

沈阳红药气雾剂的质量标准

李 乔¹, 肖 斌¹, 张春玲², 潘 理², 邵 平¹, 殷 军^{1*}

1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳红药制药有限公司, 辽宁 沈阳 110044

摘要: **目的** 制定沈阳红药气雾剂的质量控制标准。**方法** 采用薄层色谱法对制剂中的三七、当归、川芎、白芷、冰片、薄荷脑进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定制剂中人参皂苷 Rg_1 。色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液 (20:80); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm。**结果** 三七、当归、川芎、白芷、冰片、薄荷脑薄层色谱斑点清晰, 重现性好, 无干扰; 人参皂苷 Rg_1 在 0.05~0.50 mg 线性关系良好, 平均回收率为 100.6%, RSD 为 1.07% ($n=6$)。**结论** 所建立的定性和定量方法结果准确、可靠、重现性好, 可用于沈阳红药气雾剂的质量控制。

关键词: 沈阳红药气雾剂; 薄层色谱; 三七; 白芷; 人参皂苷 Rg_1 ; 高效液相色谱

中图分类号: R282.71

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2011)04-0302-05

Quality standard of Shenyang Hongyao Aerosol

LI Qiao¹, XIAO Bin¹, ZHANG Chun-ling², PAN Li², SHAO Ping¹, YIN Jun¹

1. College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Shenyang Hongyao Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110044, China

Abstract: **Objective** To establish the quality standard of Shenyang Hongyao Aerosol. **Methods** TLC was applied to identifying *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Angelicae Sinensis Radix*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Angelicae Dahuricae Radix*, *Borneolum Syntheticum*, and *Menthae Haplocalycis Herba*. HPLC was applied to determining the content of ginsenoside Rg_1 in the prescription. Diamonsil C_{18} column (200 mm×4.6 mm, 5 μ m) was used, the mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% phosphoric acid (20:80) solution, and the flow rate was 1.0 mL/min with detection wavelength at 203 nm. **Results** The spots on TLC plates of above mentioned six material medica were clear with good reproducibility and without interference in the blank reference. The linearity range of ginsenoside Rg_1 was 0.05—0.50 mg, the average recovery rate was 100.6%, and RSD was 1.07% ($n=6$). **Conclusion** The established method is accurate, feasible, and reproducible. It can be used for the quality control for Shenyang Hongyao Aerosol.

Key words: Shenyang Hongyao Aerosol; TLC; *Notoginseng Radix et Rhizoma*; *Angelicae Dahuricae Radix*; ginsenoside Rg_1 ; HPLC

沈阳红药气雾剂具有止痛、活血、生新的功效。原处方使用抛射剂氟里昂和透皮吸收促进剂二甲基亚砜, 由于 2005 年国家食品药品监督管理局要求用其他抛射剂替代气雾剂药品中的氟里昂, 同时由于二甲基亚砜对人体有强烈的刺激性, 因此新处方中将抛射剂更换为四氟乙烷, 不再采用二甲基亚砜作为透皮吸收促进剂。针对原处方标准存在的薄层色谱定性分析方法重现性差等问题, 为了控制处方变更后的沈阳红药气雾剂的质量, 本实验在原质量标准的基础上对其质量标准进行了修正, 采用薄层色谱 (TLC) 法对沈阳红药气雾剂中的三七、当归、川芎、白芷、冰片、薄荷脑进行了定性鉴别, 采用

高效液相色谱 (HPLC) 法测定其中人参皂苷 Rg_1 的量, 对保证临床用药的有效性和安全性具有一定的意义。

1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪, LC—10ATvp 溶剂输送泵, SPD—10Avp 紫外-可见检测器, N-2000 色谱工作站 (浙江大学智达有限公司), ALC—110—4 型电子天平。

乙腈为色谱纯 (山东禹王实业有限公司禹城化工厂), 水为超纯水 (自制), 其他试剂均为分析纯。人参皂苷 Rg_1 对照品和三七、冰片、薄荷脑、当归、川芎、白芷对照药材分别购于中国药品生物制品检

