

· 研究报告 ·

景天止痛膏质量标准研究

胡丹¹, 尹明², 王习文¹, 曹红¹, 张贵英¹, 苏传洋¹, 张帅¹ (1. 中国人民解放军联勤保障部队药品仪器监督检验总站, 北京 100166; 2. 解放军总医院第二医学中心急诊医学科, 国家老年疾病临床研究中心 北京 100853)

[摘要] 目的 修订景天止痛膏质量标准中的测定方法。方法 采用薄层色谱法(TLC)对当归、川芎、元胡、三七总皂苷进行定性鉴别, 应用高效液相色谱法(HPLC)测定制剂中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 的含量。结果 TLC法鉴别专属性强, 分离度好; 三七皂苷 R₁ 在 0.1604 ~ 2.0050 μg ($r=0.999$)、人参皂苷 R_{g1} 在 0.8003 ~ 10.0035 μg ($r=1.000$)、人参皂苷 R_{b1} 在 0.6182 ~ 7.7275 μg ($r=1.000$) 范围内呈良好的线性关系, 加样回收率分别为 101.43%、98.75%、100.95%, 相对标准偏差(RSD)分别为 2.56%、2.71%、2.75%。结论 本方法准确可靠、灵敏度高, 可用于景天止痛膏的质量控制。

[关键词] 景天止痛膏; 质量标准; 高效液相色谱法; 薄层色谱

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2022)02-0157-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202109050

Study on quality standard of Jingtian Zhitong cream

HU Dan¹, YIN Ming², WANG Xiwen¹, CAO Hong¹, ZHANG Guiying¹, SU Chuanyang¹, ZHANG Shuai¹ (1. General Station for Drug and Instrument Supervision and Control, Joint Logistics Support Force of the PLA, Beijing 100166, China; 2. the Emergency Department of the Second Medical Center and National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective** To revise the determination method in the quality standard of Jingtian Zhitong cream. **Methods** The total saponins of angelica sinensis, Ligusticum wallichii, Rhizoma corydalis, and Panax notoginseng saponins were qualitatively identified by thin-layer chromatography (TLC). The contents of notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g1}, and ginsenoside R_{b1} in the preparation were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** TLC showed strong specificity and good resolution. The concentration of notoginsenoside R₁ showed a good linear relationship in the range of 0.1604 and 2.0050 μg ($r=0.999$). The concentration of ginsenoside R_{g1} showed a good linear relationship in the range of 0.8003 and 10.0035 μg ($r=1.000$). The concentration of ginsenoside R_{b1} showed good linearity in the range of 0.6182 and 7.7275 μg ($r=1.000$). The sample recovery rates were 101.43%, 98.75% and 100.95%, respectively. The relative standard deviation (RSD) were 2.56%, 2.71% and 2.75%, respectively. **Conclusion** The developed method is accurate and reliable with high sensitivity, which can be used for the quality control of Jingtian Zhitong cream.

[Key words] Jingtian Zhitong cream; quality standard; HPLC; TLC

景天止痛膏是由肉桂、三七、当归、元胡、猪牙皂等十四味中药组成的复方制剂, 具有活血化瘀、消肿止痛功能, 主治骨质增生、慢性腰腿痛等症。由于该制剂标准中仅包含一个当归薄层色谱鉴别, 且无定量测定方法, 不能全面控制制剂质量。根据全军医疗机构制剂标准提高课题要求, 在原有质量标准基础上, 增加了当归、川芎、三七总

皂苷、元胡的薄层鉴别, 同时采用高效液相色谱法, 测定景天止痛膏中所含三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 总量的含量测定方法, 以此为该制剂的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

LC-20AD 岛津高效液相色谱仪(日本岛津); 紫外检测器; 对照品: 三七皂苷 R₁(批号: 110745-200617)、人参皂苷 R_{g1}(批号: 111537-201204)、人参皂苷 R_{b1}(批号: 111537-201204)均购自中国食品药品检定研究院; 景天止痛膏(规格: 10cm×6.5cm, 批号: 20140201、20140301、20140401), 由原南京

[基金项目] 全军医疗机构制剂标准提高重点课题(13ZJZ16)

[作者简介] 胡丹, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 中药质量标准, Email: hudan1006@sina.com

[通信作者] 尹明, 博士, 主任医师, 副教授, 研究方向: 老年多器官功能障碍综合症的急救, Email: ym301@163.com

政治学院门诊部提供;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 当归、川芎^[1]

取本品1片,除去盖衬,剪成小块,置锥形瓶中,加乙醇50 ml,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇2 ml溶解,作为供试品溶液。另取当归、川芎对照药材适量,加乙醇分别制成每1 ml含2 mg的对照药材溶液。按照薄层色谱法(中国药典2020年版四部通则0502)试验,吸取上述两种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-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。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。阴性试验样品未见干扰,见图1。

