

骨痛宁胶囊的质量控制研究

卞晓霞, 罗跃娥, 王文洁

天津医学高等专科学校 药学与医学检验技术系, 天津 300222

摘要: **目的** 建立骨痛宁胶囊的质量控制方法。**方法** 用薄层色谱(TLC)法鉴别骨痛宁胶囊的主要成分当归、川芎和白芍, 用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法测定黄芪甲苷的量, 以 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱为色谱柱, 流动相为乙腈-水(34:66), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃; ELSD 条件: 漂移管温度为 105 ℃, 高纯氮气体积流量为 2.5 L/min。**结果** 薄层色谱斑点清晰, 分离度良好, 阴性对照无干扰。黄芪甲苷在 1.02~6.12 μg 线性关系良好($r=0.999\ 1$), 平均回收率为 99.61%, RSD 为 2.80%。**结论** 该方法操作简便, 结果准确、可靠, 重复性好、专属性强, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 骨痛宁胶囊; 黄芪甲苷; 高效液相色谱法; 薄层色谱

中图分类号: R288 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)04-0349-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.04.013

Quality Standard for Gutongning Capsule

BIAN Xiao-xia, LUO Yue-e, WANG Wen-jie

Department of Pharmaceutical and Medical Inspection Technology, Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

Abstract: Objective To establish the quality standard for Gutongning Capsules. **Methods** *Angelicae Sinensis Radix*, *Chuanxiong Rhizoma*, and *Paeoniae Alba Radix* in Gutongning Capsules were identified by TLC. The content of astragaloside IV was determined by HPLC-ELSD. Using Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (34:66), The flow rate was 1.0 mL/min. Column temperature was 30 ℃; ELSD conditions: drift tube temperature of 105 ℃, high purity nitrogen flow rate of 2.5 L/min. **Results** The TLC spots were clear and well separated without negative interference. The measured value of astragaloside IV showed a good linear correlation between 1.02 — 6.12 μg ($r = 0.999\ 1$). The average recovery was 99.61% and RSD was 2.80%. **Conclusion** The method is simple, accurate, reproductive, and highly specific. It can be used to control the quality of Gutongning Capsule.

Key words: Gutongning Capsules; astragaloside IV; HPLC; TLC

骨痛宁胶囊在临床使用多年, 主要由黄芪、当归、川芎和白芍等组成, 具有祛风散寒、补益气血、滋补肝肾、活血通络的功效。用于治疗颈椎病、腰椎间盘突出、先天性骶椎裂、跌打损伤后遗症、风湿性及类风湿性关节炎、关节腔积液、骨质增生等骨关节病。为更好地控制该制剂的质量, 笔者对该制剂中当归、川芎、白芍进行了薄层色谱(TLC)定性鉴别, 同时建立了该制剂主要活性成分黄芪甲苷的定量测定方法, 为其质量进行了有效控制, 同时保证了稳定性和均一性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

美国 Waters 高效液相色谱仪, Waters2487 检测

器, Millennium32 色谱工作站数据处理系统; Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); KQ5200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); JA2003 精密电子天平(上海良平仪器厂); DK—S26 电热恒温水浴锅(上海申贤恒温设备厂); DGG—9240B 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司)。

1.2 试药与试剂

对照品均购自中国食品药品检定研究院, 阿魏酸对照品(批号 773-9001), 芍药苷对照品(批号 110736-200422), 黄芪甲苷对照品(批号 110781), 乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯化水, 其他试剂均为分析纯。薄层色谱硅胶 G(中国青岛海洋化工集团公司), 羧甲基纤维素钠(上海化学试剂站), 骨痛

收稿日期: 2014-03-21

基金项目: 中国中医科学院自主选题项目(No.2011xycz-11)

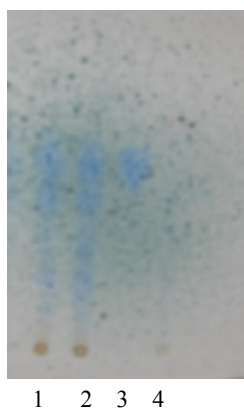
作者简介: 卞晓霞(1980—), 女, 山西阳高人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为药品质量及天然药物提取分离。

