

· 论 著 ·

(下转第 286 页)

寒痹丸的质量标准研究

崔恩忠, 陈美惠, 贡磊, 盛华, 汤 昊

[摘要] 目的 建立寒痹丸的质量控制标准。方法 对方中当归和川芎进行薄层色谱鉴别, 同时采用 HPLC 法对淫羊藿中淫羊藿苷进行含量测定。结果 薄层色谱中斑点清晰, 专属性强; 淫羊藿苷在 10.15~81.20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 99.92% (RSD=1.34%)。结论 本实验所用方法简便, 重现性良好, 定量方法准确可靠, 可用于寒痹丸的质量标准控制。

[关键词] 寒痹丸; 质量标准; 薄层色谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R927.11 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.03.018

Study on quality standard of Hanbi Pill

CUI En-zhong, CHEN Mei-hui, GONG Lei, SHENG Hua, TANG Hao. Department of Pharmaceutics, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To establish the quality standard of Hanbi Pill. **Methods** A TLC method was used for qualitative identification of the Radix Angelicae Sinensis and the Ligusticum sinense, and the Icaritin was determined by HPLC. **Results** The TLC spots were clear, with strong specificity. The linear relationship of Icaritin content was good in the range of 10.15–81.20 $\mu\text{g/mL}$, and the average recovery was 99.92% (RSD=1.34%). **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, with good reproducibility, and it can be used for the quality control of Hanbi Pill.

[Key words] Hanbi Pill; quality; TLC; HPLC

寒痹丸为南京军区南京总医院中西医结合科所研制, 经临床应用多年, 疗效确切。原方由细辛、黄芪、当归、土鳖虫、制川乌、制草乌、川芎、淫羊藿和鸡血藤等九味中药饮片组成, 具有散寒止痛, 活血通络之功效, 用于治疗风湿与类风湿性关节炎、强直性脊柱炎及其他寒湿痹证型关节疼痛。本实验对方中当归和川芎进行薄层色谱鉴别, 同时采用 HPLC 法对淫羊藿中淫羊藿苷进行含量测定, 进一步完善了其质量控制方法, 为评价并建立其质量控制标准提供了科学依据。

1 仪器与药材

Waters 高效液相色谱仪 (1525 型双泵+2487 型紫外检测器, 美国 Waters 公司); 梅特勒 AH-240 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); UV-1700 紫外分析仪 (日本岛津); HH-4 数显恒温水浴锅 (国

华电器有限公司)。

对照药材当归 (120927-201014)、川芎 (120918-201110) 和淫羊藿苷 (110737-200415) 均购自中国药品生物制品检定所; 寒痹丸均为南京军区南京总医院制剂科配制 (样品 1 批号 140822, 样品 2 批号 141019, 样品 3 批号 141213); 本实验所用中药饮片均购自安徽亳州; 薄层层析硅胶 G (薄层色谱用, 青岛海洋化工); 乙腈 (色谱纯, 美国天地产品), 其余所用试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 当归、川芎的鉴别 对照药材溶液的制备: 取当归、川芎对照药材各 0.5 g, 同法制成对照药材溶液。

供试品溶液的制备: 取本品 4 g, 研细, 加乙醇 25 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 4 mL 使溶解, 溶液转移至 5 mL 容量瓶内, 作为供试品溶液。

阴性对照溶液的制备: 按处方比例称取除当归、川芎以外的其余药材, 研碎, 按本品制备工艺及供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

照薄层色谱法试验^[1]: 吸取供试品溶液、对照药材溶液及阴性对照溶液各 20 μL , 分别点于同一

基金项目: 全国医疗机构制剂标准提高科研专项课题面上课题 (14ZJZ16-3)

作者单位: 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院制剂科

通讯作者: 汤 昊, E-mail: tanghao_0518@sina.com

引用格式: 崔恩忠, 陈美惠, 贡磊, 等. 寒痹丸的质量标准研究 [J]. 东南国防医药, 2016, 18 (3): 281-283, 297.

硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,展开后取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。

2.2 淫羊藿苷的含量测定 色谱条件:色谱柱:Hedera-ODS-2 C₁₈柱(4.6×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(29:71);检测波长:270 nm;柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。理论塔板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 1500。

对照品储备液的制备:精密称取淫羊藿苷对照品 8.12 mg,置于 100 mL 量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,作为对照品储备液。

对照品应用液的制备:精密称取对照品储备液 3.5 mL,置 10 mL 量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,作为对照品应用液。

供试品溶液的制备:取本品粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 50 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 60 min 放冷,再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,续取滤液,即得。

阴性对照溶液的制备:按处方比例称取除淫羊藿以外的其余药材,按本品制备工艺及供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

