

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)02-0083-04
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.02.020



香卿止痛喷雾剂质量标准提升研究

殷丽宁, 李金慈, 盛华, 高茗, 苏华, 汤洪[△]

(中国人民解放军东部战区总医院, 江苏南京 210002)

摘要:目的 提升香卿止痛喷雾剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的红茴香和徐长卿进行定性鉴别。采用顶空气相色谱(HS-GC)法测定制剂中的乙醇、甲醇含量, 色谱柱为 Agilent HP-5 毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), 固定液为 5% 二苯基-95% 二甲基聚硅氧烷; 程序升温(40 °C 维持 2 min, 以 3 °C/min 的速率升至 65 °C, 再以 25 °C/min 的速率升至 200 °C, 维持 15 min); 进样器温度为 200 °C, 检测器温度为 220 °C; 顶空分流进样, 顶空进样量为 1 mL, 平衡温度为 85 °C, 恒温时间为 20 min, 分流比为 100:1; 定量环温度为 85 °C, 传输线温度为 110 °C。结果 红茴香和徐长卿的 TLC 图斑点清晰, 分离度好, 且阴性对照无干扰。乙醇、甲醇体积分数分别在 0.025%~0.4% ($R^2 = 1.0000$) 和 0.005%~0.16% ($R^2 = 0.9992$) 范围内与乙醇/正丙醇峰面积值、甲醇峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均不超过 10.91%; 平均加样回收率分别为 104.06% 和 110.00%, RSD 分别为 2.52% ($n = 9$) 和 4.74% ($n = 6$)。结论 所建立的方法简单可行, 专属性强, 稳定性好, 可用于香卿止痛喷雾剂的质量控制。

关键词: 香卿止痛喷雾剂; 质量标准; 薄层色谱法; 顶空气相色谱法; 红茴香; 徐长卿; 甲醇; 乙醇

Improvement of the Quality Standard of Xiangqing Zhitong Spray

YIN Lining, LI Jinci, SHENG Hua, GAO Ming, SU Hua, TANG Hao

(The General Hospital of Eastern Theater Command of Chinese PLA, Nanjing, Jiangsu, China 210002)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Xiangqing Zhitong Spray. **Methods** Thin-layer chromatography (TLC) method was used to qualitatively identify the *Illicium henryi* and *Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma* in the preparation. Headspace-gas chromatography (HS-GC) method was used to determine the ethanol and methanol content in the preparation. The chromatographic column was the Agilent HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), the stationary liquid was 5% diphenyl-95% dimethyl-polysiloxane, the temperature was programmed (maintained at 40 °C for 2 min, heated to 65 °C at a rate of 3 °C/min, then heated to 200 °C at a rate of 25 °C/min, and maintained for 15 min), the injector temperature was 200 °C, and the detector temperature was 220 °C; the headspace split injection was adopted, the headspace injection volume was 1 mL, the equilibrium temperature was 85 °C, the constant temperature time was 20 min, and the split ratio was 100:1; the quantitative ring temperature was 85 °C, and the transmission line temperature was 110 °C. **Results** The TLC chromatograms of *Illicium henryi* and *Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma* showed clear spots, good resolution, and there was no interference from the negative reference. The volume fractions of ethanol and methanol showed a good linear relationship with the peak area ratio of ethanol to *n*-propanol and methanol peak area within the range of 0.025% to 0.4% ($R^2 = 1.0000$) and 0.005% to 0.16% ($R^2 = 0.9992$) respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were no higher than 10.91%. The average recovery rates of ethanol and methanol were 104.06% and 110.00%, with the RSDs of 2.52% ($n = 9$) and 4.74% ($n = 6$). **Conclusion** The established method is simple, feasible, specific and stable, which can be used for the quality control of Xiangqing Zhitong Spray.

