

·质量分析研究·

三虎痛风颗粒质量标准研究

林钦贤¹, 唐业建², 王 岩¹, 吴淑媛¹, 王 婴¹ (1. 广东药学院, 广东 广州 510006; 2. 广西中医学院第一附属医院, 广西 南宁 530023)

摘要: **目的** 建立三虎痛风颗粒的质量标准。**方法** 采用 TLC 对方中的虎杖、葛根、防己、蒲公英、土牛膝、广金钱草进行定性鉴别; 采用 RP-HPLC 测定虎杖苷、大黄素的含量。**结果** TLC 专属性强, 简单可行。虎杖苷 HPLC 在 0.042~0.336 μg 范围内呈线性关系($r=0.9999$), 平均回收率为 101.33 % (RSD=1.24 %, $n=6$)。大黄素在 0.0972~0.7776 μg 范围内呈线性关系($r=0.9996$), 平均回收率为 101.13 % (RSD=1.73 %, $n=6$)。**结论** 本法操作简单、可靠、准确, 重复性好, 可用于本制剂的质量控制。

关键词: 三虎痛风颗粒; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 虎杖苷; 大黄素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0393-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.018

Study on Quality Standard of Sanhu Tongfeng Granula

LIN Qinxian¹, TANG Yejian², WANG Yan¹, WU Suyuan¹, WANG Ying¹ (1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi College of Chinese Medicine, Nanning 530023 Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To establish the quality standard of *Sanhu Tongfeng granula*. **Methods** Rhizoma Polygoni Cuspidati, Radix Puerariae, Radix Stephaniae Tetrandrae, Herba Taraxaci, Radix et Rhizoma Achyranthes and Herba Desmodii in the recipe were identified by TLC. The contents of polydatin and emodin were determined by RP-HPLC. **Results** TLC identification method was simple and feasible with high specificity. Polydatin had good linearity in a range of 0.042 ~ 0.336 μg ($r=0.9999$). The average recovery was 101.33 %, and RSD was 1.24 % ($n=6$). Emodin had good linearity in a range of 0.0972 ~ 0.7776 μg ($r=0.9996$). The average recovery was 101.13 %, and RSD was 1.73 % ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, reliable and accurate with good repeatability, and can be applied as the quality control method for *Sanhu Tongfeng granula*.

Keywords: *Sanhu Tongfeng granula*; TLC; HPLC; Polydatin; Emodin

三虎痛风颗粒以虎杖、葛根、防己等中药经提取精制而成, 是广西中医学院第一附属医院临床应用多年的经验方, 具有活血通络、散瘀止痛等功效, 可用于治疗各类风湿病, 临床疗效稳定。为了更好地控制该制剂的质量, 对本制剂中虎杖、葛根、防己等药材进行定性鉴别, 并对其君药虎杖中的虎杖苷、大黄素进行了含量测定, 以控制三虎痛风颗粒

的质量。

1 仪器与材料

LC-20AT 高效液相色谱仪、SPD-20A 紫外检测器(日本岛津); KQ3200 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); ZF-2 型四用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂)。虎杖苷、大黄素、葛根素、齐墩

收稿日期: 2013-01-28

作者简介: 林钦贤, 男, 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与质量控制研究。Email: linqx2011@gmail.com。通讯作者: 王岩, 博士, 教授, 研究方向: 药物新剂型与质量控制研究。Email: gdpwy@126.com。

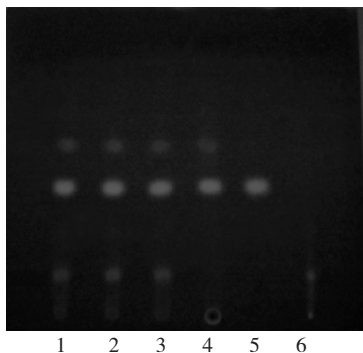
基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻-10124008-5)。

果酸对照品, 中国药品生物制品检定所, 批号分别为 1535-200001, 110756-200110, 110752-200511, 110709-200505。三虎痛风颗粒, 广西中医学院第一附属医院, 批号: 120409, 120410, 120411。甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 虎杖的 TLC 鉴别^[1] 取本品 5 g, 研细, 加甲醇 20 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 2.5 mol·L⁻¹ 硫酸溶液 10 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 用三氯甲烷振摇提取 2 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 取虎杖对照药材 0.1 g, 同法制成对照药材溶液; 取大黄素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。另取缺虎杖药材的阴性样品 5 g, 同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 版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述溶液各 5 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(30~60 °C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯下(365 nm)检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照溶液无干扰, 见图 1。



