

头风痛丸定性定量方法的研究

宋莉, 乔蓉霞, 刘海静

(陕西省食品药品检验所, 西安 710061)

摘要 目的: 建立头风痛丸的定性定量方法, 更好地控制产品质量。方法: 采用薄层色谱法对方中的 3 味药材(白芷、川芎、绿茶)进行鉴别, 采用高效液相色谱法测定君药白芷中欧前胡素的含量, 以甲醇-水(60:40)为流动相, 在 248 nm 波长处检测。结果: 薄层色谱鉴别方法专属性好, 斑点清晰, 分离度好, 阴性样品无干扰; 高效液相色谱法测定, 欧前胡素在 0.023 ~ 0.23 μg 范围内线性关系良好($r=0.9999$); 平均回收率($n=6$)为 97.7%, $\text{RSD}=1.9\%$ 。结论: 本方法能准确地进行定性、定量, 且专属性强, 灵敏度高, 重复性好, 可用于头风痛丸的质量控制。

关键词: 头风痛丸; 白芷; 川芎; 绿茶; 欧前胡素; 定性定量; 薄层色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)12-2236-04

Study on qualitative and quantitative method of Toufengtong pills

SONG Li, QIAO Rong-xia, LIU Hai-jing

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710061, China)

Abstract Objective: To establish a qualitative and quantitative method of Toufengtong pills for the best quality control. **Methods:** TLC method was used to identify three herbal medicines(Radix Angelicae Dahuricae; Rhizoma Chuanxiong; Folium Camelliae) in prescription. HPLC method was used to determine the content of imperatorin in Radix Angelicae Dahuricae. The mobile phase was methyl alcohol-water(60:40) and determined at 248 nm. **Results:** Three herbal medicines in prescription were distinguished exclusively with clear spots and good separation by TLC. For HPLC determination, the imperatorin showed good linear relationship($r=0.9999$) in the range of 0.023 ~ 0.23 μg , the average recovery($n=6$) was 97.7% with RSD of 1.9%. **Conclusion:** This method has a strong specificity, high sensitivity and fine conclusion and can be used in qualitative and quantitative analysis accurately for the quality control of Toufengtong pills.

Key words: Toufengtong pills; Radix Angelicae Dahuricae; Rhizoma Chuanxiong; Folium Camelliae; imperatorin; qualitative and quantitative method; TLC; HPLC

头风痛丸现行质量标准收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第九册,是由白芷、川芎、绿茶 3 味药材原粉入药的中药复方制剂,有祛风止痛的功效,主要用于偏头痛、眉棱骨痛、额窦炎。原标准中无[含量测定]项,[鉴别]仅为一项显微鉴别和一项化学反应鉴别。为更好地控制本制剂的内在质量,本文采用薄层色谱法对方中白芷、川芎、绿茶 3 味药材进行薄层鉴别,采用高效液相色谱法测定君药白芷中欧前胡素的含量。本法的质量控制指标较为客观、合理,方法专属性强、灵敏度高、重复性好,从而可有效地控制头风痛丸的质量。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱仪、Waters 2487 紫外检测器、Empower 色谱工作软件; Sartorius AG ME235S、BS224S 电子分析天平; H66025 型超声清洗仪; 硅胶 G 及 GF₂₅₄(60 型)均为化学纯,青岛海洋化工有限公司。

对照品欧前胡素(批号 110826-200410)、咖啡因(批号 171215-200507)及对照药材白芷(批号 120945-200406)和川芎(批号 120918-200809)均购自中国食品药品检定研究院。头风痛丸样品由吉林康福药业有限公司(水丸 8 g·袋⁻¹)和重庆希尔

安药业有限公司(水丸 $60\text{ g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)提供;阴性样品用吉林康福药业有限公司提供的药材自制。高效液相色谱流动相用甲醇为色谱纯,购买自美国天地公司;其他试剂均为分析纯,购买自天津化学试剂有限公司;水为去离子水;

2 薄层色谱鉴别

2.1 白芷、川芎 参照中国药典 2010 年版一部^[1]及白芷的水溶性成分研究^[2]报道,初步拟定对白芷中的欧前胡素和异欧前胡素进行薄层色谱鉴别,参考文献报道^[3~6]对白芷的薄层鉴别进行了实验。基于一测多评的方针,考虑用一种方法同时鉴别白芷和川芎,查阅了川芎鉴别的相关文献^[7~15],经过多次试验确定薄层色谱鉴别方法如下:取样品 5 g ,研细,加石油醚($60 \sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) 20 mL ,密塞,超声处理 30 min ,滤过,滤液浓缩至约 1 mL ,作为供试品溶液;取对照药材白芷、川芎各 0.5 g ,分别同法制成对照药材溶液;取按处方和制法制备去除白芷和川芎的阴性样品 0.3 g ,同供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。吸取上述供试品溶液、对照药材溶液及阴性样品溶液各 $10\text{ }\mu\text{L}$,分别点于同一自制硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯($17:3$)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。样品色谱中,在与白芷对照药材色谱相应位置上,显相同的 2 个黄色荧光斑点;在与川芎对照药材色谱相应位置上,显相同的亮蓝色荧光斑点;阴性样品色谱中无相应斑点。见图 1。