Key words: Xiangqing Zhitong Spray; quality standard; thin-layer chromatography; headspace-gas chromatography; *Illicium henryi*; *Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma*; methanol; ethanol

香卿止痛喷雾剂由红茴香和徐长卿两味中药以 75% 乙醇经浸渍、渗漉、浓缩等工艺提取, 并加入冰片、月桂氮萘酮等经皮促渗剂开发制得。该制剂具有活血化瘀、消肿止痛功效, 临床主要用于治疗跌打损伤、瘀血肿痛、风湿痹痛等^[1-2]。若参考 2020 年版《中国药典(一部)》^[3]及地方标准^[4]中徐长卿和红茴香药材的鉴别方法, 制剂中冰片的挥发油成分会对结果造成干扰。乙醇体积分数及用量会显著影响制剂中主要活性物质丹皮

酚和槲皮苷的含量^[2], 乙醇在制备过程中可能导致甲醇残留, 该情况不符合 2020 年版《中国药典(四部)》中残留溶剂规定^[5]¹¹⁶⁻¹²⁰, 且甲醇对人体有强烈毒性, 可致失明、肝损伤甚至死亡^[6-8], 故需严格控制产品中的乙醇含量和甲醇残留量。为此, 本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中红茴香和徐长卿进行定性鉴别, 并采用顶空气相色谱(HS-GC)法测定制剂中乙醇、甲醇的含量, 以提升香卿止痛喷雾剂的质量标准。现报道如下。

第一作者: 殷丽宁, 女, 硕士, 药师, 研究方向为中药制剂, (电子信箱) yln0218@outlook.com。

[△]通信作者: 汤洪, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药制剂, (电子信箱) tang_hao0518@sina.com。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

7697A - 7890B 型顶空气相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司); AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); FA1204S 型分析天平(上海精密科学仪器有限公司, 精度为 0.1 mg)。

1.2 试剂

香脚止痛喷雾剂(医院药剂科制剂室自制, 批号分别为 20210406, 20210410, 20210414); 槲皮苷对照品(批号为 111538 - 202007, 含量 93.5%), 丹皮酚对照品(批号为 110708 - 201908, 含量 99.8%), 均购自中国食品药品检定研究院; 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司, 批号为 20220721); 无水乙醇(分析纯, 上海振兴化工一厂, 批号为 202011330); 正丙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号为 20190820); 甲醇(色谱纯, 西陇科学股份有限公司, 批号为 B2103011); 其余试剂均为分析纯; 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

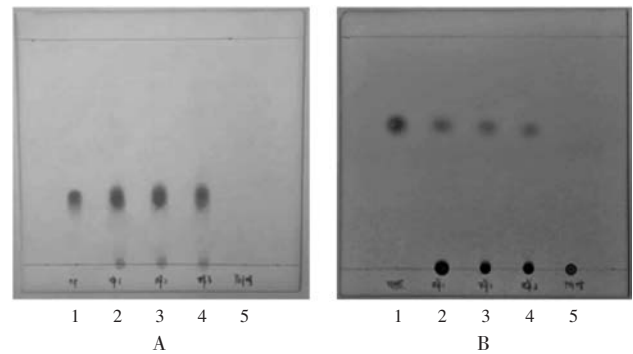
红茴香: 精密量取样品 10 mL, 置蒸发皿中挥干, 加水 20 mL, 加热使溶解, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 挥干, 残渣加甲醇 5 mL 使溶解, 即得供试品溶液。按香脚止痛喷雾剂处方及工艺制备缺红茴香的阴性样品, 并按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。取槲皮苷对照品适量, 加甲醇溶解, 制成质量浓度为 1 ng/mL 的对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 项下 TLC 法^{[5]59-60}, 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷 - 乙酸乙酯 - 甲酸(3:6:1, V/V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 1 A。

徐长卿: 供试品溶液制备方法同“红茴香”。按香脚止痛喷雾剂处方及工艺制备缺徐长卿的阴性样品, 并按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。取丹皮酚对照品适量, 加甲醇溶解, 制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 项下 TLC 法^{[5]59-60}, 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 - 乙酸乙酯(3:1, V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以盐酸酸化的 5% 三氯化铁乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 1 B。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent HP - 5 毛细管柱(30 m \times 0.32 mm,



1. 对照品溶液 2 - 4. 供试品溶液(批号分别为 20210406, 20210410, 20210414) 5. 阴性对照品溶液

A. 红茴香 B. 徐长卿

图 1 薄层色谱图

1. Reference solution 2 - 4. Test solution (batch numbers: 20210406, 20210410 and 20210414, respectively) 5. Negative reference solution

