

丁桂活络凝胶膏的质量标准研究^Δ

郭宏彦*, 涂 禾, 刘中均, 胡 恒(四川省骨科医院, 成都 610041)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4076-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.15

摘要 目的:建立丁桂活络凝胶膏的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法鉴别制剂中的木香、羌活、独活;采用高效液相色谱法测定制剂中延胡索乙素的含量;色谱柱为 Waters Symmetry Shield C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(pH6.0, 50:50, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:木香、羌活、独活的TLC图斑点清晰、分离度好。延胡索乙素的质量浓度在10.58~52.90 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均≤0.72%,平均加样回收率为100.07%,RSD=0.65%($n=9$)。结论:所建质量标准可用于丁桂活络凝胶膏的质量控制。

关键词 丁桂活络凝胶膏剂;延胡索乙素;木香;羌活;独活;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Dinggui Huoluo Gel Paste

GUO Hong-yan, TU He, LIU Zhong-jun, HU Heng(Sichuan Orthopedics Hospital, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Dinggui huoluo gel paste. METHODS: *Aucklandia lappa*, *Notopterygium incisum* and *Heracleum hemsleyanum* were identified by TLC. The content of tetrahydropalmatine was determined by HPLC. The determination was performed on Waters Symmetry Shield C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (pH6.0, 50:50, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm. The column temperature was 25 ℃, and the sample size was 10 μl. RESULTS: TLC spots of *A. lappa*, *N. incisum* and *H. hemsleyanum* were clear and well-separated. The linear range of tetrahydropalmatine was 10.58-52.90 μg/ml ($r=0.9999$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.72%. The average recovery of 100.07% (RSD=0.65%, $n=9$). CONCLUSIONS: The established quality standard can be used for the quality control of the preparation.

KEYWORDS Dinggui huoluo gel paste; Tetrahydropalmatine; *Aucklandia lappa*; *Notopterygium incisum*; *Heracleum hemsleyanum*; TLC; HPLC

丁桂活络膏是四川省骨科医院自制制剂,在临床已有50多年的使用史,疗效确切。该制剂由延胡索、羌活、独活、当归、木香、山奈、红花、川芎、白芷、续断、细辛、冰片、樟脑等中药组成,具有通经活络、逐风散寒的功效,一般用于跌打损伤、运动创伤中后期,症见关节疼痛、肌肉酸楚、麻木等。为了提高该制剂的疗效,我院结合现代药剂学知识,将丁桂活络膏改

为载药量、溶出度更高的凝胶膏剂(《中国药典》(一部)附录I)^[1]。本试验参考2010版《中国药典》(一部)的方法^[1],采用薄层色谱(TLC)法对方中木香、羌活、独活进行定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法对丁桂活络凝胶膏剂中延胡索的活性成分延胡索乙素进行测定^[1-2],以为该制剂的质量控制提供参考。

将两者分开。

综上所述,本方法简单、准确,精密度和重复性良好,可为鹿蹄草药材的质量控制提供科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:304.
- [2] 王军宪, 张莉, 吕修梅, 等. 普通鹿蹄草化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(4):307.
- [3] 盛华刚. 鹿衔草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 西北

- 药学杂志, 2012, 27(4):383.
- [4] 石娟, 王军宪. 鹿衔草化学成分的再研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(1):37.
- [5] 李宏杨, 刘国民, 刘飞, 等. 熊果酸及五环三萜同类物的研究进展[J]. 湖南工业大学学报, 2009, 23(5):18.
- [6] 周志勇, 袁丁. 齐墩果酸药理作用研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23):2031.
- [7] 高大威. 齐墩果酸抗糖尿病作用及其机理研究[D]. 秦皇岛:燕山大学, 2007.
- [8] 张家富, 夏伦祝, 汪永忠, 等. HPLC法同时测定5种常见中药材中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(27):2553.

Δ 基金项目:科技部科研院所技术开发研究专项资金项目(No.2012EG145135)

* 副主任中药师。研究方向:医疗机构制剂研发。电话:028-87050716。E-mail: 535831843@qq.com

(收稿日期:2013-09-03 修回日期:2013-12-06)

1 材料

1.1 仪器

1010型HPLC仪,包括Waters1525二元梯度泵、2487双波长紫外检测器、Empower色谱数据管理系统(美国Waters公司);XS105电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);SB3200超声清洗器(上海必能信超声有限公司)。AYJ1-0501-U艾科浦超纯水系统(重庆颐洋科浦发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