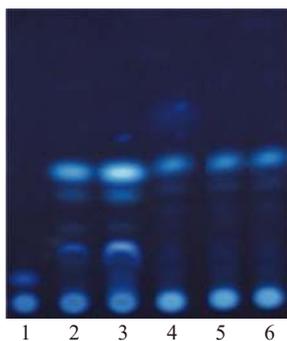


图1 当归、川芎薄层色谱图

注:1.缺当归和川芎阴性对照;2.当归对照药材;3.川芎对照药材;4~6.三批样品

2.1.2 元胡^[1]

取本品2片,除去盖衬,剪成小块,置锥形瓶中,加70%乙醇50 ml,加热回流2 h,滤过,滤液蒸干,残渣加10 ml水溶解,用1%盐酸调pH至2~3,滤过,滤液用浓氨水调pH至9~10,用氯仿萃取3次,合并氯仿液,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解。另取延胡索乙素加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的对照品溶液。取元胡1 g,照供试品方法提取,加甲醇制成每1 ml含1 mg的对照药材溶液。按照薄层色谱法(中国药典2020年版四部通则0502)试验,吸取上述两种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-冰醋酸-水(10:3:5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置碘缸中熏至斑点清晰后取出,挥尽板上吸附的碘后,置紫外光灯(365 nm)下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点。阴性试验样品未见干扰,见图2。

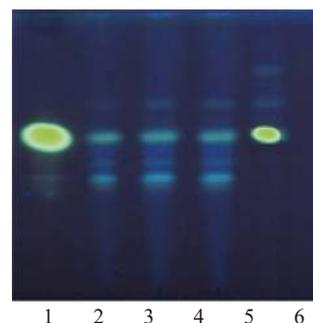


图2 元胡薄层色谱图

注:1.延胡索乙素;2~4.三批样品;5.元胡对照药材;6.阴性对照

2.1.3 三七总皂苷^[1]

取本品2 g,除去盖衬,剪成小块,置锥形瓶中,加水5 ml,再加入水饱和后的正丁醇30 ml,振摇,静置过夜,滤过,滤液加3倍量以正丁醇饱和的水,摇匀,放置使分层,取正丁醇层,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解。另取三七总皂苷,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液。按照薄层色谱法(中国药典2020年版四部通则0502)试验,吸取上述两种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10)10℃以下放置的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;置紫外光灯(365 nm)下检视,显相同的荧光斑点。阴性试验样品未见干扰,见图3。

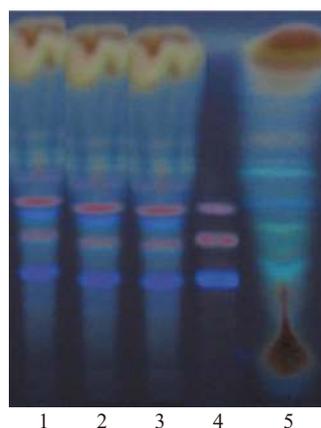


图3 三七总皂苷薄层色谱图

注:1~3.三批样品;4.三七总皂苷;5.阴性对照

2.2 含量测定^[2-5]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Promosil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈为流动相A,水为流动相B,梯度洗脱:0~5 min,23%A;5~68 min,23%~33%A。柱温为35℃,

流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 203 nm; 进样体积为 10 μ l。在此条件下, 样品中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 与相邻峰达到良好分离, 见图 4。

2.2.2 对照品溶液的制备

取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 ml 中分别含 0.08、0.4、0.36 mg 的混合溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

取本品约 2 g, 除去盖衬, 剪成小块, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 50 ml, 加热回流 2 h, 摇匀, 滤过。再用 15 ml 甲醇荡洗锥形瓶, 滤过, 合并滤液并蒸干, 残渣加水 15 ml, 以水饱和的正丁醇振荡提取 4 次, 每次 20 ml, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 20 ml, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备

按处方量配制不含三七药材的阴性样品, 按供试品溶液方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验

取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 阴性对照液中色谱峰对测定无干扰(见图 4)。

2.2.6 线性关系考察

取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷

R_{b_1} 对照品适量, 加甲醇溶解制成每 1 ml 分别含 0.8019、4.0014、3.0913 mg 的混合对照品储备溶液 6, 将溶液 6 稀释如下: 0.2 ml \rightarrow 10 ml、0.5 ml \rightarrow 10 ml、1 ml \rightarrow 10 ml、2 ml \rightarrow 10 ml、2.5 ml \rightarrow 10 ml 作为对照品溶液 1~5, 精密吸取上述对照品溶液 1~5 各 10 μ l, 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积, 以进样量(μ g)为横坐标(X), 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 分别得到三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的回归方程:

$$Y=30339X-874.4, r=0.999$$

$$Y=22431X-0.325, r=1.000$$

$$Y=27695X+699.8, r=1.000$$

结果表明, 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 分别在 0.1604~2.005 μ g、0.8003~10.0035 μ g 和 0.6182~7.7275 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.2.7 精密度试验

