

寒热痹胶囊质量标准研究

金凤环¹, 段彦杰²

(1. 本溪市化学工业学校, 辽宁本溪 117000; 2. 解放军总医院第二附属医院国际肿瘤治疗中心, 北京 100091)

[摘要] 目的: 建立寒热痹胶囊的质量标准。方法: 采用薄层色谱法, 对寒热痹胶囊中知母、干姜、甘草进行薄层定性鉴别。采用高效液相色谱法对其中的芍药苷进行含量测定, 采用 Dikma Diamonsil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (14:86); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm。结果: 在薄层色谱中可检出知母、干姜、甘草的特征斑点。芍药苷在 0.112 4~1.124 0 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$), 平均回收率为 101.20%, $RSD=1.71\%$ ($n=6$)。结论: 本方法简便、准确、重现性好, 可用于寒热痹胶囊的质量控制。

[关键词] 寒热痹胶囊; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 芍药苷; 含量测定

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2009)10(b)-048-03

Quality standard for Hanrebi Capsule

JIN Fenghuan¹, DUAN Yanjie²

(1. Benxi Chemical Industry School, Benxi 117000, China; 2. Beijing International Cancer Center, the Second Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quality standard of Hanrebi Capsule. **Methods:** TLC identifications of Rhizoma Anemarrhenae, Rhizoma Zingiberis and Radix Glycyrrhizae in Hanrebi Granules were carried out. The content of Paeoniflorin was determined by HPLC. The Dikma Diamonsil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used. The mobile phases consisted of acetonitrile-0.1% and phosphoric acid solution (14:86), the flow rate was 1.0 ml/min and the detection wavelength was at 230 nm. **Results:** The characteristic spots of Rhizoma Anemarrhenae, Rhizoma Zingiberis and Radix Glycyrrhizae can be identified by TLC. The linear ranges of paeoniflorin was at 0.112 4~1.124 0 μg ($r=0.999\ 9$), the average recovery was 101.20% with a RSD of 1.71% ($n=6$). **Conclusion:** The method is fast, reliable, accurate and can be used in the quality control of Hanrebi Capsule.

[Key words] Hanrebi Capsule; TLC; HPLC; Paeoniflorin; Content determination

寒热痹胶囊是由桂枝、防风、白芍、知母、炙附子、干姜等 10 种中药材组成, 主治中医风湿病中的寒热错杂证, 寒热痹胶囊具有散寒清热, 和营定痛的功效, 对表现为寒热错杂证候疾病有一定的治疗作用, 无明显不良反应, 是一种治疗风湿病的安全有效的药物。为更好地控制本品质量, 对本品质量标准进行了研究, 增加了知母、干姜、甘草的薄层鉴别和白芍中芍药苷的含量测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (包括 G1379A 在线脱气机、G1313A 自动进样器、G1311A 四元梯度泵、G1316A 柱温箱、G1314A 紫外检测器); UV-2401 型紫外分光光度计; 恒温水浴锅; PW 型超纯水制备器; KQ5200 型超声波清洗器 (昆山超声波设备厂)。

1.2 试剂

寒热痹胶囊 (批号: 20060501, 20060502, 20060503, 辽宁好护士集团本溪制药有限公司); 甘草次酸对照品 (批号: 723-9304, 中国药品生物制品检定所); 干姜对照药材 (批号: 120942-200505, 中国药品生物制品检定所); 知母对照药材 (批号: 121070-200002, 中国药品生物制品检定所); 芍药苷

对照品 (批号: 110736-200526, 中国药品生物制品检定所, 供含量测定用); 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 甘草的鉴别 取本品内容物 5 g, 研细, 置具塞锥形瓶中, 加乙醇溶液 40 ml 与盐酸 2 ml, 置水浴上回流 40 min, 放冷, 滤过, 滤液浓缩至约 10 ml, 加水 10 ml, 搅匀, 转移至分液漏斗中, 用石油醚 (60~90℃) 提取 2 次, 每次 20 ml, 分取石油醚层, 蒸干, 加甲醇溶液 1 ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取甘草次酸对照品, 加无水乙醇制成每毫升含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2005 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取对照品溶液 5 μl, 供试品溶液 15 μl, 分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上, 以石油醚 (60~90℃)-甲苯-乙酸乙酯-冰乙酸 (10:15:10:0.5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯 (254 nm) 下检视。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。

2.1.2 知母的鉴别 取本品内容物 4 g, 研细, 置具塞锥形瓶中, 加水 40 ml, 盐酸 4 ml, 置水浴上回流 1 h, 放冷, 加三氯甲烷 40 ml, 加热回流 30 min, 放冷, 分取三氯甲烷液, 置水浴上

蒸干,残渣加三氯甲烷 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取知母对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述两种溶液各 10 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-丙酮(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5%香草醛硫酸乙醇液(1 $\rightarrow$ 10),加热至斑点显色清晰。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。

