

颈腰痛丸质量标准的建立

刘海敏 刘毅^(通讯作者) 周华 张小波 王鑫

随州市中医医院 湖北 随州 441300

【摘要】：目的：建立颈腰痛丸质量标准。方法：采用显微鉴别法鉴别红花、补骨脂、杜仲、地龙；采用薄层色谱法（TLC）确定独活的定性鉴别。采用高效液相色谱（HPLC）法对制剂中补骨脂药材含有的补骨脂素和异补骨脂素的总量进行含量测定。色谱柱为 Neptune C18 柱（150*4.6mm，3 μ m），流动相为甲醇-水（45:55，v/v），流速为 1.0mL/min，检测波长为 246nm，柱温为 35℃，进样量为 10 μ l。结果：红花、补骨脂、杜仲、地龙的显微特征较为明显，易于观察；独活的薄层鉴别斑点清晰，分离度好，且阴性对照无干扰。定量鉴别中（R,S）-补骨脂中补骨脂素质量浓度在 0.024052 μ g~0.120260 μ g/ml 范围内与峰面积线性关系良好（ $R^2=0.999981$ ）；异补骨脂素质量浓度在 0.012086 μ g~0.060430 μ g/ml 范围内与峰面积线性关系良好（ $R^2=0.999670$ ）。精密度良好（相对标准偏差 0.72%-0.92%）；稳定性和重现性良好（相对标准偏差均低于 1.0%），补骨脂素、异补骨脂素平均加样回收率分别为 95.6%、98.2%。结论：所建立的标准可用于颈腰痛丸的质量控制。

【关键词】：颈腰痛丸质量标准；薄层色谱法；高效液相色谱法；质量标准

DOI:10.12417/2811-051X.25.09.028

颈腰痛丸是我院疼痛科根据多年临床经验，由古方七厘散，根据“痹病”学理论摸索而来的方剂。由红花、醋乳香、醋没药、独活、丹参、盐补骨脂、烫骨碎补、盐杜仲、地龙等组成，具有行气活血，祛风除湿，补益肝肾，通络止痛的功效。用于治疗气滞血瘀，寒湿阻络，肝肾亏损之颈椎病、腰间盘突出、风湿关节炎、四肢疼痛、麻木等症状。

为了更好的控制颈腰痛丸质量，满足院内制剂再注册标准，本实验以传统中医药理论为基础，以湖北省药品监督管理局发布的《关于优化医疗机构应用传统工艺配制中药制剂备案管理的通告》（2023 年第 2 号）为指导，建立其质量标准，以期为相关制剂开发利用提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Wates 2695 型高效液相色谱仪（Sepax HP-C18 色谱柱，紫外分光检测器）；MS105DU 型电子天平；分析天平（SJJH-SB-LH-122）；电热鼓风干燥箱；电热恒温水浴锅；超声波中药处理机；

1.2 试剂与试药

颈腰痛丸（医院制剂室，批号分别为 230714、230715、230716）；独活对照药材（中检院，批号 202113）；补骨脂素对照品（诗丹德，批号 ZP-094-003，纯度 99.7%）；异补骨脂素对照品（诗丹德，批号 ZP-095-003，纯度 99.6%）

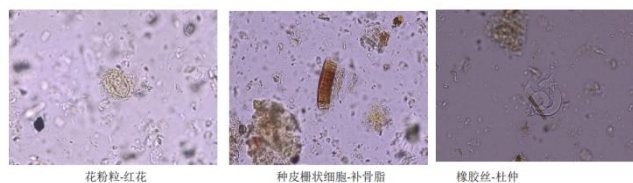
甲醇（HPLC）（CNW，批号 LR-031-0032）。

红花（批号 220501，产地：新疆）、醋乳香（批号 2303001，产地云南）、醋没药（批号 230201，产地：肯尼亚）、独活（批号 230601，产地：四川）、透骨草（批号 220401，产地：安徽）、防风（批号 230301，产地河北）、秦艽（批号 230401，产地甘肃）、全蝎（批号 221201，产地河南）、蜈蚣（批号

