

## 贵州苗药胡三贴质量标准的研究

靳风云<sup>1</sup>, 马克芹<sup>1</sup>, 胡世玺<sup>2</sup>, 高源<sup>1</sup>, 孙宜春<sup>1</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州贵定胡三贴药械有限公司, 贵州 贵定 5513003)

**[摘要]** 目的: 建立胡三贴的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对方中铁筷子、延胡索和威灵仙进行鉴别; 采用高效液相色谱法测定了方中君药淫羊藿中淫羊藿苷的含量。结果: 薄层色谱斑点清晰, 分离效果良好, 专属性强, 阴性对照无干扰; 淫羊藿苷在0.195 2~1.659 2 μg呈现良好的线性关系( $r=0.999\ 8$ ); 平均加样回收率为96.29%, RSD为1.05% ( $n=9$ )。结论: 本法快速、简便、重复性好、回收率高, 结果准确可靠, 可用于胡三贴的质量控制。

**[关键词]** 胡三贴; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 淫羊藿苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0044-04

## Quality Standard for Three Patches of Hushi

JIN Feng-yun<sup>1</sup>, MA Ke-qin<sup>1</sup>, HU Shi-xi<sup>2</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, SUN Yi-chun<sup>1</sup>

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002; 2. Guizhou Guiding Medicine Hu Three Patches Medical Device Co. Ltd., Guiding 551303, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a quality standard for Three Patches of Hushi. **Method:** Helleborus thibetanus, *Rhizoma Corydalis*, *Clematis chinensis* Osbeck were identified by TLC, and the content of icariin was determined by HPLC. **Result:** *Helleborus thibetanus*, *Rhizoma Corydalis*, *Clematis chinensis* Osbeck could be identified by TLC, icariin was linear in the range of 0.195 2-1.659 2 μg,  $r=0.999\ 8$ . The average recovery was 96.29%, RSD 1.05% ( $n=9$ ). **Conclusion:** This method was accurate and can be used for the quality control of Three Patches of Hushi.

**[Key words]** Three Patches of Hushi; TLC; HPLC; icariin

胡三帖是其由苗药铁筷子、延胡索、淫羊藿、威灵仙、络石藤等药组成,具有清热解毒、败毒散瘀、活血消肿等功效,是胡氏传统医药秘传的济世良方,临床上主治颈椎病、腰椎病、肩周炎、风湿性关节炎、跌打损伤等各种顽固疼痛,且其疗效显著<sup>[1-2]</sup>。胡三帖虽然已经应用于临床,但缺乏质量标准研究,不利于胡三帖的应用与推广。为了更好地控制产品质量,保证疗效,本文应用薄层层析法对方中铁筷子、延胡

索和威灵仙进行鉴别研究,选用高效液相色谱法对其君药淫羊藿所含有效成分淫羊藿苷进行含量测定。结果显示,本法准确、稳定、重现性好、回收率高,阴性试验表明制剂中其他成分对淫羊藿苷的测定无干扰,可用于本品的质量控制。

### 1 材料

**1.1 仪器** Agilent1100 高效液相色谱仪, DAD 二极管阵列检测器, METTLER AE 240 天平(1/10万), DGFY45/14-1 型高温电热鼓风干燥箱, CH-250 型超声波清洗机。

**1.2 试剂** 色谱纯乙腈(天津市科密欧化学试剂开发中心), 分析纯甲醇(上海振兴化工厂一厂), 超纯水, 淫羊藿苷对照品(供含量测定用, 批号 0737-9910)、铁筷子对照药材由贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定(批号 20050607)、延胡索乙素对照品(供含

**[收稿日期]** 20100416(004)

**[基金项目]** 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目: 黔省专合字(2008)65

**[第一作者]** 靳风云, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制与新药开发, Tel: 0851-5615344, E-mail: jin-fengyun01@163.com