宁胶囊(批号 20130901、20131002、20131103), 阴性制剂均由本实验室自制。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 当归和川芎 取本品内容物 10 g, 加 1% 碳酸氢钠溶液 50 mL, 超声处理 10 min, 离心, 取上清液用稀盐酸调节 pH 值至 2~3, 用乙醚振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 挥干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取阿魏酸对照品, 加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。按处方配比, 取缺当归、川芎的本品, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验^[1], 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, 以正己烷-二氯甲烷-冰乙酸(8:8:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 三氯化铁-1% 铁氰化钾(1:1) 显色, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的蓝色斑点, 阴性对照无干扰, 见图 1。



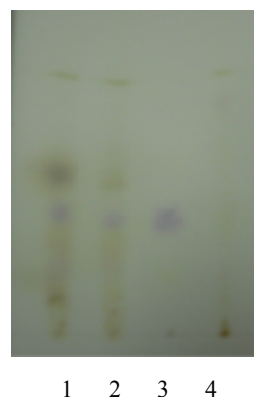
1、2-供试品; 3-对照品; 4-阴性

图 1 骨痛宁胶囊中当归和川芎的 TLC 图

Fig. 1 TLC of *Angelicae Sinensis Radix* and *Chuanxiong Rhizoma* in Gutongning Capsula

2.1.2 白芍 取本品内容物 5 g, 加乙醇 25 mL 振摇提取 10 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取芍药苷对照品, 加乙醇制成 1 mg/mL 溶液, 作为对照品溶液。按处方配比, 取缺白芍的本品, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验^[1], 吸取上述 3 种溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2) 为展开剂展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液后加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的蓝紫色斑点, 阴

性对照无干扰, 见图 2。



1、2 供试品; 3-对照品; 4 阴性

图 2 骨痛宁胶囊中白芍的 TLC 图

Fig. 2 TLC of *Paeoniae Alba Radix* of Gutongning Capsules

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-水(34:66), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, ELSD 条件: 漂移管温度为 105 $^{\circ}$ C, 高纯氮气体积流量为 2.5 L/min, 理论塔板数按黄芪甲苷峰计不低于 4 000, 色谱图见图 3。

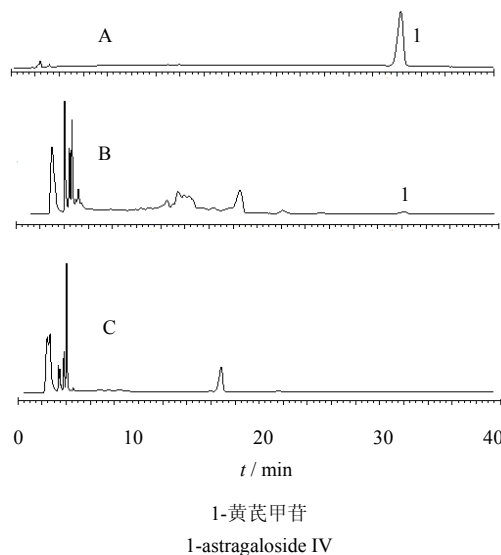


图 3 黄芪甲苷对照品(A)、骨痛宁胶囊样品(B)、阴性样品(C) HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC of astragaloside IV (A), sample solution (B), and negative sample (C)

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取在放置五氧化二磷减压干燥器中干燥至恒重的黄芪甲苷对照品 10.20 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得(含黄芪甲苷 0.51 mg/mL)。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物 5 g, 精密

称定,加水提取3次,每次30 min,混合提取液用滤纸过滤,得滤液浓缩至20 mL,以水饱和的正丁醇萃取3次,每次20 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次20 mL,弃去碱水层,将正丁醇层减压回收至干,用甲醇溶解并稀释至10 mL,滤过,取续滤液作为供试品溶液^[2]。

2.2.4 阴性空白试验 为进一步考察试验设计及含量测定方法的可行性和专属性,取不含黄芪药材的阴性样品制备阴性对照溶液,按上述色谱条件测定,结果处方中其他药味无干扰,表明本方法可行,专属性良好。