收稿日期: 2011-04-27

作者简介: 李 乔 (1986—), 男, 生药学硕士, 研究方向为中药复方质量标准的研究。Tel: (024)23986491

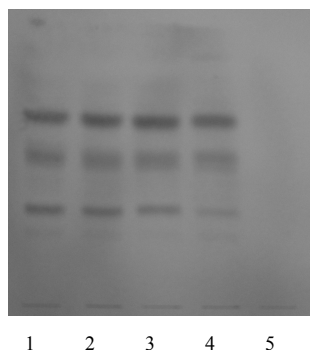
*通讯作者 殷 军 E-mail: yinjun826@sina.com

定所,批号分别为110703-200726、110743-200504、0728-200005、120941-200807、120927-200512、120918-200809、120945-200707。沈阳红药气雾剂,批号100301、100302、100303,每瓶100 mL,由沈阳精诚药业有限公司提供,实验中所用各阴性样品均由沈阳红药制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 三七的 TLC 鉴别

取沈阳红药气雾剂1瓶,在瓶盖上扎1小孔,插入连有橡皮管的注射针头(勿与药液面接触),橡皮管的另一头放入水中,待抛射剂缓缓排除后,除去瓶盖。取药液20 mL,加水20 mL,静置10 min,除去不溶物质,剩余药液减压蒸干乙醇,滤过,滤液用乙醚提取2次,每次20 mL,弃去乙醚液。水液用水饱和的正丁醇提取3次,每次20 mL,合并正丁醇提取液,用正丁醇饱和的水洗涤3次,每次60 mL,弃去水层,正丁醇减压蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,作为供试品溶液。另取三七对照药材1 g,加90%乙醇20 mL回流提取1 h,同供试品溶液的制备方法制成三七对照药材溶液。另按处方比例取缺三七的阴性样品,同法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VIB)试验,吸取上述3种溶液各5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-水(65:35:10)10 $^{\circ}$ C放置的下层为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点清晰。结果供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色斑点,阴性样品无干扰。见图1。



1~3-沈阳红药气雾剂 4-三七对照药材 5-阴性样品

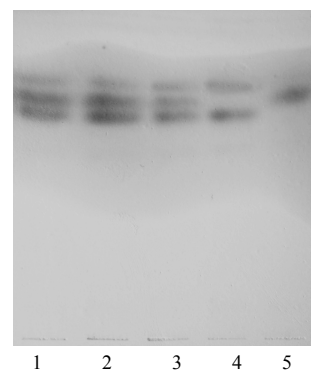
1—3- Shenyang Hongyao Aerosol 4- Notoginseng Radix et Rhizoma reference drug 5-negative sample

图1 沈阳红药气雾剂中三七的 TLC 图

Fig. 1 TLC chromatograms of *Notoginseng Radix et Rhizoma* in Shenyang Hongyao Aerosol

2.2 冰片的 TLC 鉴别

取沈阳红药气雾剂1瓶,在瓶盖上扎1小孔,插入连有橡皮管的注射针头(勿与药液面接触),橡皮管的另一头放入水中,待抛射剂缓缓排除后,除去瓶盖。取药液2 mL,加石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)5 mL提取,取石油醚层作为供试品溶液^[1]。另取冰片对照品,加石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)制成2.5 mg/mL对照品溶液。另按处方比例取缺冰片的阴性样品,同法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VIB)试验,吸取上述溶液各5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G薄层板上,以环己烷-二氯甲烷-醋酸乙酯(9:1:2)为展开剂^[2],展开,取出,晾干,按上述展开条件进行二次展开,取出,晾干,喷以10%香草醛硫酸溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点清晰。结果供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。见图2。



1~3-沈阳红药气雾剂 4-冰片对照药材 5-阴性样品

1—3- Shenyang Hongyao Aerosol 4- Borneolum Syntheticum reference drug 5-negative sample

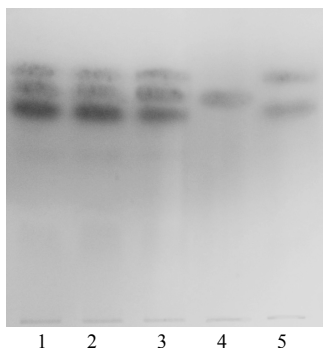
图2 沈阳红药气雾剂中冰片的 TLC 图

Fig. 2 TLC chromatogram of *Borneolum Syntheticum* in Shenyang Hongyao Aerosol

2.3 薄荷脑的 TLC 鉴别

取沈阳红药气雾剂1瓶,在瓶盖上扎1小孔,插入连有橡皮管的注射针头(勿与药液面接触),橡皮管的另一头放入水中,待抛射剂缓缓排除后,除去瓶盖。取药液2 mL,加石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)5 mL提取,取石油醚层作为供试品溶液^[3]。另取薄荷脑对照品,加石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)制成2.5 mg/mL对照品溶液。另按处方比例取缺薄荷脑的阴性样品,同法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010年版一部附录VIB)试验,吸取上述溶液各5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅

