 2)为展开剂,在室温下展开,取出,晾干,置紫外光(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照品未见干扰,见图 3。

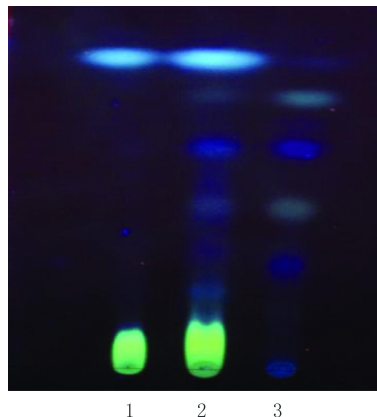


图 3 白芷 TLC 图
1. 缺白芷的阴性对照品;
2. 供试品; 3. 白芷对照药材

2.1.4 赤芍^[1]

取本品 5 g,加甲醇 10 ml,振摇 5 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取赤芍对照药材 0.5 g,同上述方法操作,制备对照药材溶液。按处方量制备缺赤芍的阴性对照品,同法制成阴性对照溶液。按照 TLC 法实验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ 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-甲酸(40 : 5 : 10 : 0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 的香草醛硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘数分钟。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照品未见干扰,见图 4。

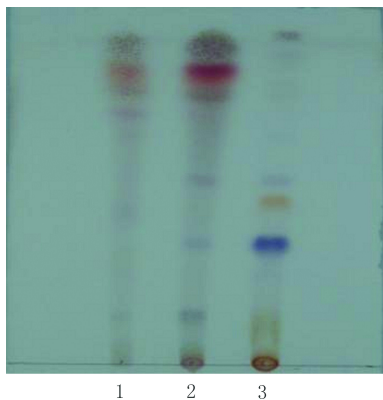


图4 赤芍 TLC图

1. 缺赤芍的阴性对照品;
2. 供试品; 3. 赤芍对照药材

2.1.5 姜黄^[1]

取本品 5 g, 加无水乙醇 20 ml, 振摇, 放置 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇 2 ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取姜黄对照药材 0.2 g, 同上述方法操作, 制备对照药材溶液。按处方量制备缺姜黄的阴性对照品, 同法制成阴性对照溶液。按照 TLC 法实验, 吸取上述 3 种溶液各 2 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-甲酸 (96 : 4 : 0.7) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照品未见干扰, 见图 5。

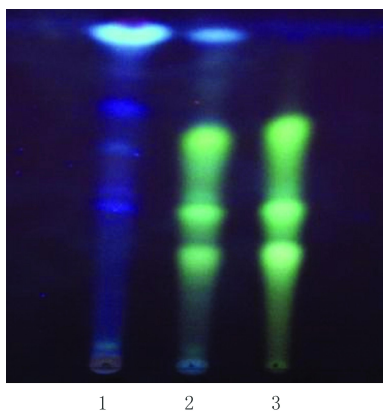


图5 姜黄 TLC图

1. 缺姜黄的阴性对照品;
2. 供试品; 3. 姜黄对照药材

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[2-4]

色谱柱的考察: 分别选用岛津 VP-ODS C₁₈ (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) 分析柱、依利特 Hypersil ODS C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 分析柱、Agilent

ZORBAX EclipseXDB-C₁₈ (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) 色谱柱, 测定同批次样品 (批号: 20140623), 结果差别不大, 含量在 0.132 mg/g 左右, 说明本法适用于不同类型 C₁₈ 色谱柱, 本实验选择 Agilent ZORBAX EclipseXDB-C₁₈ 柱。

流动相的选择^[2-4]: 分别采用甲醇-水 (65 : 35)、甲醇-水 (60 : 40) 作为流动相进行测定, 含量测定结果有一定差异。甲醇-水 (65 : 35) 供试品中欧前胡素峰分离度不佳, 理论塔板数也较低, 故确定以甲醇-水 (60 : 40) 为流动相。

色谱条件的确定: 甲醇-水 (60 : 40); 流速 1.0 ml/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。检测波长 300 nm。理论塔板数以欧前胡素峰计, 应不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备

取欧前胡素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 ml 含欧前胡素 10 μ g 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备^[1]

取本品约 5.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 ml, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 1 h, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 专属性试验

空白溶液的制备: 按照处方中药味的比例, 自配不含白芷的群药, 按其工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制备并测定, 结果空白溶液在与对照品相同保留时间处未显色谱峰, 故认为无干扰 (图 6)。

2.2.5 线性关系考察

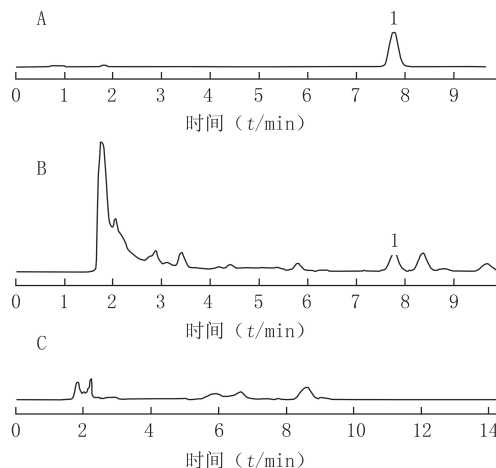


图6 风寒湿灵散专属性试验 HPLC图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液;
C. 阴性对照溶液; 1. 欧前胡素