方法专属性考察:精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,在上述色谱条件下进样检测。

线性关系考察:精密吸取淫羊藿苷储备液 1.25、2.5、5.0、7.5、10.0 mL 分别至 10 mL 量瓶中,用稀乙醇溶液稀释至刻度,可得 10.15、20.30、40.60、60.90、81.20 μg/mL 等一系列浓度。精密吸取 10 μL 在上述色谱条件下进样,记录色谱峰面积,以峰面积为纵坐标(y),以对照品浓度为横坐标(x)进行回归分析,计算回归方程。

精密度试验:精密吸取浓度为 40.60 μg/mL 的对照品溶液 10 μL,在上述色谱条件下连续进样 5 次,以峰面积计算相对标准偏差(RSD)。

稳定性试验:精密吸取浓度为 40.60 μg/mL 的对照品溶液 10 μL,在上述色谱条件下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,以峰面积计算相对标准偏差(RSD)。

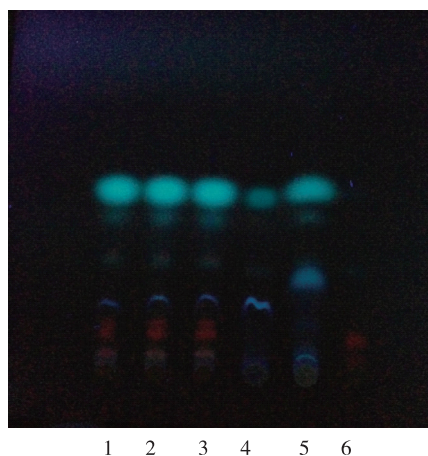
重复性试验:取寒痹丸(批号 120315),按照 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,分别在上述色谱条件下进样测定,以峰面积计算相对标准偏差(RSD)。

加样回收率试验:称取已知含量的样品 0.25 g(批号为 120315),共 9 份,置于 50 mL 锥形瓶中,分别精密加入淫羊藿苷对照品储备液 8.0 mL、10.0 mL

和 12.0 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液。精密吸取上述供试品溶液各 10 μL 注入色谱仪,测定含量,计算回收率。

3 结果

3.1 当归、川芎的鉴别 按照 2.1 项下的薄层色谱鉴别方法进行鉴定。如图 1 所示,供试品在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,同时阴性对照无此斑点,证明处方中其他药材对当归和川芎的鉴别无干扰。在制剂有效期内,该鉴别均呈正反应。取三批不同批号的样品依法检验,结果均满意。



1. 样品 1(140822); 2. 样品 2(141019); 3. 样品 3(141213); 4. 当归对照药材; 5. 川芎对照药材; 6. 阴性对照

图 1 当归、川芎的薄层色谱图谱

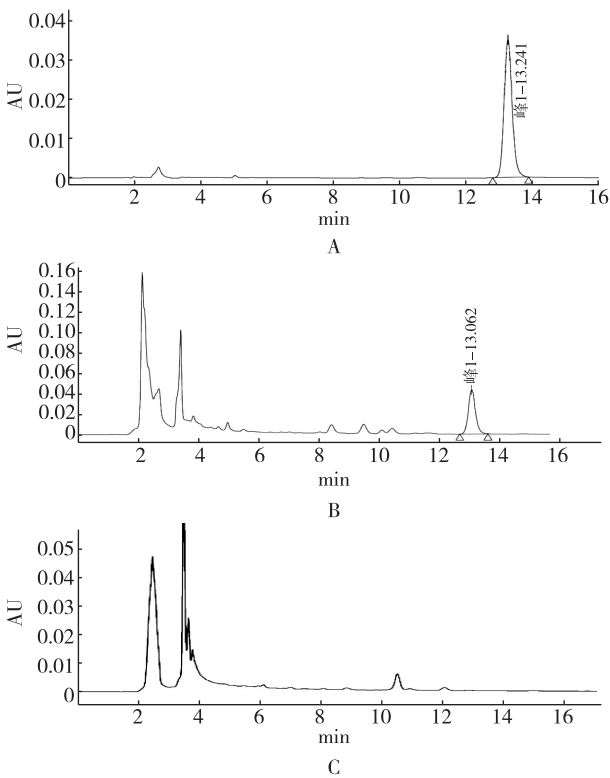
3.2 含量测定

3.2.1 淫羊藿苷的含量测定 方法专属性考察:供试品色谱中,在与对照品色谱相应的保留时间处,有同一色谱峰,而阴性对照溶液在相应保留时间处则无峰出现,表明其对样品测定无干扰。结果见图 2。

淫羊藿苷线性关系考察:按 2.2 项下方法进行测定,以对照品浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得到回归方程: $Y=21762974X-7950$, $r=0.9999$ 。结果表明,淫羊藿苷的浓度在 10.15~81.20 μg/mL 之间,与峰面积呈良好的线性关系。

