

痹痛丸的质量控制研究

谢若男,杨满琴,王丽,徐玥玮,高晓明

(安徽中医药大学第二附属医院药学部,安徽 合肥 230061)

摘要:目的 建立痹痛丸的质量标准。方法 采用薄层色谱法(TLC)对痹痛丸中防风、蜜麻黄进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)对痹痛丸中的芍药苷进行含量测定。**结果** 采用 TLC 法均能检出防风、蜜麻黄中的特征斑点,分离度好;HPLC 法测出芍药苷在 $5.91 \sim 59.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与吸收峰面积值呈良好的线性关系($r = 0.9999$)。平均回收率为 98.13%,RSD = 1.01% ($n = 9$)。**结论** 建立的质量标准方法简便、重现性好,可用于痹痛丸的质量控制。

关键词:痹痛丸;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.04.014

Quality standard research of Bitong pill

XIE Ruonan, YANG Manqin, WANG Li, XU Yuewei, GAO Xiaoming

(The Second Hospital Affiliated to Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230061, China)

Abstract: Objective To establish a quality standard for Bitong pill. **Methods** Saposhnikovia Radix, Ephedrae Herba were identified by TLC. The content of Paeoniflorin was measured by HPLC. **Results** The special spot of Saposhnikovia Radix, Ephedrae Herba were identified by TLC and TLC has good separation. The linear range of Paeoniflorin was measured by HPLC within $5.91 \sim 59.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the average recovery was 98.13% and RSD 1.01% ($n = 9$). **Conclusions** The method is simple and reproducible, and can be used for the quality control of Bitong pill.

Key words: Bitong pill; Quality standard; TLC; HPLC

痹痛丸组方是安徽中医药大学第二附属医院风湿科名老中医在临床上长期应用安全有效的经验方。在原汤剂基础上,经过反复的工艺筛选和研究,并结合临床实际,研制而成的一种中药浓缩丸剂。该方由当归、炒白芍、防风、蜜麻黄、淫羊藿、羌活、豨莶草等中药组成,具有养血祛风,散寒通络,胜湿止痛的功效,用于治疗风湿性关节炎,强直性脊柱炎,增生性关节炎,颈、腰椎病,肩周炎,组织损伤等。为了有效地控制该制剂的生产质量,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)测定痹痛丸中芍药苷的含量;采用薄层色谱法(TLC)对该制剂中防风、蜜麻黄进行定性鉴别,方法简便、重现性好。现报道如下。

1 仪器、试药与样品

1.1 实验仪器 Thermo U3000 高效液相色谱仪(美国);梅特勒 AG285 电子分析天平(瑞士);梅特勒 xp56 型百万分之一电子天平(瑞士);K-300 型超声波清洗器(合肥金尼克机械制造有限公司)。

1.2 试药和样品 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品

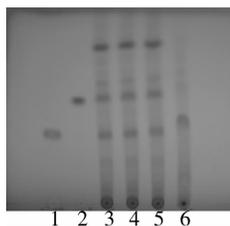
(批号:111523-201509)、芍药苷对照品(批号:110736-201438)、盐酸麻黄碱对照品(批号:171241-201508)、升麻素苷对照品(批号:111522-201511)均购自中国食品药品检定研究院,乙腈(色谱纯),水(重蒸水),其它试剂均为分析纯。痹痛丸(批号:150807、150901、151016)及其阴性样品由安徽中医药大学第二附属医院提供。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 防风的鉴别^[1] 取痹痛丸适量,研细,称取 5 g,加 100 mL 甲醇,超声 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 25 mL 溶解,滤过,滤液用乙醚提取 2 次,每次 20 mL,弃去乙醚液,水液用水饱和正丁醇提取 2 次,每次 25 mL,合并正丁醇液,用等量的氨试液洗涤 1 次,弃氨试液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解,定容至 2 mL,作为供试品溶液。精密称取 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品和升麻素苷对照品适量,分别加甲醇制成每 1 mL 含对照品 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。按供试品溶液的制法制成缺防风的阴性样品溶液。照薄层色谱法(2015 版《中国药典》四部中的通则 0502)试验^[2],将上述三种溶液分别精密吸取 10 ~ 20 μL ,再分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以甲醇-

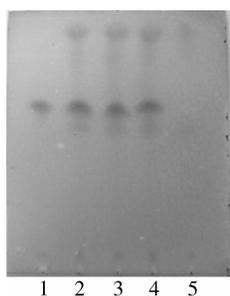
氯仿(1:4)为展开剂,置于展开缸内,饱和 10 min,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品和升麻素苷对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性样品无干扰。结果见图 1。



注:1. 升麻素对照品;2. 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品;3~5. 三批供试品;6. 阴性供试品。