延胡索乙素对照品(批号:110726-201213)、木香对照药材(批号:120921-201008)、羌活对照药材(批号:120935-201007)、独活对照药材(批号:120940-201111)均购自中国食品药品检定研究院;丁桂活络凝胶膏剂(批号:140222、140310、140405)及各阴性样品均由四川省骨科医院自制;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

2.1.1 木香的TLC鉴别^[1-2] 取本品2片,除去盖衬,剪碎,加甲醇40 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取缺木香的阴性对照品适量,同法制成阴性对照溶液。取木香对照药材0.1 g,加甲醇10 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为对照药材溶液。吸取上述两种溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-丙酮(10:3, V/V)^[2]为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,于105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置日光下检视。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。木香的TLC图见图1。

2.1.2 羌活的TLC鉴别 取羌活对照药材0.5 g,加甲醇10 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为对照药材溶液。另取缺羌活的阴性对照品适量,按“2.1.1”项下方法制成阴性对照溶液。吸取“2.1.1”项下的供试品溶液和上述对照药材溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(8:2, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[1]。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同的紫色荧光斑点;阴性对照无干扰。羌活的TLC图见图2。

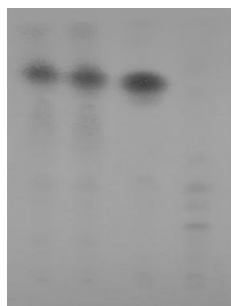


图1 木香的TLC图

1~2. 供试品; 3. 木香对照药材; 4. 阴性对照

Fig 1 TLC *Aucklandia lappa*
1, 2. test samples; 3. *Aucklandia lappa* control; 4. negative control

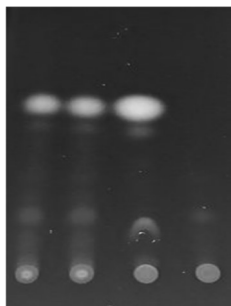


图2 羌活的TLC图

1~2. 供试品; 3. 羌活对照药材; 4. 阴性对照

Fig 2 TLC of *Notopterygii Rhizoma*
1, 2. test samples; 3. *insinum* control; 4. negative control

2.1.3 独活的TLC鉴别 取独活对照药材0.5 g,加甲醇10 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为对照药材溶液。另取缺独活的阴性样品适量,按“2.1.1”项下方法制备阴性对照溶液。吸取“2.1.1”项下的供试品溶液、对照药材溶液各8 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(7:3, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视^[1]。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;阴性对照无干扰。独活的TLC图见图3。

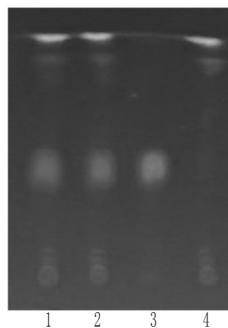


图3 独活的TLC图

1~2. 供试品; 3. 独活对照药材; 4. 阴性对照

Fig 3 TLC of *Aeracleum. hemslayanum*

1-2. test samples; 3. *Angelicae Pubescentis Radix* control; 4. negative control

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters Symmetry Shield C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸溶液(三乙胺调pH至6.0, 50:50, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ l^[1]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取延胡索乙素对照品5.29 mg,用甲醇溶于100 ml量瓶中并定容,摇匀,得质量浓度为52.90 μ g/ml的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品2片,除去盖衬,剪碎,精密称定,加甲醇40 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,用甲醇溶解,滤过,置10 ml量瓶中,加甲醇定容,即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按丁桂活络凝胶膏剂的处方及制备工艺制备缺延胡索的阴性样品,再按“2.2.3”项下方法制备,即得阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μ l,分别按上述色谱条件进样测定。结果,供试品溶液中的延胡索乙素与对照品溶液的保留时间一致,且与相邻杂质峰分离度较好,阴性对照溶液在相应位置处无吸收峰,表明其对含量测定无干扰。色谱见图4。

2.2.6 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液2、4、6、8、10 ml,置10 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制备成不同质量浓度的对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以峰面积积分值(y)为纵坐标,延胡索乙素的质量浓度(x, μ g/ml)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=1.42\times 10^3x+3.08\times 10^3$ ($r=0.9999$)。结果表明,延胡索乙素质量浓度在10.58~52.90 μ g/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液10 μ l,按上述色谱条件重复进样6次测定,记录色谱图。结果, RSD=0.49% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