2.1.3 干姜的鉴别 取本品内容物 4 g, 研细, 置具塞锥形瓶中,加乙醚 40 ml,加热回流 1 h,放冷,过滤,滤液自然挥干,残渣加乙酸乙酯 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取干姜对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述两种溶液各 10 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(85:15)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10%硫酸乙醇液,加热至斑点显色清晰。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。

2.2 含量测定

2.2.1 检测波长的选择 用甲醇溶液作为空白对照,对芍药苷对照品甲醇溶液进行全波段扫描(200~400 nm),结果芍药苷在 230 nm 处有最大吸收,供试品中无干扰组分,而且供试品中待测组分与相邻组分分离度良好,因此选用 230 nm 为芍药苷的检测波长。

2.2.2 系统适用性试验 色谱柱最低理论塔板数试验中,笔者采用不同品牌的色谱柱,按上述条件实验,结果在此条件下,供试品溶液中芍药苷与其他组分分离度良好,其保留时间(t_R)、理论塔板数(n)、分离度(R)见表 1。根据测定结果,理论塔板数按芍药苷峰计算不得低于 8 000。本实验采用色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m)。

表 1 不同色谱柱的系统适用性试验

Tab.1 The test of system applicability with different column			
色谱柱	保留时间(min)	理论塔板数	分离度
Dikma Diamonsil C ₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m)	18.654	8 350	4.12
Gls Intertsil ODS-3C ₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m)	18.313	8 926	1.75

2.2.3 对照品溶液的制备 取芍药苷对照品 15.00 mg,精密称定,置 100 ml 量瓶中,加甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 10 ml 置 25 ml 量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即为对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液制备 取本品(批号:20060501)内容物,混匀,研细,取 0.3 g,精密称定,置 50 ml 量瓶中,加乙醇溶液 35 ml,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)20 min,放置至室温,加乙醇溶液至刻度,摇匀,用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.5 阴性干扰实验 按处方工艺方法制备缺白芍的阴性样品,并按“2.2.4”项下方法制成阴性对照溶液。精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μ l,分别注入液相

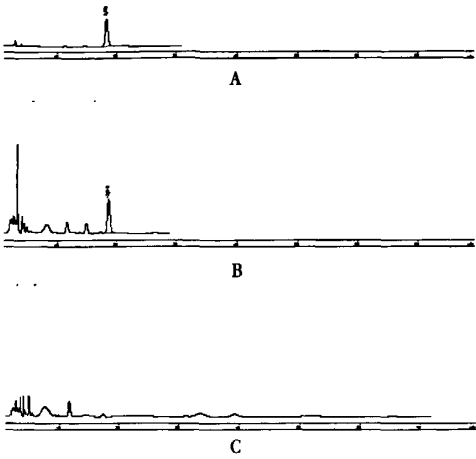


图 1 HPLC 色谱图
(A.对照品;B.供试品;C.阴性对照)

Fig.1 HPLC chromatography

(A.Reference substance; B.Sample; C.Negative control)

色谱仪。见图 1。可见,在与对照品色谱峰相应的位置上,供试品溶液具有相同保留时间的色谱峰,而阴性液在此峰处无干扰。

2.2.6 线性范围考察 取芍药苷对照品 14.05 mg,精密称定,置 100 ml 量瓶中,加甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 10 ml 置 25 ml 量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,制成每毫升含芍药苷 56.2 μ g 的对照品溶液。分别精密吸取芍药苷对照品溶液 2、5、10、15、20 μ l 注入高效液相色谱仪,测定色谱峰面积,以对照品进样量(μ g)为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,计算回归方程,结果表明芍药苷进样量在 0.112 4~1.124 0 μ g 范围内,呈良好的线性关系。回归方程为 $Y=1\,372.5X+19.239(r=0.999\,9)$ 。

2.2.7 精密度试验 精密吸取“2.2.4”项下供试品溶液 10 μ l,重复进样 6 次,按上述色谱条件测定峰面积,测定色谱峰峰面积,RSD 为 1.0%,结果表明本法精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.4”项下供试品溶液,分别于放置 0、4、8、12、16、24 h 后,注入液相色谱仪,测定色谱峰面积,RSD 为 1.22%,结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批样品(批号:20060501),按“2.2.4”项下方法制备 5 份供试品,分别测定色谱峰面积,RSD 为 1.54%($n=5$)。结果表明本法重复性良好。

2.2.10 回收率实验 取已知芍药苷含量(9.62 mg/g)的本品(批号:20060501)内容物 6 份,分别研细,各取粉末约 0.15 g,精密称定,分别置 50 ml 量瓶中,加稀乙醇溶液 35 ml,分别精密加入 0.140 5 mg/ml 的芍药苷对照品溶液 10 ml,密塞,分别超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)20 min,放置至室温,加稀乙醇溶液至刻度,摇匀,用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液,结果见表 2。