图 1 防风 TLC 图谱

2.1.2 蜜麻黄的鉴别^[3-4] 取痹痛丸适量,研细,称取 5 g,加浓氨水 1 mL,再加三氯甲烷 50 mL,回流提取 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇溶解,定容至 2 mL,作为供试品溶液。精密称取盐酸麻黄碱对照品适量加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的盐酸麻黄碱对照品溶液。按供试品溶液的制法制成缺蜜麻黄的阴性样品溶液。照薄层色谱法(2015 版《中国药典》四部中的通则 0502)试验,精密吸取上述三种溶液各 5 μ L,再分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲醇-浓氨水-氯仿(5:0.5:20)为展开剂,置于展开缸内,饱和 10 min,展开,取出,晾干,喷茚三酮试液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰。发现供试品色谱中,在与蜜麻黄对照品色谱相应位置上,显相同颜色的斑点。阴性样品无干扰。结果见图 2。



注:1. 盐酸麻黄碱对照品;2~4. 三批供试品;5. 阴性供试品。

图 2 蜜麻黄 TLC 图谱

2.2 芍药苷的含量测定^[5-6]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shimpack ODS C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);检测波长:230 nm;流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89);柱温:30 $^{\circ}$ C;最低检测限:1 ng;理论板数按芍药苷计算应不低于 2 000。

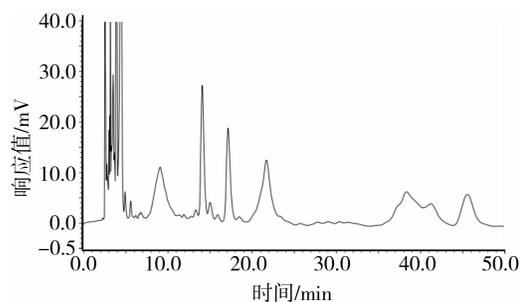
2.2.2 供试品溶液的制备 取痹痛丸适量,研细,取粉末 2 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精

密加入 50 mL 的 70% 甲醇溶液,密塞摇匀,称重,加热回流 30 min,放冷,再称重,加 70% 甲醇溶液补充减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液 25 mL,过中性氧化铝柱(用 70% 甲醇湿法装柱,100~200 目,3 g,内径 1.0 cm),用 25 mL 的 70% 甲醇洗脱,收集洗脱液,至水浴上蒸干,残渣加 70% 甲醇 10 mL 使溶解,定容至刻度,摇匀,即得。

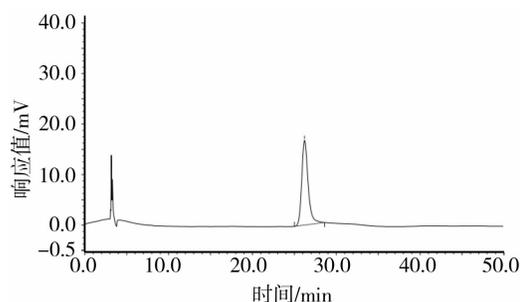
2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 59.1 μ g 的溶液,即得。

2.2.4 阴性供试品溶液的制备 按痹痛丸处方及制法制成缺炒白芍的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性供试品溶液。

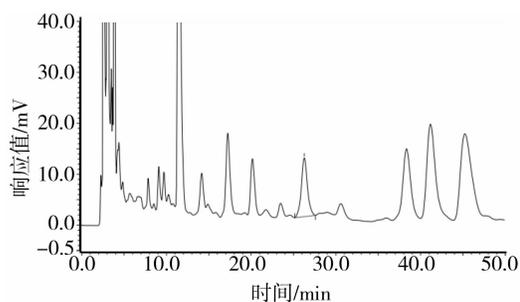
2.2.5 专属性试验 按照以上色谱条件,精密吸取上述三种溶液,分别注入液相色谱仪中测定。发现供试品色谱中在与对照品色谱相应位置上有色谱峰,而阴性对照色谱中在与对照品色谱相应位置上未出现色谱峰,说明在该 HPLC 测定条件下,芍药苷的测定无明显干扰。结果见图 3。



A. 阴性供试品



B. 芍药苷对照品



C. 供试品

图 3 HPLC 色谱图

2.2.6 线性关系考察 精密吸取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 的芍药苷对照品溶液 ($59.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释定容至刻度, 制得浓度分别为 5.91、11.82、23.64、35.46、47.28、59.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 精密吸取上述溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪中, 按“2.2.1”项进行测定。以芍药苷浓度为横坐标 X 、以峰面积为纵坐标 Y 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.2614X-0.1390$, $r=0.9999$ ($n=6$), 表明芍药苷在 5.91 ~ 59.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内有良好的线性关系。结果见表 1。

表 1 芍药苷标准曲线测定结果

序号	1	2	3	4	5	6
芍药苷浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	5.91	11.82	23.64	35.46	47.28	59.1
峰面积积分值	1.422	2.919 2	6.05	9.105 9	12.306 4	15.262 2