230301，产地湖北）、丹参（批号 230301，产地山东）、盐补骨脂（批号 220801，产地云南）、烫骨碎补（批号 2304002，产地江西）、盐杜仲（批号 2306003，四川）、桑寄生（批号 2203001，广西）、地龙（批号 220301，海南）、枸杞子（批号 221102，宁夏）、薏苡仁（批号 230601，贵州）；均购自湖北厚朴药业有限公司，蜂蜜（批号：2023062101）购自福建省神峰科技开发有限公司。经随州市中医医院主任药师马小兵鉴定为正品，符合 2020 年版《中国药典》一部及 2018 年版《湖北省中药饮片炮制规范》。

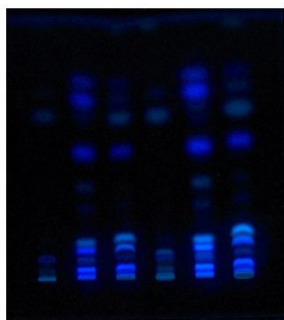
2 质量标准的建立

（1）性状。对多批样品的颜色和气味进行综合观察，最终确认其性状为棕褐色至棕黑色的水蜜丸；气微，味苦。（2）显微特征。取三批样品的细粉，分别用水合氯醛透化，装片，置显微镜下观察，补骨脂、杜仲、红花、地龙的显微特征较为明显，易于观察，故显微鉴别确定此四种药材的显微特征。花粉粒圆形或椭圆形，直径约 60 μ m，外壁有刺，具 3 个萌发孔（红花）。种皮栅状细胞淡棕色或红棕色，表面观类多角形，壁稍厚，胞腔内含红棕色物（补骨脂）。橡胶丝成条或扭曲成团，表面显颗粒性（杜仲）。



（3）独活 TLC 定性鉴别。①提取方法的选择。颈腰痛丸组方中药味较多，需多次提取分离。用水超声 30 分钟，离心，取上清液再用乙醚提取，用水饱和氯化钠溶液洗涤 2 次，回收溶剂至干，残渣加甲醇溶解。②展开系统选择。为了更好地达到分离效果，对独活药材薄层鉴别的展开系统进行了优化，采

用了石油醚(60~90℃)-三氯甲烷-乙酸乙酯(15:15:4)为展开剂。③供试品溶液的制备。取本品5g,研细,加水100ml,超声30分钟,离心,取上清液,滤过,滤液用乙醚提取2次,每次30ml,合并乙醚液,用水饱和氯化钠溶液洗涤2次,每次30ml,回收溶剂至干,残渣加甲醇1ml使溶解,作为供试品溶液。④对照品溶液的制备。取独活对照药材0.2g,加水100ml,超声30分钟,同供试品制备方法,作为对照药材溶液。⑤阴性样品溶液制备。按处方比例称取除独活外各药材,按处方工艺制成缺独活的阴性样品,同供试品溶液的制法,制成阴性样品对照溶液。⑥点样量考察。分别吸取供试品溶液各2 μ l、5 μ l点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-三氯甲烷-乙酸乙酯(15:15:4)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在于对照药材色谱相应的位置上,显一个或一个以上相同颜色的荧光主斑点。点样量为2 μ l时,斑点的分离度和清晰程度均能达到要求,点样量可确定为2 μ l。



1 2 3 4 5 6

薄层板: 硅胶G 温度: 20.1℃, 湿度: 46.2%
1: 缺独活阴性供试品溶液(点样量: 2 μ l)
2: 独活对照药材(中检院, 批号 202113, 点样量: 2 μ l)
3: 颈腰痛丸样品(点样量: 2 μ l)
4: 缺独活阴性供试品溶液(点样量: 5 μ l)
5: 独活对照药材(中检院, 批号 202113, 点样量: 5 μ l)
6: 颈腰痛丸样品(点样量: 5 μ l)