量测定用,批号 709-200307)、齐墩果酸对照品(供含量测定用,批号 110709-200304)。

## 2 方法与结果

### 2.1 TLC 鉴别

**2.1.1 胡三贴中铁筷子的特征鉴别** 取本品 10 片,挤出药液,量取 25 mL,蒸干,残渣加醋酸乙酯 20 mL,加热回流 30 min,放冷,滤过,滤液低温挥至约 1 mL,作为供试品溶液。另取铁筷子对照药材 1 g,加醋酸乙酯 20 mL,加热回流 30 min,放冷,滤过,滤液低温挥至约 1 mL,作为对照药材溶液。再另取缺铁筷子的阴性模拟制剂 10 片,挤出药液,量取 25 mL,同供试品制备方法制成缺铁筷子阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 10 ~ 15  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-甲醇(15:3:3)为展开剂,展开,取出,晾干,至紫外光灯(365 nm)下检视,结果见图 1。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

**2.1.2 胡三贴中威灵仙的特征鉴别** 取本品 10 片,挤出药液,量取 50 mL,用 10% 的硫酸溶液调 pH 1 ~ 2,至沸水浴上水解 2 h,用乙醚振摇提取 3 次,每次 30 mL,合并乙醚液,挥干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取齐墩果酸对照品,加甲醇制成 0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,作为对照品溶液。再另取缺威灵仙的阴性模拟制剂 10 片,挤出药液,量取 50 mL,同供试品制备方法制成缺威灵仙阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 2 种溶液各 10 ~ 15  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:3:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105  $^{\circ}\text{C}$  加热显色,置紫外光灯(365 nm)下检视,结果见图 2。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

**2.1.3 延胡索的特征鉴别** 取本品 10 片,挤出药液,量取 50 mL,蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,加浓氨试液调至碱性,用乙醚振摇提取 3 次,每次 10 mL,合并乙醚液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取延胡索乙素对照品,加甲醇制成 0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,作为对照品溶液。再另取缺延胡索的阴性模拟制剂 10 片,挤出药液,量取 50 mL,

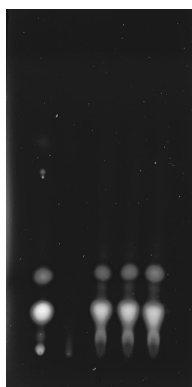


图 1 胡三贴中铁筷子的 TLC 鉴别

1. 铁筷子对照药材;2. 缺铁筷子阴性对照液;3. 供试品(批号 20060322);4. 供试品(批号 20060512);5. 供试品(批号 20060607)

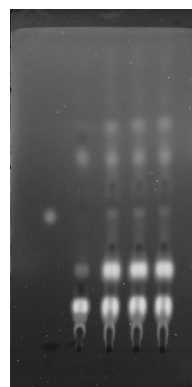


图 2 胡三贴中威灵仙的 TLC 鉴别

1. 齐墩果酸对照品;2. 缺威灵仙阴性对照;3. 供试品(批号 20060322);4. 供试品(批号 20060512);5. 供试品(批号 20060607)

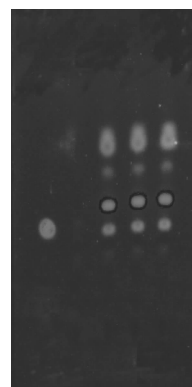


图 3 胡三贴中延胡索的 TLC 鉴别

1. 延胡索乙素对照品;2. 缺延胡索阴性对照;3. 供试品(批号 20060322);4. 供试品(批号 20060512);5. 供试品(批号 20060607)

同供试品制备方法制成缺延胡索阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 10 ~ 15  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以甲苯-丙酮(9:2)为展开剂,展开,取出,晾干,至碘缸中约 3 min 后取出,挥尽板上吸附的碘后,至紫外光灯(365 nm)下检视,结果见图 3。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