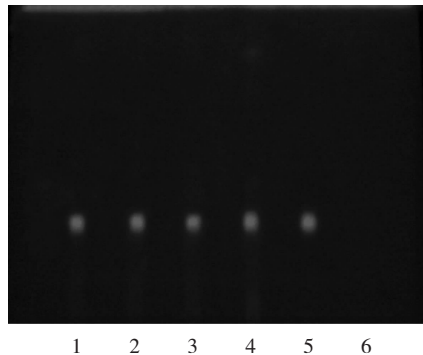
1~3. 样品; 4. 对照药材; 5. 对照品; 6. 阴性

图 1 虎杖 TLC 图

Figure 1 The TLC chromatogram of Rhizoma Polygoni Cuspidati

2.1.2 葛根的 TLC 鉴别^[2] 取本品 5 g, 研细, 加乙酸乙酯 20 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; 取葛根对照药材 0.5 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 15 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; 取葛根素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液; 取缺葛根的阴性样品 5 g, 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 版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述溶液各 5 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(14:5:0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯下(365 nm)检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰, 见图 2。

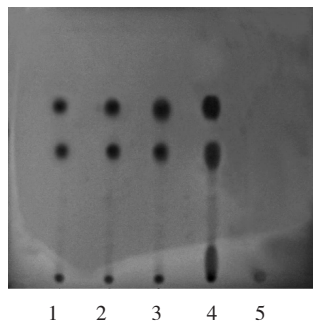


1~3. 样品; 4. 对照药材; 5. 对照品; 6. 阴性

图 2 葛根 TLC 图

Figure 2 The TLC chromatogram of Radix Puerariae

2.1.3 防己的 TLC 鉴别^[3] 取本品 5 g, 研细, 加乙醇 20 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸适量使溶解, 用浓氨试液调至 pH=9 以上, 再用环己烷-乙酸乙酯(1:3)萃取, 蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液; 取防己对照药材 0.1 g, 同法制成对照药材溶液; 取缺防己的阴性样品 5 g, 同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述溶液各 5 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-丙酮-甲醇(6:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以稀碘化铋钾试液-三氯化铁试液(10:1), 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 见图 3。

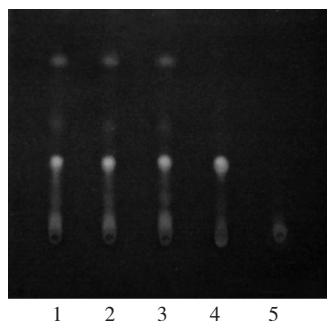


1~3. 样品; 4. 对照药材; 5. 阴性

图 3 防己 TLC 图

Figure 3 The TLC chromatogram of Radix Stephaniae Tetrandrae

2.1.4 蒲公英的 TLC 鉴别^[1,4-5] 取本品 1 g, 研细, 加 5 % 甲酸的甲醇溶液 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 滤过, 滤液用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 10 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取蒲公英对照药材 0.1 g, 同法制成对照药材溶液; 取缺蒲公英的阴性样品 1 g, 同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 6 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸(10 : 9 : 2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光下(365 nm)检视。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, 见图 4。



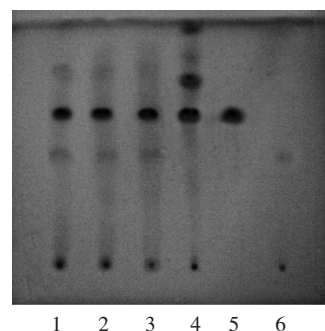
1~3. 样品; 4. 对照药材; 5. 阴性

图 4 蒲公英 TLC 图

Figure 4 The TLC chromatogram of Herba Taraxaci

2.1.5 土牛膝的 TLC 鉴别 取本品 5 g, 研细, 加 75 % 乙醇 50 mL, 加热回流 40 min, 滤过, 滤液加盐酸 2 mL, 加热回流 1 h, 浓缩至 5 mL, 加水 10 mL, 用石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C) 20 mL 振摇提取, 石油醚液蒸干, 残渣加乙酸乙酯 2 mL 溶解, 作为供试品溶液; 取土牛膝对照药材 0.1 g, 同法制成对照药材溶液; 取齐墩果酸对照品, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液; 取缺土牛膝的阴性样品 5 g, 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 版一部附录 VI B) 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, 以环己烷 - 丙酮 - 乙酸乙酯(5 : 2 : 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10 % 硫酸乙醇溶液, 在 110 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰, 见图 5。