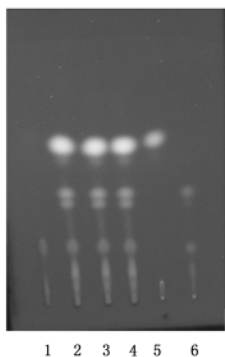


图 1 白芷、川芎薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram of Radix Angelicae Dahuricae and Rhizoma Chuanxiong

1. 阴性样品(negative sample without Radix Angelicae Dahuricae and Rhizoma Chuanxiong) 2~4. 头痛丸样品(sample) 5. 川芎对照药材(reference crude drug of Rhizoma Chuanxiong) 6. 白芷对照药材(reference crude drug of Radix Angelicae Dahuricae)

2.2 绿茶的薄层色谱鉴别

文献报道绿茶中主要测定的成分为茶多酚类及咖啡因^[16],查阅相关含绿茶制剂中咖啡因的薄层鉴别方法^[17~20],经过多次实验确定薄层鉴别方法如下:取本品 5 g ,研细,加甲醇 30 mL ,密塞,超声处理 30 min ,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,加氯仿 20 mL 振摇提取,取氯仿液低温蒸干,残渣加氯仿 1 mL 使溶解,作为供试品溶液;取咖啡因对照品适量,加氯仿制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液;取按处方和制法制备去除绿茶的阴性样品 0.3 g ,同供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。吸取上述 3 种溶液各 $5\text{ }\mu\text{L}$,分别点于同一自制硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以甲苯-丙酮-甲醇-浓氨试液($20:4:3:0.5$)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。样品色谱中,在与对照品色谱相应位置上,显相同颜色的斑点。见图 2。

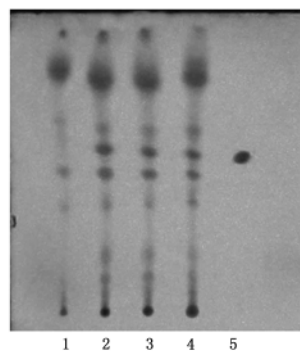


图 2 绿茶薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatogram of Folium Camelliae

1. 阴性样品(negative sample without Folium Camelliae) 2~4. 头痛丸样品(sample) 5. 咖啡因对照品(reference substance of caffeine)

3 含量测定

参照中国药典 2010 年版一部^[1]及文献报道有关白芷的含量测定方法^[20~22],确定方法如下:

3.1 色谱条件 色谱柱: SUNTEK Kromasil C₁₈($5\text{ }\mu\text{m}$ $250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$);流动相: 甲醇-水($60:40$);流速: $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长: 248 nm ;柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取欧前胡素对照品 10.22 mg 和 5.68 mg ,分别置于 100 mL 和 50 mL 量瓶中,加甲醇使溶解,定容至刻度;再各精密吸取 5 mL ,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得浓度分别为 $10.22\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $11.36\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

3.2.2 供试品溶液 精密称取样品约 0.5 g,置 50 mL 量瓶中,加甲醇约 40 mL,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 60 min,放冷,用甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得^[1]。

3.2.3 阴性对照溶液 取缺白芷药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

3.3 阴性干扰试验 取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液,按上述色谱条件测定,记录色谱图。结果表明样品色谱中欧前胡素峰与相邻成分峰达到基线分离,且阴性对照无干扰。见图 3。

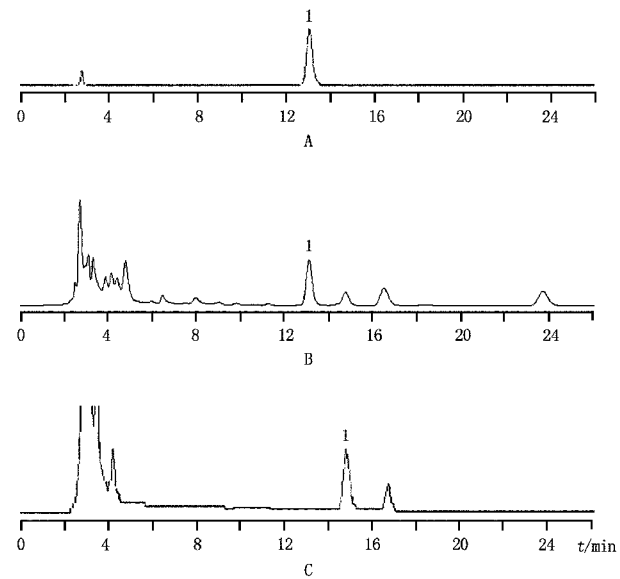


图 3 对照品(A)、头风痛丸样品(B)及阴性对照(C) HPLC 图
Fig 3 HPLC chromatograms of reference substance(A), sample(B) and negative sample without Radix Angelicae Dahuricae(C)
1. 欧前胡素(imperatorin)