胶 G 薄层板上, 以环己烷 - 二氯甲烷 - 醋酸乙酯 (9:1:2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 按上述展开条件进行二次展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 香草醛硫酸溶液, 在 105 °C 加热至斑点清晰。结果供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。见图 3。



1~3-沈阳红药气雾剂 4-薄荷脑对照药材 5-阴性样品
1—3-Shenyang Hongyao Aerosol 4-Borneolum Syntheticum reference drug 5-negative sample

图 3 沈阳红药气雾剂中薄荷脑的 TLC 图

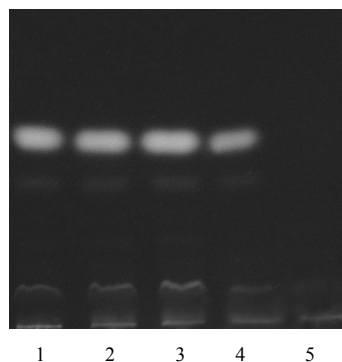
Fig. 3 TLC chromatograms of *Menthae Haplocalycis Herba* in Shenyang Hongyao Aerosol

2.4 当归、川芎的 TLC 鉴别^[4]

取沈阳红药气雾剂 1 瓶, 在瓶盖上扎 1 小孔, 插入连有橡皮管的注射针头 (勿与药液面接触), 橡皮管的另一头放入水中, 待抛射剂缓缓排除后, 除去瓶盖。取药液 20 mL, 加水 20 mL, 静置 10 min, 除去不溶物质, 剩余药液减压蒸干乙醇, 滤过, 滤液用 20 mL 乙醚提取 1 次, 取乙醚液常温挥至 2 mL, 作为供试品溶液。另取当归和川芎对照药材各 0.5 g, 加乙醚 10 mL 水浴回流提取 1 h, 抽滤, 滤液常温挥至 2 mL, 作为对照药材溶液。再按处方比例取缺当归和川芎的阴性样品, 同法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述 3 种溶液各 2.5 μL 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (30~60 °C) - 乙醚 (5:0.7) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯 (365 nm) 下检视。结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的蓝色荧光斑点, 阴性对照没有干扰。见图 4。

2.5 白芷的 TLC 鉴别

取沈阳红药气雾剂 1 瓶, 在瓶盖上扎 1 小孔, 插入连有橡皮管的注射针头 (勿与药液面接触), 橡皮管的另一头放入水中, 待抛射剂缓缓排除后, 除去瓶盖。取药液 20 mL, 加水 20 mL, 静置 10 min,

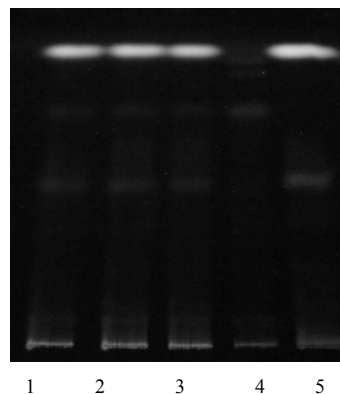


1~3-沈阳红药气雾剂 4-当归、川芎对照药材 5-阴性样品
1—3-Shenyang Hongyao Aerosol 4- *Angelicae Sinensis Radix* and *Chuanxiong Rhizoma* reference drug 5-negative sample

图 4 沈阳红药气雾剂中当归、川芎的 TLC 图

Fig. 4 TLC chromatograms of *Angelicae Sinensis Radix*, and *Chuanxiong Rhizoma* in Shenyang Hongyao Aerosol

除去不溶物质, 剩余药液减压蒸干乙醇, 滤过, 滤液用乙醚提取 2 次, 每次 20 mL, 取乙醚液常温挥至 2 mL, 作为供试品溶液。另取白芷对照药材 2 g, 加乙醚 15 mL 超声提取 30 min, 滤过, 滤液常温挥至 2 mL, 作为对照药材溶液^[1]。按处方比例取缺白芷的阴性样品, 同法制备阴性样品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μL, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (30~60 °C) - 乙醚 (1:2) 为展开剂^[5-7], 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯 (365 nm) 下观察。结果供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照没有干扰。见图 5。



1~3-沈阳红药气雾剂 4-阴性样品 5-白芷对照药材
1—3-Shenyang Hongyao Aerosol 4- negative sample
5- *Angelicae Dahuricae Radix* reference drug