精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液 10 μ l, 在上述色谱条件下, 连续进样 6 次。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 峰面积的 RSD 值依次为 1.23%、1.54%、1.04%($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验

取同一批号的景天止痛膏(批号 20140201)按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件, 结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 峰面积的 RSD 值依次为 2.86%、2.49%、2.75%, 表明此法重现性良好。

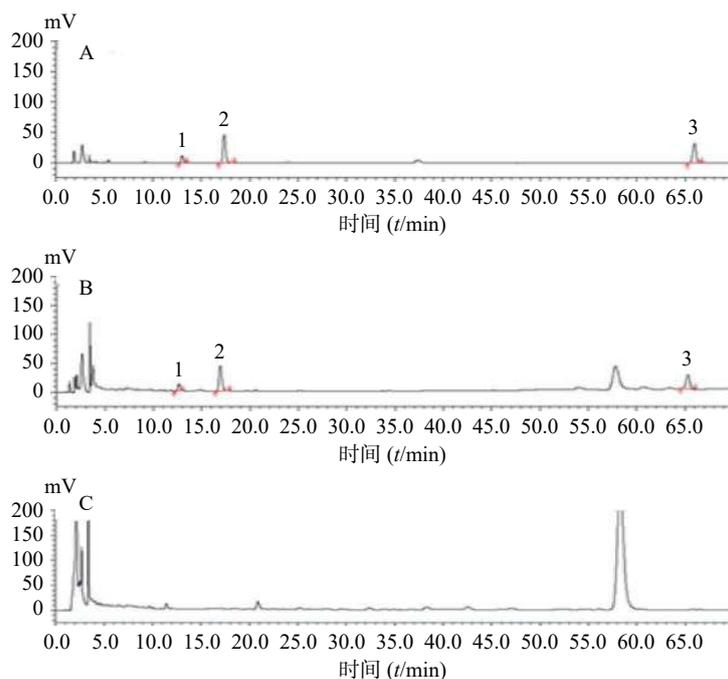


图 4 景天止痛膏 HPLC 图

注: A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液 1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g_1} ; 3. 人参皂苷 R_{b_1}

2.2.9 稳定性试验

取同一批号的景天止痛膏(批号 20140201)按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份,精密吸取 10 μ l,分别在 0、2、5、9、12、24 h 进样,测定。结果三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 峰面积的 RSD 值依次为 1.85%、0.77%、1.20%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.10 加样回收率

取同一批号的景天止痛膏(批号 20140201) 1.0g,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液(三七皂苷 R₁0.0078 mg/ml、人参皂苷 Rg₁0.088 mg/ml、人参皂苷 Rb₁0.0648 mg/ml) 50 ml,按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,结果见表 1。

2.2.11 含量测定

按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定 3 批样品,结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

三七总皂苷为三七药材的主成分,参照 2020 版《中国药典》^[1],以三七药材方法项下紫外吸收 203 nm 作为最大吸收。

3.2 提取方法及溶剂选择

分别取待测样品 1、2、3 g,加入不同浓度乙醇、甲醇,回流 1、2、3 h 和冷浸 24 h,采用氨试液洗涤样品等方法提取样品。结果表明,最终选择取样量为 2 g,甲醇为溶剂,氨试液洗涤,并按照正文的含量测定项下方法进行测定提取较完全。

3.3 液相耐用性条件考察

按照“2.2.3”项下供试品溶液的制备,分别在不同柱温 30、35、40 $^{\circ}$ C,不同梯度流动相比比例条件(0~5 min, 23% A; 5~63 min, 23%~34% A 与 0~5 min, 23% A; 5~68 min, 23%~33% A)下,不同色谱柱 InertSustainC₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 与 Promosil C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),测定三七总皂苷含量。在各试验条件下,待测成分的分离较好,测定结果基本一致,耐用性良好。

3.4 薄层色谱及耐用性条件考察

建立景天止痛膏制剂中当归、川芎、元胡、三七总皂苷的薄层色谱鉴别方法,拟增加肉桂的薄层实验中,因存在阴性试验样品有干扰的问题,故未列入本文。对 TLC 方法,分别从温度(10 $^{\circ}$ C 和 35 $^{\circ}$ C)、相对湿度(42% 和 88%)以及不同硅胶板(国产和进口)等方面进行考察。在各试验条件下,鉴别结果

