

寒湿痹颗粒的质量控制研究

侯峰, 施法, 孙晓军, 张满来

辽宁省食品药品检验所, 辽宁 沈阳 110023

摘要: 目的 制定寒湿痹颗粒的质量控制方法。方法 采用 TLC 法对处方中麻黄、白芍、甘草、黄芪进行了定性鉴别。采用反相高效液相色谱法测定寒湿痹颗粒中芍药苷, Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸溶液 (14:86) 为流动相, 检测波长为 230 nm。结果 TLC 鉴别方法专属性强, 分离效果良好。芍药苷在 0.202 7~4.054 0 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 96.2%, RSD 为 1.9% ($n=6$)。结论 本方法灵敏、简便、准确, 重现性好, 可作为寒湿痹颗粒的质量控制方法。

关键词: 寒湿痹颗粒; 麻黄; 白芍; 甘草; 黄芪; 薄层色谱; 芍药苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)06-0495-04

Quality control for Hanshibi Granula

HOU Feng, SHI Fa, SUN Xiao-jun, ZHANG Man-lai

Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China

Abstract: Objective To establish the quality standard of Hanshibi Granula. **Methods** The TLC method was used for the qualitative identification of *Ephedrae Herba*, *Paeoniae Alba Radix*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, and *Astragali Radix* in the formula. The contents of paeoniflorin in Hanshibi Granula were determined by RP-HPLC method with Diamonsil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (14:86). The detection wavelength was 230 nm. **Results** The identification study showed strong specificity. The calibration curves were linear in the range of 0.202 7—4.054 0 μg ($r=0.999\ 8$) for paeoniflorin. The average recovery rate was 96.2% with RSD 1.9% ($n=6$). **Conclusion** The method is sensitive, simple, and accurate, and has the specificity and good reproducibility. It could be used in the quality control of Hanshibi Granula.

Key Words: Hanshibi Granula; *Ephedrae Herba*; *Paeoniae Alba Radix*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *Astragali Radix*; TLC; paeoniflorin; HPLC

寒湿痹颗粒由附子(制)、制川乌、黄芪(制)、桂枝、麻黄、白术(炒)、当归、白芍、威灵仙、木瓜、细辛、甘草(制)组成, 具有祛寒除湿、温经通络的功效, 用于肢体关节疼痛、疲困或肿胀、局部畏寒、风湿性关节炎^[1]。《中华人民共和国卫生部药品标准》中用薄层色谱法仅对处方中麻黄及白芍进行了鉴别。为了较全面地控制产品质量, 本实验对寒湿痹颗粒中相关药味采用薄层色谱法进行定性鉴别并修订了原标准的鉴别方法, 处方中白芍行柔肝止痛的功效且处方量较大, 故以白芍中的芍药苷为指标成分, 采用外标法进行测定, 其方法简便、准确、专属性强, 能够准确测定, 控制本品质量。

1 仪器与试剂

Camag Linomat 5 半自动薄层点样仪, Camag ADC2 全自动薄层色谱展开仪, 岛津 LC-2010 高效液相色谱仪; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为三蒸馏水, 其余试剂均为分析纯; 盐酸麻黄碱对照品、芍药苷对照品、甘草对照药材、黄芪甲苷对照品均购自中国药品生物制品检定所, 批号分别为 0714-9903、110736-200732、110786-200503、110718-200512。寒湿痹颗粒由辽宁好护士集团本溪制药有限公司提供(批号 20080101、20080102、20080103, 每袋 5 g)。

2 方法与结果

收稿日期: 2011-10-19

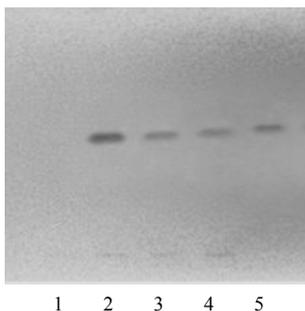
基金项目: 国家药典委员会 2010 版中国药典一部标准研究课题

作者简介: 侯峰(1976—), 女, 辽宁铁岭人, 副主任药师, 从事药物分析及中成药质量标准研究。

Tel: (024)25425645 E-mail: 10hou@163.com

2.1 定性鉴别

2.1.1 麻黄的薄层色谱鉴别 取本品 25 g, 研细, 加浓氨试液 2 mL、乙醚 40 mL 浸渍 3 h, 并时时振摇, 滤过, 滤液挥干, 残渣加无水乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。同法制备缺麻黄的阴性对照溶液。另取盐酸麻黄碱对照品, 加无水乙醇制成 1 mg/mL 溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法, 吸取上述溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷 - 甲醇 - 浓氨试液 (30 : 4 : 0.5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以茚三酮试液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果样品均与对照品色谱相同的位置上显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 见图 1。