图 5 沈阳红药气雾剂中白芷的 TLC 图

Fig. 5 TLC chromatograms of *Angelicae Dahuricae Radix* in Shenyang Hongyao Aerosol

2.6 人参皂苷 Rg_1 的 HPLC 法测定

2.6.1 色谱条件^[4] Diamonsil C_{18} 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液 (20:80); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm。

2.6.2 对照品溶液的制备 取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥 24 h 的人参皂苷 Rg_1 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 0.3 mg/mL 的溶液, 即得。

2.6.3 供试品溶液的制备 精密吸取沈阳红药气雾剂药液 2.5 mL, 加水 10 mL 溶解, 用水饱和的正丁醇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并提取液, 再用正丁醇饱和的水洗 3 次, 每次 45 mL, 弃去水层, 正丁醇层减压蒸干, 用甲醇溶解并加至 10 mL, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.6.4 阴性对照溶液的制备 按本制剂处方配比及制法, 制成缺少三七的阴性样品, 按供试品溶液的制备项下方法制成阴性样品溶液。

2.6.5 专属性试验 分别精密吸取人参皂苷 Rg_1 对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 测定。供试品溶液色谱中, 在与人参皂苷 Rg_1 对照品相应的保留时间有吸收峰, 而阴性样品溶液则在相应的保留时间无吸收峰出现, 说明阴性对照无干扰。见图 6。

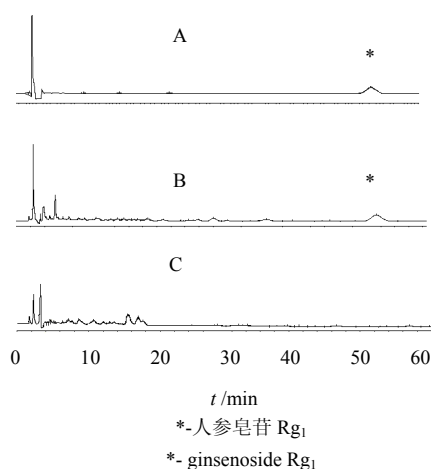


图 6 人参皂苷 Rg_1 对照品 (A)、沈阳红药气雾剂 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC chromatograms of ginsenoside Rg_1 reference substance (A), Shenyang Hongyao Aerosol (B), and negative sample (C)

2.6.6 线性关系考察 精密称取人参皂苷 Rg_1 对照品 4.20 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照储备液。将此储备液逐级稀释至质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.30、

0.40、0.50 mg/mL 的溶液, 摇匀, 分别进样 10 μ L, 测定峰面积。以人参皂苷 Rg_1 质量浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=2\,554\,131\,X-1\,072$, $r=0.999\,9$, 结果表明人参皂苷 Rg_1 在 0.05~0.50 mg/mL 与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.6.7 精密度试验 精密吸取同一 0.3 mg/mL 人参皂苷 Rg_1 对照品溶液, 重复进样 6 次, 测定人参皂苷 Rg_1 峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 1.48%。

2.6.8 重现性试验 取沈阳红药气雾剂 (批号为 100301), 平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 结果人参皂苷 Rg_1 的平均质量浓度为 1.34 mg/mL, RSD 为 1.42%。

2.6.9 稳定性试验 取沈阳红药气雾剂 (批号为 100301) 供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、6、12、24 h 进样 10 μ L, 分别测定人参皂苷 Rg_1 的峰面积积分值, 结果 RSD 为 1.06%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.6.10 加样回收试验 取沈阳红药气雾剂 (批号 100301) 6 份, 每份精密吸取 1.25 mL, 分别加入人参皂苷 Rg_1 对照品 1.5 mg, 制备供试品溶液, 进行测定, 计算人参皂苷 Rg_1 的平均回收率为 100.6%, RSD 为 1.07%。

2.6.11 样品测定 取沈阳红药气雾剂 3 批, 制备供试品溶液, 进样测定, 采用外标法计算样品中人参皂苷 Rg_1 的质量浓度, 结果见表 1。根据国家药典委员会关于《国家药品标准中药制剂质量标准编写细则》, 以测定下限来限量人参皂苷 Rg_1 , 规定沈阳红药气雾剂以人参皂苷 Rg_1 计不得低于 0.97 mg/mL。

表 1 沈阳红药气雾剂中人参皂苷 Rg_1 的测定结果 ($n=4$)
Table 1 Determination of ginsenoside Rg_1 in Shenyang Hongyao Aerosol ($n=4$)