2.1.6 广金钱草的 TLC 鉴别^[6] 取本品 5 g, 研细, 加乙醇 30 mL, 静置过夜, 滤过, 滤液加盐酸 0.5 mL,

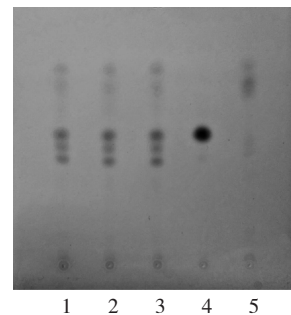


1~3. 样品; 4. 对照药材; 5. 对照品; 6. 阴性

图 5 土牛膝 TLC 图

Figure 5 The TLC chromatogram of Radix et Rhizoma Achyrantes

加热回流 40 min, 滤过, 滤液蒸至无醇味, 加水至 15 mL 使溶解, 用氨试液调 pH 至 9~10, 用三氯甲烷振摇提取 2 次(20, 15 mL), 合并三氯甲烷液, 用 1 % 盐酸溶液振摇提取 3 次 (15, 10, 10 mL), 合并盐酸提取液, 并用氨试液调 pH 至 9~10, 用三氯甲烷振摇提取 2 次(15, 10 mL), 合并三氯甲烷液, 浓缩至干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 滤过, 滤液作为供试品溶液; 取广金钱草对照药材 0.1 g, 加含 1 % 盐酸的 70 % 乙醇溶液 30 mL, 从加热回流 40 min 起, 同法制成对照药材溶液。取缺广金钱草阴性样品, 同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 版一部附录 VI B)试验, 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 - 甲醇 - 浓氨试液(19 : 1 : 0.1) 为展开剂, 预饱和 15 min, 上行展开, 取出, 晾干, 喷以 0.5 % 茚三酮乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。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, 结果见图 6。



1~3. 样品; 4. 对照药材; 5. 阴性

图 6 广金钱草 TLC 图

Figure 6 The TLC chromatogram of Herba Desmodii

2.2 虎杖苷含量测定

2.2.1 色谱条件^[7] 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充

剂,乙腈-水(20:80)为流动相,检测波长为306 nm,流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为30℃,进样量为20 μL。理论板数按虎杖苷峰计算应不低于3000。

2.2.2 供试品溶液的制备 取三虎痛风颗粒适量,研细,取约1 g,精密称定,置50 mL棕色容量瓶中,加入甲醇40 mL,超声处理(功率100 W,频率40 Hz)30 min,取出,放冷,加甲醇定容至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.2.3 标准曲线的制备 精密称取虎杖苷对照品1.05 mg,制成每1 mL含21 μg的溶液,作为对照品贮备液。精密量取储备液1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL,分别置10 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,依次进样测定,以峰面积对进样量(μg)进行回归,得线性方程为 $Y=124086X-22424(r=0.9999)$,虎杖苷在0.042~0.336 μg与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验 精密吸取7.92 μg·mL⁻¹的虎杖苷对照品溶液20 μL,按上述色谱条件连续重复进样6次,结果虎杖苷峰面积的RSD为1.39%,表明精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取同批样品(批号:120411)共6份,按供试品溶液制备方法平行制备,按上述方法测定,结果虎杖苷平均含量0.144 mg·g⁻¹,RSD值为1.13%。

2.2.6 稳定性试验 取2.2.5项下的同一瓶供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h进样20 μL,依法测定,结果虎杖苷峰面积的RSD为0.72%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.7 专属性试验 取缺虎杖药材的阴性样品1 g,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各20 μL,按上述色谱条件进样测定,结果阴性对照无干扰,说明该法具有良好的专属性,见图7。