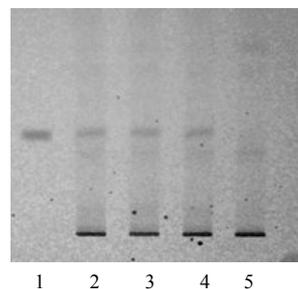
1-阴性对照 2-盐酸麻黄碱对照品 3-寒湿痹颗粒(批号 20080101) 4-寒湿痹颗粒(批号 20080102) 5-寒湿痹颗粒(批号 20080103)
1-negative sample 2-ephedrin hydrochloride reference substance
3-Hanshibi Granula (20080101) 4-Hanshibi Granula (20080102)
5-Hanshibi Granula (20080103)

图 1 寒湿痹颗粒中麻黄的薄层色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of *Ephedrae Herba* in Hanshibi Granula

2.1.2 白芍的薄层色谱鉴别 取寒湿痹颗粒 15 g, 研细, 加乙醇 30 mL, 超声 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 15 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 用正丁醇饱和的水洗涤 3 次, 每次 20 mL, 正丁醇液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。同法制备缺白芍的阴性对照溶液。另取芍药苷对照品, 加乙醇制成 2 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法, 吸取上述溶液各 4 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷 - 甲醇 (4 : 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果样品与对照品色谱相同的位置上均显相同颜色的斑点, 阴性

对照无干扰, 见图 2。



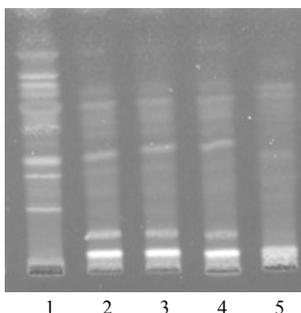
1-芍药苷对照品 2-寒湿痹颗粒(批号 20080101) 3-寒湿痹颗粒(批号 20080102) 4-寒湿痹颗粒(批号 20080103) 5-阴性对照
1-paeoniflorin reference substance 2-Hanshibi Granula (20080101)
3-Hanshibi Granula (20080102) 4-Hanshibi Granula (20080103)
5-negative sample

图 2 寒湿痹颗粒中白芍的薄层色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of *Paeoniae Alba Radix* in Hanshibi Granula

2.1.3 甘草的薄层色谱鉴别 取本品 15 g, 研细, 加乙醇 30 mL, 超声 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 15 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 用正丁醇饱和和水洗涤 3 次, 每次 20 mL, 正丁醇液蒸干, 残渣加 1 mL 乙醇使溶解, 作为供试品溶液。同法制备缺甘草的阴性对照溶液。另取甘草对照药材 1 g, 同样品溶液制备方法制成对照药材溶液。照薄层色谱法试验, 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯 - 醋酸乙酯 - 甲酸 (7 : 3 : 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。结果样品与对照品色谱相同的位置上均显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 见图 3。

2.1.4 黄芪的薄层色谱鉴别 取本品 15 g, 研细, 加甲醇 30 mL, 超声 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 20 mL; 弃去氨试液, 再用正丁醇饱和和水洗涤 2 次, 每次 20 mL, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。同法制备缺黄芪的阴性对照溶液。另取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法, 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷 - 甲醇 - 水 (13 : 7 : 2) 10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干,

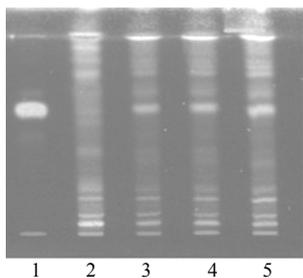


1-甘草对照药材 2-寒湿痹颗粒(批号 20080101) 3-寒湿痹颗粒(批号 20080102) 4-寒湿痹颗粒(批号 20080103) 5-阴性对照
1-reference drug of *Glycyrrhizae Radix et Rhizome* 2- Hanshibi Granula (20080101) 3-Hanshibi Granula (20080102) 4-Hanshibi Granula (20080103) 5- negative sample

图3 寒湿痹颗粒中甘草的薄层色谱图

Fig. 3 TLC chromatogram of *Glycyrrhizae Radix et Rhizome* in Hanshibi Granula

喷以 10%硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。结果样品与对照品色谱相同的位置上均显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。见图 4。



1-黄芪甲苷对照品 2-阴性对照 3-寒湿痹颗粒(批号 20080101) 4-寒湿痹颗粒(批号 20080102) 5-寒湿痹颗粒(批号 20080103)
1-astragaloside IV reference substance 2-negative sample
3-Hanshibi Granula (20080101) 4-Hanshibi Granules (20080102) 5-Hanshibi Granula (20080103)

图4 寒湿痹颗粒中黄芪薄层色谱图

Fig. 4 TLC chromatogram of *Astragali Radix* in Hanshibi Granula

2.2 芍药苷的测定

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 - 0.1% 磷酸溶液 (14 : 86) 为流动相, 检测波长 230 nm, 理论板数按芍药苷峰计算应不低于 4 000。

2.2.2 供试品溶液的制备 将寒湿痹颗粒研匀, 取约 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入水