2.2.5 线性关系的考察 分别精密量取黄芪甲苷对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 μL ,按上述色谱条件测定,记录峰面积,以对照品溶液进样量的自然对数为横坐标,峰面积的自然对数为纵坐标绘制标准曲线,得出回归方程为 $Y=1.321\ 9X+2.162\ 1$, $r=0.999\ 1$,黄芪甲苷在1.02~6.12 μg 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样6次,每次10 μL ,结果黄芪甲苷的峰面积RSD值为0.97% ($n=6$),结果表明该方法精密度良好。

2.2.7 稳定性考察 精密吸取供试品溶液10 μL ,按上述色谱条件,在0、2、4、8、16、24、48 h分别进样检测,结果供试品中黄芪甲苷峰面积值RSD值为1.21% ($n=6$),表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.2.8 重复性考察 取本品内容物细粉约2.0 g,精密称定,共6份,照供试品溶液制备方法处理,按上述色谱条件进行测定,结果供试品中黄芪甲苷质量分数的RSD值为1.36% ($n=6$),表明本方法重复性较好。

2.2.9 加样回收率试验 取6份已知含量的本品内容物(含黄芪甲苷0.453 7 mg/g),分别精密称定2.5 g,精密加入0.51 mg/mL黄芪甲苷对照品溶液2 mL,按“2.3”项下方法进行制备,依含量测定项下方法测定^[3],其平均回收率为99.61%,RSD为2.80%,结果表明本方法可行。

2.2.10 样品含量测定 取本品3批,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,精密吸取10 μL ,照上述色谱条件测定,计算样品中黄芪甲苷的量,具体结果见表1。

3 讨论

骨痛宁组方中含有当归和川芎,两药中含有相

表1 3批样品含量测定结果

Table 1 Determination of three batches of samples

批号	黄芪甲苷/(mg·g ⁻¹)
20130901	0.453 1
20131002	0.431 2
20131103	0.465 2

似的化学成分,且都含有阿魏酸,如果单独用当归对照药材或者川芎对照药材做薄层色谱定性鉴别,当归和川芎的阴性对照会有干扰,本方法采用缺当归和川芎等双阴性对照,以阿魏酸为对照品,经过薄层色谱法鉴别,以上方法简便易行,斑点清晰。但是此种鉴别的不足是并不能在本质上区分出两种药材,只能证明含有两种药材或是不含有,并不能够具体说明是含有川芎或者当归哪一种药材,为区别这两种药材带来了一定的局限性。为进一步区分两种药材,应该选择两种药材的特征性成分为对照进行鉴别。

黄芪甲苷具有免疫调节、镇痛、抗炎、降压、保肝、清除自由基等多种作用^[4-6],黄芪为该方中君药,故选择黄芪甲苷作为指标性成分控制该制剂质量。目前关于黄芪甲苷的测定方法较多,如比色法、薄层扫描法和示差折光检测器法,但由于黄芪皂苷结构的多样性,且仅在203 nm左右有微弱吸收,因而干扰大,灵敏度低。ELSD是一种通用型质量检测器,它的响应取决于被分析物质颗粒的数量与大小,尤其适用于没有紫外吸收的皂苷类化合物。本文采用HPLC-ELSD法对骨痛宁胶囊中黄芪甲苷进行了含量测定,分离度好,灵敏度高。用于控制骨痛宁胶囊的质量提供了一种较好的分析手段。

参考文献

- [1] 中国药典. [S]. 一部. 2010.
- [2] 林华庆, 邓红, 张蜀. HPLC-ELSD法测定芪枣颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(2): 130-131.
- [3] 高建, 夏泉, 黄赵刚, 等. HPLC-ELSD同时测定当归补血总苷中黄芪甲苷和黄芪皂苷II[J]. 中成药, 2012, 34(2): 268-272.
- [4] 李欢欣, 郝桂明, 赵春杰, 等. 反相高效液相色谱法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(3): 212-213.
- [5] 罗文继, 陈旭, 郝春华, 等. 黄芪甲苷衍生物ASId治疗慢性心力衰竭的机制研究[J]. 药物评价研究, 2011, 34(6): 416-420.
- [6] 杨娟, 王洪新, 张英杰, 等. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素致大鼠心肌细胞肥大的影响及其机制[J]. 中草药, 2013, 44(21): 3018-3023.