

活血止痛片质量控制方法研究

李刚 (解放军第 94 医院, 南昌 330002)

摘要:目的 研究活血止痛片质量控制方法。方法 采用 TLC对活血止痛片中当归、三七、乳香、冰片和土鳖虫进行定性鉴别;采用 HPLC对活血止痛片中的阿魏酸进行含量测定,色谱柱为 Hypersil ODS2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-1%乙酸水溶液(30:70),检测波长为 320 nm,流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果 薄层色谱鉴别专属性强,阿魏酸进样量在 0.01 ~ 0.14 μg范围内线性关系良好($r=0.9999$),平均加样回收率为 98.60% (RSD = 0.64%)。结论 本方法操作简便,结果可靠,重现性好,可用于活血止痛片的质量控制。

关键词:活血止痛片;阿魏酸;薄层色谱法;高效液相色谱法

中图分类号: R926.23; R931.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)07-0628-03

Studies on the Quality Control Method of Huoxuezhitong Tablets

LI Gang(94th Hospital of PLA, Nanchang 330002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quality control method for Huoxuezhitong tablets. **METHODS** Radix angelicae sinen-

作者简介:李刚,男,主管药师 Tel: (0791) 8848166 E-mail: ligang94@21.cn.com

sis, Radix Notoginseng, Olibanum, Borneolum Syntheticum and Eupolyphaga Seu Steleophaga in Huoxuezhitong tablets were identified by TLC. Ferulic acid in Huoxuezhitong tablets was determined by HPLC. The separation was performed on Hypersil ODS2 column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of methanol-1% acetic acid(30:70) with detection wave length at 320nm and flow rate at 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** TLC identification is a highly specific approach. The calibration curve of ferulic acid was linear within the range of 0.01 ~ 0.14 μg($r=0.9999$), with average recovery at 98.60% ($RSD=0.64\%$). **CONCLUSION** This method is simple, reliable, reproducible, and suitable for the quality control of Huoxuezhitong Tablets.

KEY WORDS: Huoxuezhitong tablets; ferulic acid; TLC; HPLC

活血止痛片是由活血止痛散经过剂型改进而得到的新剂型,原剂型收载于《中国药典》2005版一部^[1],由当归、三七、乳香(制)、冰片、土鳖虫、自然铜(煅)等六味药组成。具有活血散瘀、消肿止痛之功效,用于跌打损伤、瘀血肿痛。为了有效控制该制剂质量,本文对方中当归、三七、乳香、冰片、土鳖虫进行了薄层色谱鉴别,采用高效液相色谱法对其主药当归中的阿魏酸进行含量测定,并对其含量测定方法进行了研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);超声波清洗器 SB3200(上海必能信超声有限公司);METTLER AE240 天平(瑞士)。活血止痛片(自制,批号 20040413、20040416、20040419,规格 0.62 g·片⁻¹);阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0773-9910);薄层硅胶预制板(青岛海洋化工厂);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 薄层鉴别

2.1 当归、乳香的鉴别

取本品 5 片,研细,加乙醚 30 mL,超声提取 30 min,滤过,滤液浓缩至 1 mL,即得供试品溶液;取当归对照药材粉末 0.25 g,加乙醚 10 mL,超声提取 30 min,滤过,滤液浓缩至 1 mL,即得当归对照溶液;取乳香对照药材 0.25 g,研细,加入乙醚 3 mL,超声提取 10 min,静置,取上清液,即得乳香对照溶液;分别取缺当归、乳香阴性样品,依法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 版一部附录 VI B)试验,吸取上述 5 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(9:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视,结果表明:供试品色谱中,在与当归对照药材相应位置上,显相同的兰色荧光斑点。继喷以香草醛硫酸试液,105℃加热至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与乳香对照药材相应位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照均无干扰。