取欧前胡素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并制成每1 ml含0.026 9 mg的溶液,作为对照品5,分别用甲醇稀释如下:2.5 ml→10 ml、5 ml→10 ml,作为对照品溶液2、3。取10 ml量瓶,从对照品2中精密吸取5 ml,用甲醇稀释至刻度,作为对照品1。精密取对照品适量,加甲醇溶解并制成每1 ml含20.175 μg的溶液,作为对照品4。精密吸取上述对照品溶液1~5各10 μl,注入液相色谱仪,按“2.2.1”项下所述色谱条件测定峰面积,以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算回归方程:

$$Y=3.8085 \times 10^6 X+14955, r=0.9999$$

结果表明,欧前胡素在0.033 625~0.269 0 μg范围内有良好的线性关系。

2.2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号:20140623),分别于配制后0、1、2、4、10、24 h,依法测定,结果欧前胡素的平均峰面积为374 812(RSD为0.59%, $n=6$),结果表明,供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.2.7 重复性试验

取同一批次的风寒湿灵散(批号:20140623)6份,按供试品溶液的制备方法配制,测定含量,结果风寒湿灵散中欧前胡素的平均含量为0.132 mg/g;RSD为1.62% ($n=6$)。

2.2.8 加样回收率试验

取同一批次的风寒湿灵散(批号:20140623)2.5 g,精密称定,分别精密加入欧前胡素对照品溶液(0.006 3 mg/ml)适量,按“2.2.3”项下方法配制供试品溶液,按上述色谱条件,测定其含量,计算回收率,结果见表1。结果表明本方法的回收率良好。

2.2.9 样品含量测定

取风寒湿灵散样品3批,按前文所述方法测定,计算欧前胡素的含量,测定结果见表2。

由于测定样品的批次有限,根据测定结果,暂定

表1 样品中欧前胡素的加样回收率试验结果

称样量 (m/g)	相当于 欧前胡素 (m/mg)	加入量 (m/mg)	实测量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
2.525 5	0.333 3	0.315 0	0.638 5	96.88	96.77	1.63
2.526 0	0.333 4	0.315 0	0.640 6	97.51		
2.537 1	0.334 9	0.315 0	0.640 9	97.14		
2.533 6	0.334 4	0.315 0	0.629 4	93.63		
2.532 0	0.334 2	0.315 0	0.642 1	97.74		
2.521 8	0.332 9	0.315 0	0.640 7	97.73		

表2 风寒湿灵散的含量测定结果($n=2$)

批号	欧前胡素 含量值 (mg/g)	每袋规格 (m/g)	欧前胡素 平均含量 (mg/袋)
20140623	0.132	100	13.2
20140707	0.125	100	12.5
20150318	0.141	100	14.1

本品每1 g含白芷以欧前胡素($C_{16}H_{14}O_4$)计,不得少于0.1 mg。

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

取风寒湿灵散样品5.0 g,分别精密加入乙醇、甲醇各50 ml,超声处理1 h,按照上述方法测定,结果以乙醇为提取溶剂的测定结果为0.128 mg/g,以甲醇为溶剂的结果为0.132 mg/g,提取较完全,故最终选择了甲醇为提取溶剂。

3.2 取样量的选择

分别取风寒湿灵散样品4.0、5.0、6.0 g,精密加入甲醇50 ml,超声处理1 h,按上述方法测定,结果欧前胡素的含量分别为0.123、0.132和0.119 mg/g。如果取样量小,杂质干扰较少但色谱峰响应值较低,而取样量大,杂质干扰较多,综合考虑之后笔者选择取样量为5 g。

3.3 提取时间的选择

分别取风寒湿灵散样品3份,各5.0 g,分别精密加入甲醇50 ml,按超声处理30 min、超声处理1 h、加热回流1 h 3种方法提取,测定含量并比较,结果欧前胡素的含量超声处理30 min比1 h的结果偏低,而回流提取又不如超声处理便捷,因此笔者采用了比较简便的超声(1 h)处理方法。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部,四部),2015年版[S].北京:化学工业出版社,2015:11,105,158,264,286,通则0502.
- [2] 彭春梅,赵英.高效液相色谱法测定清眩丸中欧前胡素含量[J].中国药业,2014,23(3):35-36.
- [3] 曹红,邢俊波,陈玉敏,等.都梁丸质量标准的研究[J].解放军药学报,2012,28(5):417-419.
- [4] 李思思,许凌,张铁军,等.HPLC法同时测定元胡止痛滴丸中6种成分[J].中草药,2015,46(21):3198-3201.

[收稿日期] 2017-11-28 [修回日期] 2018-01-09

[本文编辑] 李睿旻