3.4 方法学考察

3.4.1 线性关系考察 精密吸取“3.2.1”项下 11.36 μg · mL⁻¹对照品溶液 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL,分别置 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件进样 2 μL,以对照品的进样量 X (μg) 为横坐标,以峰面积积分值 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为:

$$Y = 4.814 \times 10^6 X + 1.159 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

结果表明,欧前胡素在 0.023 ~ 0.23 μg 范围内线性关系良好。

3.4.2 精密度试验 按上述色谱条件,精密吸取 11.36 μg · mL⁻¹对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,以欧前胡素对照品峰面积计算 RSD (n = 6) 为 0.25%。

3.4.3 稳定性试验 取同一批样品,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述相同色谱条件下分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定欧前胡素的峰面积,计算 RSD (n = 6) 为 0.95%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

3.4.4 重复性试验 取同一批样品 6 份,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,结果 6 份样品中欧前胡素含量平均值 (n = 6) 为 0.81 mg · g⁻¹,RSD 为 2.3%。

3.4.5 回收率试验 取已知含量 (0.81 mg · g⁻¹) 的同一批样品 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别精密加入浓度为 0.1022 mg · mL⁻¹的欧前胡素对照品溶液各 2 mL,按“3.2.2”项下方法制备供试溶液,并按上述色谱条件进行测定,计算回收率,平均回收率 (n = 6) 为 97.7%,RSD 为 1.9%。

3.5 样品测定 分别取不同批号的头风痛丸,按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,用外标法计算含量,结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 (n = 6)
Tab 1 Results of samples

生产单位 (manufactory)	批号 (Lot No.)	含量 (content) /mg · g ⁻¹
吉林省康福药业有限公司	20051101	0.84
(Jilin Kangfu Pharmaceutical Co., LTD.)	20060101	0.78
	20060501	0.92
重庆希尔安药业有限公司	060301	0.79
(Chongqing Healn Pharmaceutical Co., LTD.)	060601	0.78
	060701	0.77

4 讨论

4.1 参照中国药典 2010 年版一部白芷项下含量测定方法,采用甲醇为溶剂超声提取^[1],比较了超声不同时间 (30、40、50、60、70 min) 欧前胡素的提取率,结果表明超声 60 min 已基本提取完全,故确定超声提取时间为 60 min。

4.2 白芷含量测定中,中国药典 2010 年版一部规定检测波长为 300 nm;通过扫描欧前胡素的紫外光谱图发现,248 nm 和 300 nm 有 2 个吸收峰,最大吸收峰为 248 nm,实验发现在 248 nm 处测定信号更灵敏,其他成分对所测定成分无干扰,故本文将白芷的检测波长调整为 248 nm。