(4) 检查。①水分。照《中国药典》2020年版四部通则0832水分测定法第二法(烘干法)测定, 水蜜丸水分不得过12.0%。②重量差异。照《中国药典》2020年版四部通则0108丸剂项下测定。以10丸为1份, 取本品10份, 分别称定重量, 再与平均重量比较, 重量差异限度为 $\pm 9\%$, 超出重量差异限度的不得多于2份, 并不得有1份超出限度1倍。③装量。本品为以重量标示的多剂量包装丸剂, 照《中国药典》2020年版四部通则0942最低装量检查法检查。取本品3瓶, 精密称定内容物重量, 求出每瓶内容物的装量与平均装量, 平均装量不得少于标示装量, 每瓶装量不得少于标示装量的97%。④溶散时限。照《中国药典》2020年版四部通则0921崩解时限检查法检查。取本品6丸, 用孔径约1.0mm筛网的吊篮, 水温为37℃

$\pm 1^\circ\text{C}$, 加挡板进行检查, 在1小时内全部溶散。⑤微生物限度: 按照《中国药典》2020年版四部通则1105微生物计数法、1106控制菌检查法、1107非无菌药品微生物限度检查法检查并进行了验证, 规定含药材原粉的丸剂中需氧菌总数不得超过 $3 \times 10^4\text{cfu/g}$, 霉菌和酵母菌总数不得超过 100cfu/g , 不得检出大肠埃希菌, 不得检出沙门菌, 耐胆盐革兰阴性菌应小于 100cfu/g 。

(5) 含量测定。采用高效液相色谱法(《中国药典》2020年版四部通则0512)对本品补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的总量进行测定, 并进行了阴性干扰、回收率试验、重复性试验等方法学研究。①仪器设备与试剂。高效液相色谱仪: Waters 2695, Sepax HP-C18色谱柱, 紫外分光检测器。甲醇(HPLC): 厂家CNW, 批号LR-031-0032。②方法学研究。a. 检测波长的确定。取含量测定项下的对照品溶液, 照紫外-可见分光光度法在200~400nm的波长范围内扫描, 在246nm处有最大吸收, 因此将含量测定波长定为246nm。b. 对照品溶液的制备。取补骨脂素对照品、异补骨脂素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每1ml含补骨脂素12 μ g、异补骨脂素6 μ g的混合溶液。c. 系统适用性试验。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以甲醇-水(45:55)为流动相, 检测波长为246nm, 理论板数按补骨脂素峰计算不低于3000, 主峰与杂质峰分离度应大于1.5。d. 流动相的选择。分别以甲醇-水(55:45)、甲醇-水(45:55)、甲醇-0.1mol/L磷酸氢二钠溶液(用磷酸调节pH值至7)(35:65)为流动相, 用高效液相色谱测定, 结果以甲醇-水(45:55)为流动相测得补骨脂素和异补骨脂素的分离度、保留时间较理想, 且峰型好, 塔板数高。故选择甲醇-水(45:55)为流动相。

(6) 回收率试验: 精密称取已知含量的颈腰痛丸样品共6份, 每份中分别加入1.2026mg/ml补骨脂素250 μ l、0.6043mg/ml异补骨脂素250 μ l, 按含量测定项下方法制备供试品溶液, 计算回收率。

(7) 重复性试验: 取230714批样品6份, 照含量测定项下的方法, 测定样品中补骨脂素、异补骨脂素的峰面积, 求出RSD%, 本品重复性良好。

(8) 溶液放置稳定性试验: 分别于0、2、4、6、8、12、24h测定样品中补骨脂素和异补骨脂素的峰面积, 考察样品溶液放置的稳定性, 样品溶液在24h内稳定。

(9) 精密度试验。取一定浓度的对照品溶液, 连续进样5针, 计算峰面积RSD%, 仪器的精密度良好。

(10) 含量测定。色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以甲醇-水(45:55)为流动相; 柱温35℃; 检测波长为246nm。理论板数按补骨脂素峰计算应不低于3000。取各批号重量差异项下样品适量, 研细, 取约0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇25ml, 密塞, 称定重