精密度试验:按 2.2 项下方法进行测定,以淫羊藿苷峰面积计算,RSD 为 0.29%。结果表明该方法的精密度良好。

稳定性试验:按 2.2 项下方法进行测定,以淫羊藿苷峰面积计算,RSD 为 1.09%。结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。



A:淫羊藿苷对照品;B:寒痹丸样品;C:阴性
图2 专属性试验

重复性试验:按 2.2 项下方法进行测定,计算峰面积的 RSD 为 0.71%。结果表明方法重复性良好。
加样回收率试验:按 2.2 项下方法进行计算测定,平均回收率为 99.92%,RSD 为 1.34%。结果见表 1。

表 1 淫羊藿苷加样回收率试验结果 (n=9)

取样量 (g)	样品含 量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.2517	0.812	0.645	1.454	99.39		
0.2508	0.810	0.645	1.448	99.05		
0.2520	0.813	0.645	1.462	100.62		
0.2516	0.812	0.806	1.630	101.49		
0.2519	0.813	0.806	1.619	99.93	99.92	1.34
0.2529	0.816	0.806	1.640	102.19		
0.2522	0.814	0.968	1.781	99.91		
0.2509	0.810	0.968	1.757	97.86		
0.2515	0.812	0.968	1.769	98.89		

3.2.2 样品含量测定 取 10 批寒痹丸,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按照上述色谱条件进行测定。结果见表 2。
参考 10 批样品测定结果以及淫羊藿苷的转移率,确定本品每 g 含淫羊藿苷以淫羊藿苷计不得少于 1.0 mg。

表 2 10 批样品含量测定结果

序号	样品批号	淫羊藿苷(mg/g)
1	样 1(140822)	1.55
2	样 2(141019)	3.17
3	样 3(141213)	1.53
4	样 4(121110)	1.13
5	样 5(130120)	4.28
6	样 6(130516)	2.01
7	样 7(130819)	3.22
8	样 8(131010)	2.45
9	样 9(131203)	3.68
10	样 10(140220)	1.43

4 讨论

4.1 薄层色谱鉴别项的选择 当归含挥发油及水溶性成分,水溶性成分有阿魏酸、烟酸、丁二酸、胆碱等^[2-4];川芎含挥发油及生物碱类、酚类等^[5-7];两者成分非常相似,无法排除阴性干扰,故薄层色谱鉴别阴性对照采用双缺味,本方法具有专属性。
4.2 含量测定 最大波长的选择:精密称取一定量的对照品于 50 mL 量瓶中,加稀乙醇溶液定容,进行紫外扫描,测得最大吸收波长为 270 nm。
流动相的选择:参照《中国药典》2015 版一部淫羊藿中淫羊藿苷的含量测定方法^[1],流动相为乙腈-水(30:70)时寒痹丸阴性样品有干扰。参考相关文献^[8-12]后调整流动相为乙腈-水(29:71)后,阴性样品无干扰,且分离度较好。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
[2] 王兆惠,程自银. 不同产地当归挥发油的成分研究[J]. 药物生物技术,2013,20(6):535-537.
[3] 张庆,茹庆国,林红梅,等. 基于 PLSR 分析当归挥发油分子蒸馏馏分中化学成分与抗炎作用的相关性[J]. 环球中医药,2015,8(10):1153-1158.
[4] 李涛,何璇. GC-MS 测定野生当归挥发油中的化学成分[J]. 药华西药学杂志,2015,30(2):249-250.
[5] 胡春兰,杨冬丽,张东阁,等. 两种方法提取川芎挥发油指纹图谱的对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):88-91.
[6] 刘晓芬,连艳,高必兴. 不同方法提取川芎挥发油的 GS-MS 分析[J]. 中药与临床,2014,5(3):17-19.
[7] 徐晓芳,孙东东,李祥,等. 川芎水提部位化学成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J]. 南京中医药大学学报,2013,29(4):382-386.
[8] 王闰,孟慧,许勇. 复方甘草软膏的制备及含量测定法的建立[J]. 东南国防医药,2015,17(4):389-392.
[9] 于森,原源. HPLC 法测定益心酮片中四种黄酮类成分的含量[J]. 东南国防医药,2015,17(2):157-165.