### 2.2 淫羊藿苷的含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱 Shim-pack VP-ODS(4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相乙腈-水(28:72);检测波长 270 nm;流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;柱温 25  $^{\circ}\text{C}$  [3]。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加稀乙醇制成 0.097 6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液,即得。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取本品 10 片,挤出药液,精密吸取 20 mL,置于具塞锥形瓶中,于 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴上挥干,精密加入稀乙醇 25 mL,称定质量,超声处理 60 min,放冷,称重,加稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.2.4 缺淫羊藿阴性对照液** 取除淫羊藿以外的

其他方中药材,按工艺流程制备成缺淫羊藿的阴性样品,并且按供试品溶液制备方法操作,即得。

**2.2.5 系统适应性试验** 分别吸取淫羊藿苷对照品溶液、供试品溶液及缺淫羊藿的阴性对照液注入液相色谱仪,记录色谱图(图 1)。从图中可见,在本试验条件下,淫羊藿苷对照品的出峰时间为 8.8 min,淫羊藿苷峰与相近的其他成分峰分离完全(分离度大于 1.5),阴性样品无干扰。

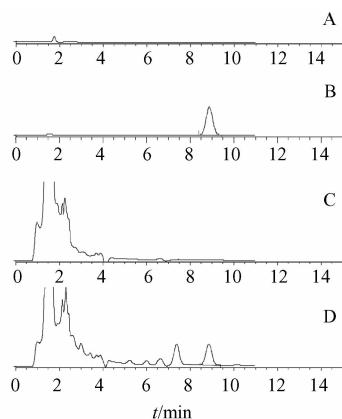


图 1 系统适用性试验图谱

A. 空白溶剂色谱图; B. 对照品色谱图;  
C. 阴性色谱图; D. 供试品色谱图

**2.2.6 线性关系考察** 精密吸取对照品溶液适量配成不同浓度,分别进样,于 270 nm 处测定淫羊藿苷的峰面积。以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标( $X$ ),以峰面积为纵坐标( $Y$ )计算,回归方程为  $Y = 1117.8X - 3.4534$ ,相关系数  $r = 0.9998$ ,线性范围  $0.1952 \sim 1.6592 \mu\text{g}$ 。

**2.2.7 精密度试验** 精密吸取对照品溶液  $5 \mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,于 270 nm 处分别测定淫羊藿苷的峰面积,RSD 1.01%,表明仪器的精密度符合要求。

**2.2.8 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液  $5 \mu\text{L}$ ,在同一色谱条件下,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样测定,RSD 为 1.02%,表明供试品在 10 h 内稳定性良好。

**2.2.9 重复性试验** 取同一批(批号 20060322)样品 6 份,按上述方法制备供试品溶液,在同一色谱条件下分别测定,计算淫羊藿苷的含量,RSD 为 1.35%,表明该方法的重复性良好。

**2.2.10 加样回收率试验** 取已知含量的样品(淫羊藿苷含量按 0.597% 计)9 份,分别按淫羊藿苷含量的 80%, 100%, 120% 加入对照品溶液,每个平行 3 份,按供试品溶液制备方法制备。取  $20 \mu\text{L}$  进样

测定,计算。结果淫羊藿苷低、中、高 3 个加入量的回收率( $n = 3$ )分别为 95.82%, 96.88%, 96.17%; RSD 分别为 0.80%, 1.59%, 0.80%; 平均回收率( $n = 9$ )为 96.29%, RSD 为 1.05%, 结果见表 1。结果表明本法回收率良好。

表 1 淫羊藿苷加样回收率试验

取样量 /mL	淫羊藿苷含量/mg	加入量/mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD/%
10	0.597	0.471 2	1.052 2	96.61		
10	0.597	0.471 2	1.048 2	95.76		
10	0.597	0.471 2	1.045 0	95.09		
10	0.597	0.561 2	1.134 3	95.71		
10	0.597	0.561 2	1.137 6	96.30	96.29	1.05
10	0.597	0.561 2	1.150 7	98.63		
10	0.597	0.710 4	1.286 4	97.04		
10	0.597	0.710 4	1.278 2	95.89		
10	0.597	0.710 4	1.276 1	95.59		