2.2 三七的鉴别

取本品 5 片,研细,加乙醚 30 mL,超声 30 min,滤过,药渣挥去乙醚,加甲醇 30 mL,超声提取 30 min,滤过,滤液水浴蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,移至分液漏斗中,用水饱和正丁醇提取 2 次,每次 15 mL,合并正丁醇提取液,水浴蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液;取人参皂苷 R_g 对照品,人参皂苷 R_b 对照品,三七皂苷 R₁ 对照品,分别加甲醇

制成每 1 mL 各含 1 mg 溶液的人参皂苷 R_b、人参皂苷 R_g、三七皂苷 R₁ 对照品溶液;取缺三七阴性样品,依法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 版一部附录 VI B)试验,吸取上述 5 种溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5)上层液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以硫酸乙醇试液(1→10),105℃加热至斑点显色清晰。结果表明:供试品色谱中,在与对照品相应位置上,显相同颜色的斑点,而阴性对照无干扰。

2.3 冰片的鉴别

取本品 12 片,研细,加水 100 mL,接挥发油提取器(接收管预先加 0.5 mL 乙酸乙酯),照挥发油测定法(中国药典 2005 版一部附录 XD)操作,提取 30 min,收集乙酸乙酯层,即得供试品溶液;取冰片对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 5 mg 的溶液,即得对照品溶液;取缺冰片阴性样品,依法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60℃)-乙酸乙酯(19:2)展开,取出,晾干,喷香草醛硫酸试液,105℃加热至斑点清晰。结果表明:供试品色谱中,在与对照品相应位置上,显相同颜色的斑点,而阴性对照无干扰。

2.4 土鳖虫的鉴别

取样品 2 片,研细,加稀乙醇 10 mL 超声提取 30 min,滤过,滤液浓缩至 2 mL,即得供试品溶液;取地鳖对照药材粉末 0.5 g,加稀乙醇 10 mL,超声提取 30 min,滤过,滤液浓缩至 2 mL,即得对照品溶液;取缺土鳖虫阴性样品,依法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(中国药典 2005 版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-乙酸-水(4:1:5)上层液为展开剂,展开,取出,晾干,喷茚三酮试液,105℃加热至斑点显色清晰。结果表明:供试品色谱中,在与对照药材相应位置上,显相同颜色的斑点,而阴性对照无干扰。

3 含量测定

3.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-1% 乙酸水溶液(30:70);检测波长: 320 nm;流速: 1.0 mL·min⁻¹;进样量: 10 μL。

3.2 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的阿魏酸对照品适量,加 1% 乙酸

甲醇溶液制成 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,摇匀,即得。

3.3 供试品溶液及阴性样品溶液的制备

取活血止痛片 20 片,除去包衣,研细,精密称取粉末约 1.5 g 于棕色锥形瓶中,精密加 1% 乙酸甲醇溶液 25 mL,密塞,称定重量,超声提取 30 min,放冷,称定重量,用 1% 乙酸甲醇溶液补足减失的重量,摇匀,离心,取上清液于 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过,取续滤液,即得。按处方制备不含当归的片剂,并按供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。

3.4 阿魏酸检测波长的选择

将对照品溶液按上述色谱条件进样,在 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描得紫外吸收光谱。结果,对照品溶液在 320 nm 波长处有最大吸收,故选用 320 nm 为其检测波长。

3.5 系统适用性试验

取阿魏酸对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液分别进样,按上述给定的色谱条件测定,记录色谱图,理论塔板数按阿魏酸计算不低于 3 500,阿魏酸峰保留时间约为 12.9 min,结果供试品溶液色谱图在阿魏酸保留时间处有一色谱峰,阴性样品溶液在阿魏酸保留时间处无吸收峰,且阿魏酸峰与相邻杂质峰的分离度符合要求。