2.2.11 样品含量测定 取 3 批样品,按“2.2.4”项下方法制备样

表 2 回收率试验结果 (n=6)

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

称样量 (g)	芍药苷 量 (mg)	加入量 (mg)	测得值 (mg)	回收量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
0.140 5	1.351 6	1.405 0	2.755 3	1.403 7	99.91		
0.155 8	1.498 8	1.405 0	2.917 8	1.419 0	101.00		
0.150 9	1.451 7	1.405 0	2.865 0	1.413 3	100.59	101.20	1.71
0.163 7	1.574 8	1.405 0	3.014 7	1.439 9	102.48		
0.158 6	1.525 7	1.405 0	2.986 2	1.460 5	103.95		
0.154 2	1.483 4	1.405 0	2.878 4	1.395 0	99.29		

品溶液,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,按上述色谱条件测定色谱峰面积,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 (% , n=3)

Tab.3 Content determination results of samples (%)

批号	芍药苷含量 (mg/粒)
20060501	3.85
20060502	2.03
20060503	2.94

3 讨论

白芍为寒热痹胶囊方中的主药,故以白芍中芍药苷作为寒热痹胶囊质量控制的定量指标。参考《中国药典》2005 年版白芍含量测定,芍药苷分离效果良好。本方法简便、灵敏、准确、重复性好,可用于寒热痹胶囊中芍药苷的含量测定。参考《中国药典》2005 版及预实验,调整甘草中甘草酸的展开剂配比为石油醚 (60~90℃)-甲苯-乙酸乙酯-冰乙酸 (10:15:10:0.5),使斑点更加清晰。

知母的鉴别参考《中国药典》2005 年版其展开剂为苯-丙酮 (9:1),由于苯毒性较大,故更换为甲苯,展开效果与原来方法基本一致,可作为寒热痹胶囊中知母的薄层鉴别展开剂。

参考《中国药典》2005 年版一部白芍的含量测定方法,选用的流动相为乙腈:0.1%磷酸溶液 (14:86),经过实验,分离的芍药苷峰形良好,分离度较高,且阴性对照无干扰,所以确定其流动相为乙腈:0.1%磷酸溶液 (14:86)。

综上所述,本方法简便、准确、重现性好,可用于寒热痹胶囊的质量控制。

[参考文献]

- [1] 李若存,陈丹.降糖通络胶囊质量标准研究[J].中国中医药信息,2005,12 (7):41-42.
- [2] 高敏,高荣.蒙药阿魏五味散的定性鉴别[J].中国民族医药杂志,2004, (4):38
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:68-69,520-521.
- [4] 王智.高效液相色谱法测定脑心通片中芍药苷含量[J].中医药信息, 2007,24(4):67-68.
- [5] 周海婴,王斯成.HPLC 法测定益炎净胶囊中芍药苷的含量[J].中国医药导报,2007,4(2):159-160.
- [6] 李虹.HPLC 法测定追风透骨丸中芍药苷的含量[J].中国药事,2008,22 (11):992-993.
- [7] 谢群,雷灼雨,蒋万良.高效液相色谱法测定八珍颗粒中芍药苷含量[J]. 中国药业,2008,17(13):26-27.
- [8] 黄天辉,周俊.高速逆流色谱分离纯化白芍中芍药苷的研究[J].中草药, 2009,40(1):67-68.

(收稿日期:2009-05-12)

本刊药品鉴定栏目介绍

内容主要包括中药与天然药物有效化学成分的提取、分离、鉴定和化学结构测定;化学药物的合成和技术改进(包括合成药和微生物药物的半合成和全合成、精制技术和结构鉴定);微生物药物的发酵、提取、精制、组分分离、鉴定;生化药物、生物技术药物的分离、提纯和结构鉴定。中西药复方制剂成分的定性、定量及检定分析,药物分析方法的研究(新方法、新技术和新型仪器等)。须附 300 字符以内的中英文摘要(采用结构式摘要:目的、方法、结果、结论),文中的图序、图题、图注、表序、表题、表注须有中英文对照。英文表达要规范准确,符合医药英文学术论文表达习惯。标引关键词 3~8 个。参考文献的引用数日应不低于 8 条,且近两年的文献应占 60%以上。文献应在文中引用处按引用顺序的数字加方括号标注于右上角,并在文末参考文献项内按顺序书写清楚。第一作者与通讯作者可附 100 字以内的个人简介。

来稿请寄:北京市朝阳区通惠家园惠润园 (壹线国际)5-3-601《中国医药导报》杂志社

邮政编码:100025

电 话:010-59679061

传 真:010-59679056

E-mail:yyzx99@163.com