**2.2.11 含量测定** 按 2.2.3 供试品溶液的制备项下的方法分别处理 10 批样品,按并按 2.2.1 测定法项下条件进行含量测定。结果见表 2。根据 10 批样品测定结果,考虑各批药材含量的差异,本品每贴含淫羊藿以淫羊藿苷( $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$ )计不得少于 0.42 mg/贴。

表 2 胡三贴中的淫羊藿苷的含量测定( $n = 3$ ) mg/贴

批号	淫羊藿苷	平均值
20080501	0.585	
20080514	0.592	
20080530	0.599	
20080603	0.604	
20080611	0.611	
20080631	0.607	0.601
20080715	0.615	
20080728	0.583	
20080814	0.612	
20080902	0.603	

### 3 讨论

采用薄层色谱法对制剂中的铁筷子、延胡索和威灵仙进行了鉴别,选择的展开剂主要参照 2005 年版《中国药典》一部<sup>[3]</sup>,试验结果表明均具有独特的显色斑点或荧光斑点,且阴性样品无干扰,说明本试验最终确定的鉴别方法具有专属性,可作为该制剂的定性控制方法。

本试验比较了索氏提取法、回流提取法、超声提取法。结果表明,索氏提取法操作繁琐、费时,回流提取法提取出的成分复杂,杂质干扰多,超声提取法其杂质干扰少、操作简便,省时且提取率高,所以选择超声提取法进行提取<sup>[4]</sup>。

本试验曾分别以乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.1 磷酸和乙腈-0.1 磷酸为洗脱系统,考察了色谱的分离情况,结果表明,以乙腈-水(28:72)为流动相时,淫羊藿苷色谱峰出峰时间短,分离效果最佳<sup>[5]</sup>。

本文建立的方法快速、简便、准确,可用于胡三贴的质量控制。

### [参考文献]

- [1] 邱德文,杜江. 中华本草苗药卷[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:1457.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:886.
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2005:229.
- [4] 孟舒,陈再兴,杨丹,等. HPLC 测定强精胶囊中淫羊藿苷含量[J]. 中成药,2006,28(2):286.
- [5] 王波,濮存海,李辉,等. HPLC 测定抑抗灵片中淫羊藿苷的含量[J]. 中成药,2006,28(10):1547.

[责任编辑 顾雪竹]

## 关于本刊变更为半月刊的重要通知

尊敬的作者、读者:

由于本刊近来投稿量不断增加,杂志影响力不断扩大,每月一刊的出版周期已无法满足广大科研工作者的投稿及发表需求。经主办单位中国中医科学院中药研究所及中国中西医结合学会中药专业委员会、主管单位国家中医药管理局及北京市新闻出版管理局的批准,本刊自2010年7月变更为半月刊。半月刊后本刊发文量将大大提高,发表周期将进一步缩短,为作者和读者的服务水平也将不断提升。欢迎广大作者、读者、审稿专家及编委会专家继续关注和支持本刊发展!

由于刊期变更,作者已被录用的待发表稿件的原定刊发“月份”维持不变,但是因每月分为2期,需要明确具体期号的作者请及时与各栏目责任编辑联系,联系方式见本刊网站“联系我们”,由此给您带来的不便请您谅解!

栏目/岗位	责任编辑	电话(010)	手机	邮箱	QQ
综述,专论,学术探讨,资源鉴定,代谢,毒理,药事管理	蓝海	84076882	13683362408	178562955@ qq. com	630731124 178562955
制剂	全燕	84027721	13693506677	791489912@ qq. com	791489912
质量控制、化学成分	顾雪竹	84076882	13601383260	guxuezhu@ gmail. com	14182115
药理	聂淑琴		13520980068	nieshuqin@ sina. com	
临床	小安		13811016479	zou-ak48@ 163. com	65029229
费用查询,发票,稿费,杂志邮寄等	何希荣	84076882		syfjx_2010@ 188. com	840155934