- 研究进展[J]. 东南国防医药, 2008, 10(5):359-361.
- [21] 赵珉, 吴永贵, 林辉, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠肝、肾组织氧化应激的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(4):802-807.
- [22] Tossidou I, Starker G, Krüger J, et al. PKC- α modulates TGF- β signaling and impairs podocyte survival[J]. Cell Physiol Biochem, 2009, 24(5-6):627-634.
- [23] 张丽娜, 谢席胜, 左川, 等. 人参皂甙 Rg1 对糖尿病肾病大鼠 TNF- α 、MCP-1 表达的影响[J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(3):466-471.
- [24] 崔秀玲, 刘晓健. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾脏蛋白激酶 C α 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(6):417-421.
- [25] 罗蕾, 刘红. 灯盏花素对 2 型糖尿病大鼠肾脏肥大的抑制作用与机制研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1):86-87.
- [26] 赵燕, 杨秋萍, 刘华, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾脏 PI3K/AKT 传导通路的影响[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(11):58-62.
- [27] Tashiro K, Koyanagi I, Ohara I, et al. Levels of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy[J]. J Clin Lab Anal, 2004, 18(3):206-210.
- [28] 邓丽萍, 乐有为, 黄晓青. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾组织 VEGF 表达的影响[J]. 吉林医学, 2014, 35(17):3683-3684.
- [29] 高原, 杜飞, 沈东波, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠早期肾皮质一氧化氮和血管紧张素 II 水平的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(38):7597-7600.
- [30] Takahashi K, Hirose T, Mori N, et al. The renin-angiotensin system, adrenomedullins and urotensin II in the kidney: possible renoprotection via the kidney peptide systems[J]. Peptides, 2009, 30(8):1575-1585.
- [31] 陈远寿, 刘华庆, 高原, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾脏肾上腺髓质素水平及其受体表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1):98-99.
- [32] 李彦玲. 灯盏花素与山莨菪碱联合治疗糖尿病足 22 例临床观察[J]. 中国医药科学, 2012, 2(14):62-63.
- [33] 徐立国, 吉淑敏. 山莨菪碱联合灯盏花素治疗糖尿病足并下肢动脉硬化临床观察[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(6):7-8.
- [34] 童利伟. 叶酸联合灯盏花素治疗糖尿病足的疗效观察[J]. 四川医学, 2011, 32(4):567-568.
- [35] 王艳丽. 中药足浴联合灯盏花素治疗糖尿病足的护理疗效观察[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34(8):1228-1229.
- [36] 杨颖婷, 王晓梅. 灯盏花素对糖尿病大鼠心肌转化生长因子- β 1 和 Smad7 表达的影响[J]. 广东医学, 2011, 32(20):2629-2632.
- [37] 刘晓健, 崔秀玲, 刘婉珠, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠心肌生长因子 β 1, 转录因子- κ B 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(6):443-446.
- [38] 赵凌云, 李学英, 罗曼莉, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠心肌及神经肽 Y 水平的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(2):164-167.
- [39] Jia JH, Chen KP, Chen SX, et al. Breviscapine, a traditional Chinese medicine, alleviates myocardial ischaemia reperfusion injury in diabetic rats[J]. Acta Cardiol, 2008, 63(6):757-762.
- [40] Wang M, Zhang WB, Zhu Jh, et al. Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca²⁺-cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Acta Diabetol, 2010, 47(1):209-218.
- [41] Wang M, Zhang WB, Zhu Jh, et al. Breviscapine ameliorates hypertrophy of cardiomyocytes induced by high glucose in diabetic rats via the PKC signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(8):1081-1091.
- [42] 高福禄, 岳凤鸣. db/db 自发性糖尿病小鼠睾丸 EGFR、c-Fos 表达研究[J]. 解剖学杂志, 2001, 24(6):532-536.
- [43] 龙玲莉, 郑淑慧, 李宇彬. 灯盏花素干预糖尿病模型大鼠睾丸组织增殖细胞核抗原和 c-fos 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(18):2917-2922.
- [44] Vernon SA, Bhagey J, Boraik M, et al. Long-term review of driving potential following bilateral panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy[J]. Diabet Med, 2009, 26(1):97-99.
- [45] 王竞男, 杨立群, 邓宇斌. 灯盏花素对人视网膜色素上皮细胞和糖尿病大鼠视网膜 VEGF 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(5):900-905.
- [46] Wu YG, Xia LL, Lin H, et al. Prevention of early liver injury by breviscapine in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Planta Med, 2007, 73(5):433-438.

(收稿日期:2016-01-28;修回日期:2016-03-02)

(本文编辑:张仲书)

(上接第 283 页)

- [10] 李颖. 淫羊藿 HPLC 指纹图谱的建立与产地、部位成分差异性研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(2):177-178.
- [11] 王玲, 尹华, 李清林, 等. 高效液相色谱法测定补肾活血药对淫羊藿-川芎中阿魏酸和淫羊藿苷的含量[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(5):33-36.
- [12] 罗曼. HPLC 法测定复方杜仲口服液中淫羊藿苷的不确定度评价[J]. 中国药事, 2010, 24(1):88-91.

(收稿日期:2016-01-19;修回日期:2016-03-01)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)