3.6 线性关系考察

精密称取阿魏酸对照品 2.5 mg 置 50 mL 棕色量瓶中,加 1% 乙酸甲醇溶液溶解并稀释至刻度,即得 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿魏酸对照品溶液,分别精密量取阿魏酸对照品溶液 2、3、4、5、6、7 mL 置 25 mL 棕色量瓶中,加 1% 乙酸甲醇溶液稀释至刻度,即得 4、6、8、10、12、14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照品溶液,分别吸取 10 μL ,依次进样,以阿魏酸对照品进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,得回归方程为 $Y = 5\,889.513X - 0.2947$, $r = 0.9999$ 。结果表明,阿魏酸在 0.04 ~ 0.14 μg 范围内呈较好的线性关系。

3.7 精密度试验

取对照品溶液,重复测定 5 次,每次 10 μL ,测得峰面积的 RSD 为 0.64%,表明本实验方法精密度较好。

3.8 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 10 μL 按上述色谱条件操作,每间隔 2 h 测定 1 次峰面积,连续测定 5 次,观察其稳定性,结果峰面积 RSD 为 1.0%,可知供试品在 8 h 内稳定。

3.9 重现性试验

按上述供试品溶液制备方法及色谱条件操作,对同一批样品(批号 20040413),制成 5 份供试品溶液,依次进样测定,结果阿魏酸含量平均值为 $163.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.4%,提示本实验重现性良好。

3.10 加样回收率试验

精密称取已测含量的样品(批号 20040413)粉末,分别

精密加入阿魏酸对照品溶液,按上述方法制备供试品溶液,依法测定,得平均回收率为 98.6%, RSD = 0.64% ($n = 6$)。

3.11 样品含量测定

采用上述供试品溶液制备方法及色谱条件,对 3 批活血止痛片中的阿魏酸含量进行测定,结果详见表 1。

表 1 样品含量测定结果 ($n = 3$)

Tab1 Results of sample determination ($n = 3$)

批号	阿魏酸含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$	RSD / %
20040413	100.9	1.72
20040416	105.6	1.93
20040419	109.1	2.12

4 讨论

本品为薄膜衣片,对方中各药分别提取、浓缩,对冰片和挥发油采用 β -环糊精包合,欧巴代 II 薄膜包衣,具有稳定性好,用料少,片重增加小,衣层机械强度高,对药物崩解度影响小以及外观色泽稳定、美观等优点。

在供试品溶液的制备中,笔者分别考察了超声提取 10、20、30、45 min 后所得样品阿魏酸含量,结果表明 30 min 即可提取完全。

笔者在研究阿魏酸的 HPLC 分析方法时,发现阿魏酸对照品有杂质峰,而且用水或甲醇配制的阿魏酸对照品溶液不稳定,阿魏酸峰逐步降低,与此同时,杂质峰逐渐增大。试验比较了甲醇、1% 甲酸甲醇溶液、1% 醋酸甲醇溶液三种提取溶剂,结果表明阿魏酸在 1% 醋酸甲醇溶液中较稳定,杂质不干扰阿魏酸的测定。原因可能是阿魏酸是一种顺反异构体,反式阿魏酸结构较稳定,在放置过程中可能是转变成了顺式阿魏酸,而在含醋酸溶液中,反式阿魏酸更稳定^[2]。但阿魏酸含量随放置时间会有很大变化,应置棕色瓶中,最好现用现配^[3]。

综上所述,本法操作简便,结果可靠,重现性好,可以有效控制本品的质量。

参考文献

- [1] Ch. P (2005) Vol II (中国药典 2005 年版,二部) [S]. 2005: 546.
- [2] DING M Y, MA S W, LIU D L. Stability of ferulic acid and its existing form in Ligusticum chuanxiong and Angelica sinensis [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2004, 35(1): 28 - 30.
- [3] TANG H, MA C X. Determination of Ferulic acid in compound Angelia chinensis Injection by RP - HPLC [J]. Chin Pharm (中国药师), 2005, 8(9): 739 - 740.

收稿日期: 2007-12-04