100 mL, 称定质量, 超声 30 min, 再称定质量, 用水补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加水制成 50 μg/mL 的溶液, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取除去白芍以外的其他药材, 按所确定的工艺制备阴性对照品, 按供试品溶液的制备方法制成不含白芍的阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取 0.202 7 mg/mL 芍药苷对照品溶液 1、3、9、15、20 μL, 分别注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为: $Y=1\ 235\ 697\ X+22\ 694$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明, 芍药苷对照品进样量在 0.202 7~4.054 0 μg 线性关系良好。

2.2.6 专属性试验 分别取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液进样, 结果芍药苷的色谱峰与杂质峰分离较好, 阴性对照无干扰, 结果见图 5。

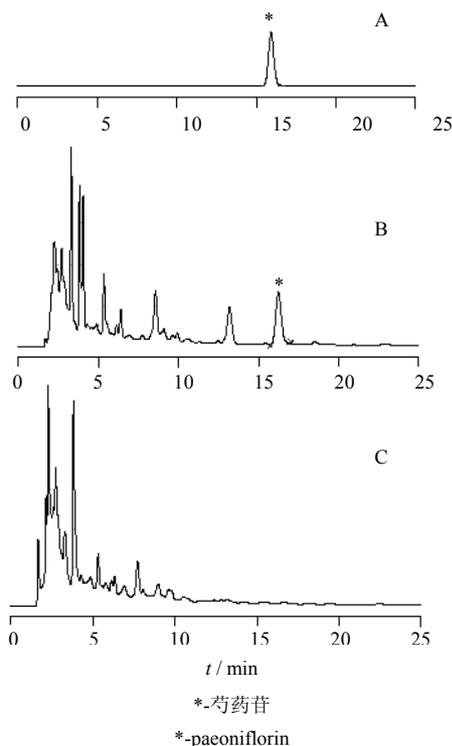


图5 芍药苷对照品(A)、寒湿痹颗粒(B)和阴性样品(C)的HPLC图

Fig. 5 HPLC chromatograms of paeoniflorin reference substance (A), Hanshibi Granula (B), and negative sample (C)

2.2.7 精密度试验 精密吸取 50.68 μg/mL 芍药苷对照品溶液 10 μL, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 0.78%。

2.2.8 重现性试验 取批号 20080101 的寒湿痹颗粒 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算, 结果芍药苷质量分数的 RSD 为 1.3%。

2.2.9 稳定性试验 取批号 20080101 的寒湿痹颗粒制备供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、8 h 进样 10 μL , 计算得芍药苷峰面积积分值 RSD 为 1.05%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.10 回收率试验 取寒湿痹颗粒 (批号 20080101) 研细, 精密称取 1.25 g, 共称取 6 份, 分别精密加入 324.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芍药苷对照品溶液 5 mL, 制备供试品溶液。精密吸取 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定芍药苷峰面积, 计算回收率。结果平均回收率为 96.2%, RSD 为 1.9%。

2.2.11 样品测定 取 3 批样品, 每批 2 份, 制备供试品溶液, 进样, 按上述色谱条件测定, 采用外标法计算, 结果见表 1。

表 1 寒湿痹颗粒中芍药苷的测定结果

Table 1 Determination of paeoniflorin in Hanshibi Granula

批号	芍药苷/(mg·袋 ⁻¹)
20080101	5.8
20080102	5.7
20080103	5.4

3 讨论

本研究采用 TLC 法对制剂中 12 药味全部进行了定性鉴别, 其中麻黄、白芍、甘草及黄芪 4 味药

的薄层色谱鉴别方法具有分离度好、重现性好、专属性强的特点, 拟作为质量标准。其他药味未制定出符合要求的 TLC 鉴别方法。

处方中附子 (制)、制川乌及黄芪 (制) 处方量最大, 拟围绕该 3 味药建立测定方法^[2-4]。以 HPLC 法测定附子 (制) 及制川乌中生物碱类成分, 显示其稳定性及专属性较差, 以 HPLC-ELSD 法测定黄芪 (制) 中黄芪甲苷^[5-6], 结果发现重现性较差, 不符合建立测定方法的相关要求。

参考文献

- [1] 杜天信, 韩新峰, 高书图. 寒湿痹颗粒治疗寒湿痹阻型风湿病的效果分析 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(7): 148-150.
- [2] 孙 兰, 周海燕, 赵润怀, 等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 131-134
- [3] 黄志芳, 易进海, 陈东安, 等. 制川乌 HPLC 特征图谱研究和 6 种酯型生物碱的含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 217-221.
- [4] 朱俊访, 李卓亚, 沈志滨, 等. HPLC 法测定不同地区制川乌中新乌头碱、次乌头碱及乌头碱的含量 [J]. 食品与药品, 2008, 10(9): 44-46.
- [5] 龙恩武, 张一萍. 黄芪及其制剂中黄芪甲苷测定方法研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(9): 854-855.
- [6] 吴青业, 周恩丽, 付小环, 等. HPLC-ELSD 法测定葛根口服液中黄芪甲苷 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1305-1306.