量，冷浸1小时，加热回流1小时，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，照高效液相色谱法（《中国药典》2020年版四部通则0512）测定，在246nm的波长测定峰面积。另取补骨脂素对照品、异补骨脂素对照品适量，精密称定，加甲醇制成每1ml含补骨脂素12μg、异补骨脂素6μg的混合溶液，同法测定，计算，即得。三批样品含量测定结果见下表。

三批样品含量测定

批号	230714	230715	230716
含量（mg/g）	1.70	1.49	1.46

根据《中国药典》2020年版一部中补骨脂药材项下规定，含补骨脂素和异补骨脂素的总量不得少于0.70%，本制剂投料量为每1000g中补骨脂100g，理论上制剂每1g含补骨脂素和异补骨脂素的总量应不少于0.7mg。考虑到实验室样品的制备与制剂大规模生产的差异、药材产地、采收季节的差异，结合多批次的实验结果，故含量测定限度定为：本品每1g含补骨脂以补骨脂素（C₁₁H₆O₃）和异补骨脂素（C₁₁H₆O₃）的总量计，不得少于0.8mg。

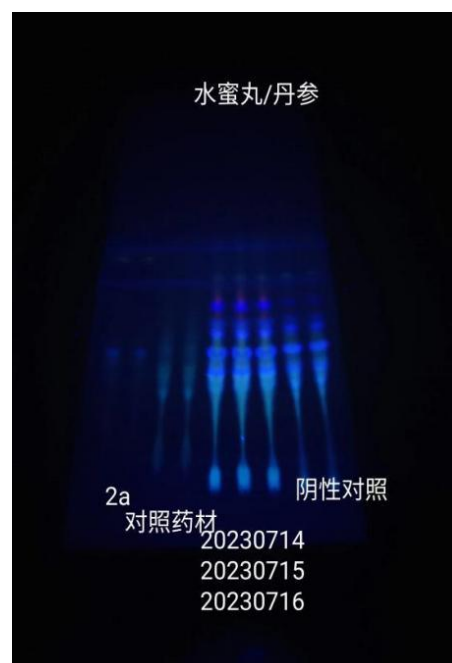
3 讨论

颈腰痹丸处方中含17味中药，在质量研究的初期，除动物药材、挥发性药材外，选取了君药红花、投料量较大的独活、丹参进行了薄层鉴别的研究。

多次实验，结果显示：用红花对照药材做对照，在薄层色谱图中红花对照药材可以显示出斑点，但样品却显示不出斑点。分析原因可能是该品种在生产过程中用加热方式对饮片进行干燥处理，红花的色素成分易受温度影响而分解，故不能显示斑点。在显微鉴别中，红花的显微特征花粉粒较为明显，故将红花的鉴别列入显微鉴别。

对丹参的薄层色谱实验结果显示：丹参的薄层色谱图中各

斑点的分离效果不佳。分析原因可能是因为该品种处方药味较多，相互干扰较大，虽经多次调整前处理方法及展开剂的组成，依然未达到理想效果，故未将丹参的薄层鉴别纳入质量标准。如下图所示。



（1）含量测定

含量测定选择补骨脂的理由，在资料九-质量标准草案及起草说明的7.1项有阐述：“本质量标准拟采用高效液相色谱法测定补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的总量。理由：处方中君药用量较小，且红花不易提取，乳香没药易挥发，不适合做含量测定。臣药中除动物药材外，透骨草执行省标，秦艽、防风用量较小，独活为薄层鉴别的药味，也不适合做含量测定。佐药中补骨脂虽为佐药，但用量较大，其有效成分补骨脂素和异补骨脂素用甲醇提取，方法易操作，效果较好，且其他药味无干扰，参考《中国药典》2020年版一部中“腰痛丸”的含量测定方法测补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的总量，故选择。”

参考文献：

- [1] 国家药典委员会,中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社.2020.
- [2] 国家药典委员会,中华人民共和国药典:四部[S].北京:中国医药科技出版社.2020.
- [3] 湖北省药品监督管理局,湖北省中药饮片炮制规范[S].湖北:中国医药科技出版社.2018.