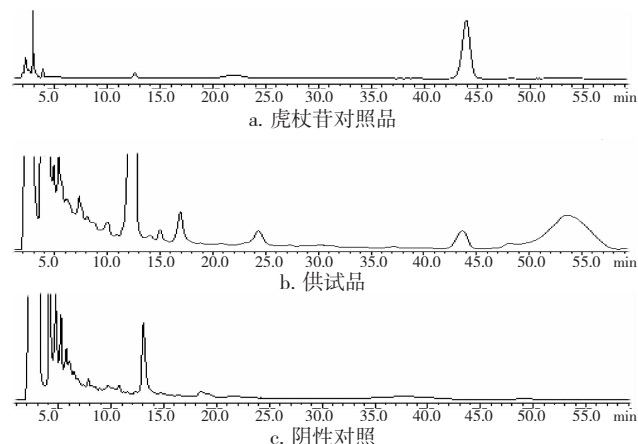


图7 虎杖苷HPLC图

Figure 7 HPLC chromatograms of Polydatin

2.2.8 回收率试验 取同一批已知含量的样品(批号:120411)6份,每份取约0.5 g,精密称定,置50 mL棕色量瓶中,分别精密加入0.0882 mg·mL⁻¹的虎杖苷对照品溶液1.0 mL,按供试品溶液的制备方法处理,依法测定,计算回收率,结果见表1。

表1 虎杖苷加样回收率试验(n=6)

Table 1 Results of recovery tests of Polydatin(n=6)

称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.5012	0.0851	0.0882	0.1728	99.43	101.36	1.24
0.5089	0.0864	0.0882	0.1751	100.57		
0.5049	0.0857	0.0882	0.1749	101.13		
0.5124	0.0870	0.0882	0.1771	102.15		
0.5179	0.0879	0.0882	0.1778	101.93		
0.5343	0.0907	0.0882	0.1815	102.95		

2.2.9 样品测定 分别取3批三虎痛风颗粒(批号:120409, 120410, 120411),每批2份,取1 g,精密称定,按上述方法制成供试品溶液,依法测定,计算虎杖苷的含量,结果三批样品中虎杖苷的含量分别为0.162, 0.168, 0.153 mg·g⁻¹。

2.3 大黄素含量测定

2.3.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲醇-0.1%磷酸溶液(80:20)为流动相,检测波长为254 nm,流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为30℃,进样量为20 μL。理论板数按大黄素峰计算应不低于3000。

2.3.2 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,取1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率100 W,频率40 Hz)30 min,取出,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5 mL,蒸干,残渣加2.5 mol·L⁻¹硫酸溶液10 mL使溶解,加三氯甲烷10 mL,加热回流1 h,取出,放冷,移至分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,并一同转入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷洗涤2次,每次10 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 标准曲线的制备 精密称取大黄素对照品2.43 mg,加甲醇制成每1 mL含48.6 μg的溶液,作为对照品贮备液。精密量取储备液1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL,分别置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别依法测定,以进样量(μg)为横坐标X,以峰面积为纵坐标Y绘制标准曲线,回归得线性方程 $Y=92050X+27726(r=0.9996)$,大黄素在0.0972~0.7776

μg 呈良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验 精密吸取 19.44 μg·mL⁻¹ 的大黄素对照品溶液 20 μL，按上述色谱条件连续重复进样 6 次，结果大黄素峰面积的 RSD 为 0.66 %，表明精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取同批样品(批号：120411)共 6 份，按供试品溶液制备方法平行制备，按上述方法测定，结果大黄素平均含量 0.655 mg·g⁻¹，RSD 值为 0.57 %。

2.3.6 稳定性试验 取重复性项下的同一瓶供试品溶液，分别于 0，2，4，8，12，24 h 进样 20 μL，依法测定，结果大黄素峰面积的 RSD 为 0.41 %，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 专属性试验 取缺虎杖药材的阴性样品 1 g，按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。分别精密吸取大黄素对照品、供试品、阴性对照溶液各 20 μL 进样测定，结果阴性对照无干扰，说明该法具有良好的专属性。结果见图 8。