4.3 参考中国药典 2010 年版一部,选用不同色谱

柱(Koromasil ,SHISEIDO ,Diamond) 对流动相进行了选择,考察了甲醇-水系统不同比例的分离效果,最终选用甲醇-水(60:40),能将欧前胡素峰与其他峰很好地分离,便于操作。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 38-97
- 2 YOU Xiao-lin(游小琳), LI Li(李丽), XIAO Yong-qing(肖永庆). Studies on chemical constituents from the water-soluble part of root of *Angelica dahurica*(白芷水溶性部分化学成分研究). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2002 27(4): 279
- 3 ZHANG Cui-ying(张翠英), ZHU Bao-zhu(朱宝珠), LI Zhen-guo(李振国) *et al.* Study on quality control of *Angelica dahurica*(白芷饮片质量研究). *Drug Stand China*(中国药品标准), 2007 8(6): 58
- 4 SU Jie(宿洁), MIAO Yan(苗艳), WU Ai-ying(吴爱英). The study of TLC about Fangzhi rhinitis tablet(防芷鼻炎片的薄层色谱鉴别). *China Pharm*(中国药师) 2008 11(9): 1129
- 5 ZHANG Ying-na(张映娜), FAN Mei-juan(范梅娟), LI Yang-hua(李阳华) *et al.* Study on quantitation and quantitation of Danxiang Biyan tablets(胆香鼻炎片定性定量方法的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010 30(8): 1502
- 6 SHEN Juan(沈娟), LIU Yun(刘云), YIN Rui(尹蕊) *et al.* Study on quality control methods of compound Wulong capsules(复方乌龙胶囊的质量控制方法研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2005 25(5): 587
- 7 JIANG Gui-hua(蒋桂华), CHEN Su-lan(陈素兰), WU Yuan-yuan(吴媛媛) *et al.* The application and quality control on the compound prescription of Rhizoma Chuanxiong(川芎在中药复方制剂中的使用及质量控制). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2008 19(3): 615
- 8 GAN Ye-mei(甘业梅), ZENG Ling(曾玲). Study on quality standard for Chuanxiong(川芎药材质量标准研究). *Chin J Inf TCM*(中国中医药信息杂志) 2007 14(11): 48
- 9 LIU Zhi-hui(刘志辉), XIE He-bing(谢和兵), QIAN Fang(钱芳). The study of TLC about Rhizoma Chuanxiong in Buyang Huanwu mixture(补阳还五合剂中川芎薄层定性方法研究). *Chin Pharm Aff*(中国药事) 2008 22(5): 420
- 10 LIU Ning(刘宁). Study of TLC identification for Xiaoshuan oral solution(消栓口服液的薄层色谱法鉴别研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008 28(11): 1937
- 11 DENG Shao-wei(邓少伟), MA Ling-yun(马玲云), CHENG Xian-long(程显隆) *et al.* Study on the quality control standardization of GuanXinjing tablets(冠心静片的质量标准研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2006 26(7): 901
- 12 ZHAI Hong-yan(翟宏焱), WU De-ling(吴德玲), CHENG Shi-yun(程世云) *et al.* Study on qualitative and quantitative methods for Zaizao pills(再造丸定性定量方法研究). *Chin J Pharm A-*

- nal*(药物分析杂志) 2011 31(1): 107
- 13 ZHAO Xin-jie(赵新杰), XIA Hua-ling(夏华玲). Studies on quality standard for Guyan Busui pill(骨炎补髓丸的质量标准研究). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2006 17(7): 1242
- 14 LENG Wen-jin(冷文金), KUANG Ying(况瑛), SHEN Wen-hua(沈文华). Study on quality standard for Xinfang rhinitis capsules(辛芳鼻炎胶囊质量标准研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007 27(02): 278
- 15 LIANG Yi(梁懿), MENG Lian-qiong(蒙连琼). Study on the quality control standard of Tianqi Tongjing capsules(田七痛经胶囊检测方法的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008 28(2): 278
- 16 GAO Yan-hui(高彦慧), LI Bao-qiu(厉保秋), XIE Chun-feng(谢春锋) *et al.* Determination of tea polyphenols and caffeine in green tea at different harvest time(绿茶在不同采收期多酚及咖啡因的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007 27(11): 1790
- 17 ZHAO Qing-lan(赵清岚), YANG Jing(杨静), BAI Bing(白冰) *et al.* Simultaneous determination of EGCG, ECG and caffeine in green teas by thin layer chromatography scanning(薄层扫描法同时测定绿茶中的EGCG、ECG和咖啡因). *J Henan Univ(Nat Sci)* [河南大学学报(自然科学版)] 2009 39(3): 256
- 18 LUO Jing-Hua(罗敬华), LIAO Li-Ying(廖立英). Identification and isolation of paracetamol, caffeine, chlorphenamine-maleate and calculus-bovis in Suxiao-Shangfeng Jiaonang by TLC(薄层色谱法分离鉴别速效伤风胶囊中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏和人工牛黄). *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2002 22(5): 290
- 19 LÜ Chang-huai(吕长淮). To change an identifying method on TLC of paracetamol, caffeine, artificial cow-bezoar and chlorphenamine maleate capsules(氨咖黄敏胶囊薄层色谱鉴别方法的改进). *Anhui Med Pharm J*(安徽医药) 2006 10(2): 109
- 20 ZHAO Bo-nian(赵渤年), LIU Qing(刘青), DING Xiao-yan(丁晓彦). HPLC determination of imperatorin in Jiweiqianguo granules(HPLC 法测定九味羌活颗粒中欧前胡素的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007 27(12): 1967
- 21 YE Xiang-yang(叶向阳), LU Qi-wen(卢绮雯). Content determination of imperatorin in compound Toutong tablets by HPLC(高效液相色谱法测定复方头痛片中欧前胡素的含量). *Drug Stand China*(中国药品标准) 2007 8(6): 72
- 22 WANG Xiao-wei(王晓炜), XIONG Ying(熊英), CHEN Li-ying(陈丽英). HPLC determination of imperatorin and iso-imperatorin in Yuanhu Zhitong tablets(元胡止痛片中欧前胡素和异欧前胡素含量的 HPLC 测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005 25(8): 927

(本文于2010年12月8日收到)