批 号	人参皂苷 Rg_1 / (mg·mL ⁻¹)
100301	1.26
100302	1.23
100303	1.22

3 讨论

因沈阳红药气雾剂的处方发生了变更, 本研究首先按其原质量标准对其 TLC 鉴别和人参皂苷 Rg_1 的测定进行了重复。发现三七的 TLC 鉴别中的斑点不清晰, 重现性差; 冰片和薄荷脑的 TLC 鉴别的斑点分离度差; 当归和川芎的薄层色谱鉴别斑点不清

晰;白芷的 TLC 鉴别重现性差。而人参皂苷 R_{g1} 的测定方法重现性良好。因此本研究对其质量标准中的 TLC 鉴别方法进行了重新制定,同时,由于处方的变化导致了人参皂苷 R_{g1} 的量发生了改变,因此对人参皂苷 R_{g1} 的限量范围进行了重新的制定。

沈阳红药气雾剂中含有增稠剂乙基纤维素,而乙基纤维素不溶于水,在制备供试品溶液时,如不除去乙基纤维素,得到的样品溶液会很黏稠,增加了点样的难度,而且展开后斑点不清晰,成点性差,因此制备样品溶液时,在减压蒸干乙醇之前向药液中加入水,这样就可以使乙基纤维素充分析出,不会影响最后的薄层色谱效果。

由于当归、川芎中的挥发油成分非常相似,很难通过 TLC 鉴别的方法进行区分,参考《中国药典》2010 年版一部中当归、川芎药材的 TLC 鉴别,同时对当归、川芎进行了 TLC 鉴别。

三七中主要成分为皂苷类化合物,曾按照《中国药典》2010 年版一部三七项下方法对 3 种三七皂苷进行测定,但经过反复提取处理后发现,阴性对照存在干扰,考虑到已经对三七进行了 TLC 定性鉴别,只对其中一个成分进行测定也能很好地控制其

质量。由于制剂中人参皂苷 R_{g1} 的量较大、阴性无干扰,因而采用 HPLC 法测定了人参皂苷 R_{g1} 的量。

人参皂苷 R_{g1} 测定时选择甲醇-水、乙腈-0.5%磷酸水溶液作为流动相进行考察,结果表明以乙腈-0.5%磷酸水溶液作为流动相的分离效果好。进一步考察了不同比例,结果乙腈-0.5%磷酸水溶液(20:80),体积流量为 1.0 mL/min,可以使人参皂苷 R_{g1} 有较好的分离度,峰形良好。

参考文献

[1] 张春玲,周晓琳,郑霞.红药气雾剂质量标准的研究[J].实用中医内科杂志,2010,24(5):25-26.
[2] 吕武清,龙新华.中成药中的药材薄层色谱鉴别[M].北京:人民卫生出版社,1997:36,255.
[3] 王锦红,洪宇农.愈伤灵胶囊的薄层鉴别研究[J].药物鉴定,2009,18(22):39-40.
[4] 中国药典[S].一部.2010:97,406,427,433,840.
[5] 谭云秀,程静.薄层色谱法鉴别小儿平喘合剂中前胡、白芷与当归[J].中国民族民间医药,2008,17(11):12-13.
[6] 霍霞,李承金.沈阳红药主要成分的鉴别[J].中国药业,2002,11(11):32-33.
[7] 戚宝婵,李红.沈阳红药质量标准的研究[J].中成药,2001,23(4):250-252.

2011 年 6 月 1 日—6 月 20 日 FDA 批准的新药

药品名称	活性成分	适应症	C*/R*	研发公司	批准日期
Rezira	hydrocodone; pseudoephedrine	咳嗽、鼻塞等感冒相关症状	4/S	Cypress Pharm	2011-06-08
Docetaxel	docetaxel	乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌	5/S	Accord Hlthcare Inc	2011-06-08
Zutripro	hydrocodone; chlorpheniramine; pseudoephedrine	咳嗽、鼻塞等感冒相关症状	4/S	Cypress Pharm	2011-06-09
Potiga	ezogabine	辅助治疗癫痫部分性发作	1/S	Valeant Pharma	2011-06-10
Suprenza	phentermine hydrochloride	减肥	3/S	Citius Pharma	2011-06-13
Nulojix	belatacept	移植后淋巴增殖性疾病(PTLD)		Bristol Myers Squibb	2011-06-15

C*为 NDA 化学类别(1-新分子实体;3-新剂型;4-新复方;5-新生产商);R*为审评类型:S-标准审评药;P-优先审评药