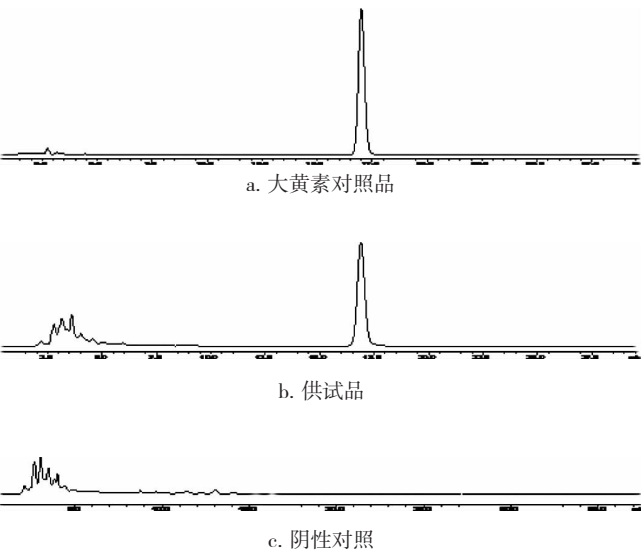


图 8 大黄素 HPLC 色谱图
Figure 8 HPLC chromatograms of Emodin

2.3.8 回收率试验 取同一批已知含量的样品(批号：120411)6 份，每份约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入 0.292 mg·mL⁻¹ 的大黄素对照品溶液 1.0 mL，按供试品溶液的制备方法处理，依法测定，计算回收率，结果见表 2。

2.3.9 样品测定 分别取 3 批三虎痛风颗粒(批号：120409，120410，120411)，每批 2 份，取 1 g，精密称定，按上述方法制成供试品溶液，依法测定，计算大黄素的含量，结果 3 批样品中大黄素的含量

表 2 大黄素加样回收率试验(n=6)

Table 2 Results of recovery tests of Emodin(n=6)						
称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.5088	0.3331	0.292	0.6254	100.10	101.01	1.78
0.5111	0.3346	0.292	0.6312	101.58		
0.5032	0.3294	0.292	0.6299	102.91		
0.5105	0.3342	0.292	0.6347	102.91		
0.5213	0.3413	0.292	0.6284	98.32		
0.5208	0.3410	0.292	0.6336	100.21		

分别为 0.713，0.657，0.652 mg·g⁻¹。

3 讨论

本研究建立的 TLC 法对方中虎杖、葛根、防己、蒲公英、土牛膝、广金钱草有较好的适宜性，选择的展开剂分离效果理想，而且重复性较好，阴性无干扰。确定最佳展开条件后，对影响因素进行研究^[7]。分别考察了不同温度(4，25，40 ℃)，不同湿度(32，65，88 %)，以及不同点样量对分离效果的影响，结果表明，所建立的方法在不同温度、湿度条件下主斑点显色清晰，无拖尾现象，选取的最佳点样量薄层斑点集中、圆整。

在虎杖苷、大黄素的 HPLC 含量测定中，参照《中国药典》虎杖药材的测定方法^[1]，虎杖苷峰易受到杂质峰干扰，经过多次调整流动相组成和比例，改用乙腈-水(20：80)为流动相，峰形良好，分离度得到改善；试验优化了供试品溶液的制备条件，包括提取方法、提取时间、溶剂用量的选择，并进行了系统的方法学研究，所建立的方法简便、重复性好，结果准确可靠，可用于该制剂的质量控制。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：195，331.
[2] 胡航，杨丽娜. 新身痛逐瘀汤的薄层色谱鉴别研究[J]. 辽宁中医药大学学报，2010，12(5)：231-232.
[3] 姜建民，夏正燕，冯璞. 糖足颗粒质量标准研究[J]. 中国现代应用药学，2010，27(8)：714-717.
[4] 梁少强，谢仕伟，李国荣，等. 舒肝益脾合剂的薄层色谱鉴别[J]. 中国医药指南，2010，8(1)：48-49.
[5] 曾聪彦，梅全喜. 和胃消痞合剂质量标准研究[J]. 辽宁中医杂志，2012，39(11)：2241-2243.
[6] 饶燕. 消石合剂的质量控制[J]. 今日药学，2008，18(4)：78-79.
[7] 王岩，陈佩玲，白玉春，等. 野牡丹止痢片的薄层鉴别研究[J]. 今日药学，2011，21(1)：30.

(编辑：宋威)