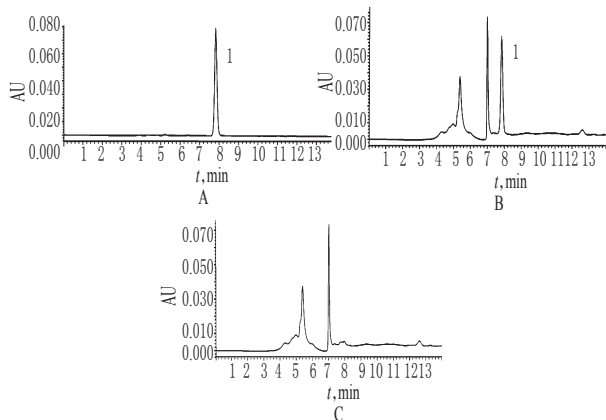


图4 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 延胡索乙素

Fig 4 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. tetrahydropalmatine

2.2.8 重复性试验 取同一样品适量,共6份,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=0.72%(n=6),表明重本方法复性良好。

2.2.9 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于0、1、2、4、8 h按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,RSD=0.67%(n=5),表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取同一批已知含量的样品(批号:140405)9份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,分别精密加入适量对照品,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

取样量,片	样品含量,μg	加入量,μg	测得量,μg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
0.7	128.03	130	260.05	101.56		
0.7	128.03	140	267.72	99.78		
0.7	128.03	120	247.92	99.91		
1	182.90	190	372.10	99.58		
1	182.90	170	353.40	100.30	100.07	0.65
1	182.90	180	361.70	99.34		
1.3	237.77	240	478.53	100.32		
1.3	237.77	250	487.01	99.70		
1.3	237.77	230	468.13	100.16		

2.2.11 样品含量测定 取3批样品(批号:140222、140310、140405)各适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,利用标准曲线计算延胡索乙素的含量。结果,3批样品中,延胡索乙素的含量分别为183.2、181.7、182.9 μg/片。

3 讨论

3.1 流动相的选择

预试验中,笔者考察了不同洗脱系统(甲醇-磷酸溶液^[1]、甲

醇-水-三乙胺-乙腈-磷酸溶液^[3-8])的洗脱效果。结果表明,甲醇-0.1%磷酸溶液更容易使延胡索乙素峰与其他杂质峰分离。然后又考察了不同比例(45:55,50:50,55:45,V/V^[1])的甲醇-0.1%磷酸溶液系统。结果表明,甲醇-0.1%磷酸溶液(三乙胺调pH至6.0,50:50,V/V)系统作流动相效果最好,出峰最为理想。

3.2 提取方法的选择

预试验中,笔者尝试用更易溶解延胡索乙素的乙醚、三氯甲烷作提取溶剂超声提取,又尝试采用2010年版《中国药典》(一部)中的提取试剂(浓氨试液-甲醇,1:20,V/V)^[1]热回流提取来制备供试品溶液,由于延胡索乙素易黏结于凝胶膏剂基质而影响测定的准确性,故最终选择用甲醇作提取溶剂超声提取。

3.3 TLC鉴别中展开剂及对照药材用量的选择

笔者曾按照参考文献^[1-2]中木香、羌活、独活的TLC鉴别方法分别试验,结果显示,木香的TLC鉴别以环己烷-丙酮(10:3,V/V)^[2]为展开剂效果更好;而独活的TLC鉴别采用石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(7:3,V/V)^[1]为展开剂的效果优于正己烷-苯-醋酸乙酯(2:1:1,V/V/V)^[2]。笔者还考察了3种对照药材用量(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g),结果表明,木香0.1 g可显示特征主斑点,而羌活、独活取样0.5 g方可显示主斑点。

综上所述,本试验建立的质量标准操作简便、结果准确、精密度、重复性好,可用于丁桂活络凝胶膏剂的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:58、130、170、246、附录8.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典:中药薄层色谱彩色图集[S].广州:广东科技出版社,1993:61,126
- [3] 张沂,王强,蔡清宇,等.复方苦苓软膏质量标准研究[J].中国药房,2010,21(19):1781.
- [4] 卢玲敏,袁清照.胃复康胶囊质量标准的研究[J].湖南中医杂志,2014,30(2):126.
- [5] 千珂,王荣,张伟东,等.元仁胶囊的质量标准研究[J].中国医药导报,2012,9(26):124.
- [6] 唐柏平,李琼英,贺清源,等.HPLC法测定新伤跌打胶囊中延胡索乙素的含量[J].中国药师,2012,15(11):1655.
- [7] 谢究斌,王巨存.HPLC法测定壮骨止痛颗粒中延胡索乙素的含量[J].天津医科大学学报,2013,19(1):76.
- [8] 张晓红,王月茹,卢新义,等.高效液相色谱法测定千金救心胶囊中延胡索乙素含量[J].陕西中医,2013,34(7):895.

(收稿日期:2014-08-05 修回日期:2014-09-16)