2.2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL , 按 2.2.1 项下方法重复进样 6 次, 测得峰面积分别为 9.332、8.996、9.162、9.342、9.219、9.227, 经统计学处理后 RSD 为 1.38%。表明本方法精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一批供试品溶液, 立即进样与分别在第 2、4、6、8、10 h 进样, 按“2.2.1”项下方法测得峰面积 RSD 为 0.83%, 表明供试品中芍药苷在 10 h 内稳定。

2.2.9 重现性试验 取同一批样品 6 份, 按含量测定项下的方法制备并测定其芍药苷的含量, 结果芍药苷平均含量为 $0.3452 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.59%, 表明本法重现性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的供试品 ($0.3452 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 9 份, 再分别精密加入适量的芍药苷对照品, 按含量测定项下的方法制备供试品溶液并测定, 结果见表 2。平均回收率 98.13%, RSD 为 1.01%。

表 2 加样回收率试验结果

序号	取样量/g	已知量/mg	加入量/g	测得量/mg	回收率/%
1	1.042 3	0.3598	0.29 8	0.652 2	98.10
2	1.036 6	0.3578	0.29 8	0.645 0	96.37
3	1.021 2	0.3525	0.29 8	0.642 9	97.43
4	0.982 4	0.3391	0.36 7	0.697 9	97.76
5	1.095 5	0.3782	0.36 7	0.742 7	99.33
6	1.107 3	0.382 3	0.36 7	0.745 2	98.91
7	1.104 5	0.381 3	0.43 7	0.815 7	99.40
8	1.033 2	0.356 7	0.43 7	0.786 7	98.40
9	1.064 7	0.367 6	0.43 7	0.793 7	97.51

2.2.11 样品的测定 取三批样品, 依法测定芍药苷含量, 结果见表 3。

表 3 三批样品含量测定

批号	芍药苷含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
	X_1	X_2	\bar{X}
150807	0.338 6	0.327 7	0.333 2
150901	0.326 2	0.325 5	0.325 9
151016	0.326 3	0.325 0	0.325 6

3 讨论

痹痛丸为中药复方制剂, 采用 TLC 法对方中防风、蜜麻黄进行了定性鉴别, 结果表明此方法准确, 简便, 专属性强, 阴性无干扰。同时我们对处方中其他药味也进行了鉴别研究, 发现淫羊藿和豨莶草的供试品色谱中未能出现与对照品色谱相应的斑点, 羌活的供试品色谱上相应位置虽有与对照品色谱上相同的蓝色荧光斑点, 但背景干扰大, 故均未能收载^[7-10]。在含量测定中, 方中君药当归的有效成分阿魏酸由于其含量极低且不稳定, 不易对其进行质量控制, 因此未采用阿魏酸作为定量指标成分。炒白芍为方中臣药, 其主要成分为芍药苷, 且有采用高效液相色谱法测定芍药苷含量的报道^[11], 故选择芍药苷为定量指标成分。在参考文献的基础上, 本文建立了芍药苷的 HPLC 法, 结果表明本法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可作为痹痛丸的质量标准, 较好的控制该制剂的质量。

参考文献

- [1] 张晓杭, 袁乐, 李媛媛, 等. 真元颗粒质量标准研究[J]. 中药材, 2014, 37(8): 1478-1481.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典(四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 337.
- [3] 白林, 任伟, 陈利平. 舒郁胶囊中麻黄碱的鉴别与含量测定研究[J]. 中国药物应用与监测, 2011, 8(4): 211-213.
- [4] 韩桂茹, 张文臣, 安丽娜, 等. 金麻杏止咳片快速薄层色谱鉴别与 3 成分同时定量测定研究[J]. 中国药业, 2012, 21(14): 41-43.
- [5] 谭菁菁, 范艳华, 任天舒, 等. 中药白芍的高效液相色谱指纹图谱及其主要成分含量测定[J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(2): 238-243.
- [6] 张颖, 崔文, 亢泽峰. 目舒丸质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 67-70.
- [7] 李彩东, 张伟, 王信. 参芪心舒胶囊中 6 种药物的薄层鉴别[J]. 中国现代中药, 2013, 15(10): 891-894.
- [8] 黄有带, 熊艺花, 景运条, 等. 柴葛退热颗粒的薄层鉴别[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(6): 738-739.
- [9] 黄智龙, 李玲, 袁永俊, 等. 黄栀护肝片的薄层色谱鉴别及含量测定研究[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2012, 31(2): 84-87.
- [10] 王术平, 张淑香, 张彦文, 等. 舒乐冲剂中豨莶草的定性鉴别[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(5): 188.
- [11] 曾理, 龚娟. 高效液相色谱法同时测定阿归养血颗粒中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(7): 178-180.

(收稿日期: 2016-10-20, 修回日期: 2016-12-06)