表 1 景天止痛膏加样回收率试验结果 (n=6)

主成分	称样量(g)	样品量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
三七皂苷R ₁	1.0130	0.3982	0.3900	0.7980	102.51	101.43	2.56
	1.0676	0.4196	0.3900	0.8240	103.69		
	1.0210	0.4012	0.3900	0.7880	99.18		
	1.0590	0.4162	0.3900	0.7960	97.38		
	1.0004	0.3964	0.3900	0.7940	101.95		
	1.0002	0.3930	0.3900	0.7980	103.85		
人参皂苷Rg ₁	1.0130	3.9770	4.4000	8.3000	98.25	98.75	2.71
	1.0676	4.1914	4.4000	8.5240	98.47		
	1.0210	4.0084	4.4000	8.3540	98.76		
	1.0590	4.1576	4.4000	8.7260	103.83		
	1.0004	3.9276	4.4000	8.2020	97.15		
	1.0002	3.9268	4.4000	8.1540	96.07		
人参皂苷Rb ₁	1.0130	2.4960	3.2400	5.7900	101.67	100.95	2.75
	1.0676	2.6306	3.2400	5.9760	103.25		
	1.0210	2.5158	3.2400	5.8920	104.20		
	1.0590	2.6094	3.2400	5.8840	101.07		
	1.0004	2.4650	3.2400	5.6620	98.67		
	1.0002	2.4644	3.2400	5.6020	96.84		

- clinical outcomes: the impact of kidney transplantation[J]. *Toxins (Basel)*. 2018, 10 (6): 229.
- [9] ANGLICHEAU D, VERSTUYFT C, LAURENT-PUIG P, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(7): 1889-1896.
- [10] HU Y F, HE J, CHEN G L, et al. CYP3A5*3 and CYP3A4*18 single nucleotide polymorphisms in a Chinese population[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 353(1-2): 187-192.
- [11] 赵富磊, 李骞, 张峻. 基因多态性对肾移植患者他克莫司药代动力学影响的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(23): 2489-2492.
- [12] PRASAD N, JAISWAL A, BEHERA M R, et al. Melding pharmacogenomic effect of MDR1 and CYP3A5 gene polymorphism on tacrolimus dosing in renal transplant recipients in northern India[J]. *Kidney Int Rep*, 2020, 5(1): 28-38.
- [13] FREDERICKS S, MORETON M, REBOUX S, et al. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements[J]. *Transplantation*, 2006, 82(5): 705-708.
- [14] LOH P T, LOU H X, ZHAO Y, et al. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(5): 1690-1695.
- [15] GERVASINI G, GARCIA M, MACIAS R M, et al. Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation[J]. *Transpl Int*, 2012, 25(4): 471-480.
- [收稿日期] 2020-09-26 [修回日期] 2022-01-04
[本文编辑] 崔俐俊

(上接第 160 页)

不受温度、相对湿度和不同硅胶板等条件改变的影响。说明本文所建立的薄层色谱方法作为定性鉴定方法具有很强的适用性。

表 2 景天止痛膏主成分含量的测定结果 (n=3)

批号	三七皂苷R ₁ (mg/g)	人参皂苷R _{g₁} (mg/g)	人参皂苷R _{b₁} (mg/g)
20140201	0.393	1.963	1.232
20140301	0.407	1.978	1.239
20140401	0.421	1.997	1.265

本文采用薄层色谱法鉴别了景天止痛膏制剂中当归、川芎、元胡、三七总皂苷,并建立了高效液相色谱法三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁} 含量的测定方法。本研究结果,可为该制剂生

产过程中的质量控制及检验提供参考,有助于更好把控药品疗效与临床用药安全。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2020年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 杨秀伟, 王洪平, 王英平, 等. 不同产地人参根和根茎中人参皂苷的含量分析[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(1): 30-36.
- [3] 魏鑫, 刘畅, 姚一鸣, 等. 苗药景天三七质量标准研究[J]. *微量元素与健康研究*, 2020, 37(6): 39-43.
- [4] 张仕瑾, 兰杨, 王娅俐, 等. 黄芪三七合剂质量标准研究[J]. *中国药业*, 2021, 30(6): 58-61.
- [5] 倪琳, 李莉, 徐勤科, 等. 冠心丸质量标准研究[J]. *海峡药学*, 2020, 32(9): 64-69.
- [收稿日期] 2021-09-09 [修回日期] 2022-01-20
[本文编辑] 陈盛新