A. *Illicium henryi* B. *Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma*

Fig. 1 TLC chromatograms

0.25 μ m), 固定液为 5% 二苯基 - 95% 二甲基聚硅氧烷; 程序升温(40 $^{\circ}$ C 维持 2 min, 以 3 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 65 $^{\circ}$ C, 再以 25 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 200 $^{\circ}$ C, 维持 15 min); 进样器温度为 200 $^{\circ}$ C; 检测器温度为 220 $^{\circ}$ C; 顶空分流进样, 顶空进样量为 1 mL(置 20 mL 顶空进样瓶中, 密封测定), 平衡温度为 85 $^{\circ}$ C, 恒温时间为 20 min, 分流比为 100:1; 定量环温度为 85 $^{\circ}$ C, 传输线温度为 110 $^{\circ}$ C。

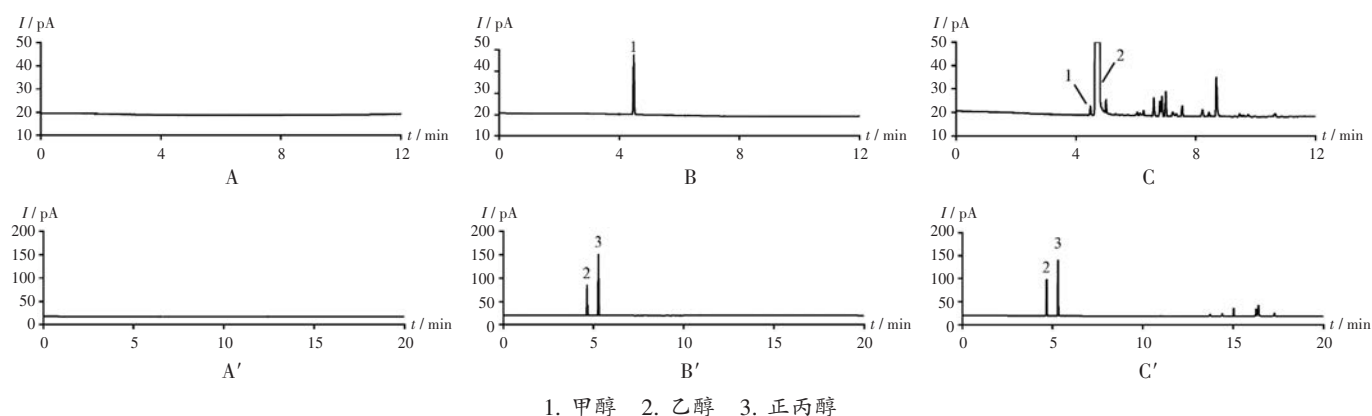
2.2.2 溶液制备

精密量取无水乙醇 5 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 精密加入正丙醇 5 mL, 加水定容, 摇匀, 作为乙醇对照品贮备液; 精密量取 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得乙醇对照品溶液。精密量取甲醇 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 作为甲醇对照品贮备液; 精密量取 5 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得甲醇对照品溶液。精密量取样品 10 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 精密加入正丙醇 5 mL, 加水定容, 摇匀; 精密量取 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得乙醇供试品溶液。取样品作为甲醇供试品溶液。以水为空白溶剂。

2.2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验: 分别精密量取 2.2.2 项下 5 种溶液各 6 mL, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果空白溶剂色谱图中, 在与对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰, 表明方法专属性良好; 理论板数按甲醇峰计大于 10 000, 分离度均大于 1.5。详见图 2。

线性关系考察: 1) 乙醇。精密量取无水乙醇 5 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得 5% 乙醇; 精密量取正丙醇 5 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 即得 5% 正丙醇; 精密量取上述 5% 乙醇 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL, 分别置 100 mL 容量瓶中, 精密加入



A, A'. 空白溶剂 B. 甲醇对照品溶液 B'. 乙醇对照品溶液 C. 甲醇供试品溶液 C'. 乙醇供试品溶液

图2 气相色谱图

1. Methanol 2. Ethanol 3. n-Propanol

A, A'. Blank solvent B. Methanol reference solution B'. Ethanol reference solution C. Methanol test solution C'. Ethanol test solution

Fig. 2 GC chromatograms

5% 正丙醇 1.0 mL, 加水定容, 摇匀, 作为乙醇系列对照品溶液。各精密量取 6 mL, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 以乙醇体积分数 ($X, \%$) 为横坐标、乙醇 / 正丙醇峰面积值 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y_1 = 10.1476X_1 - 0.0016$ ($R^2 = 1.0000, n = 5$)。结果表明, 乙醇体积分数在 0.025% ~ 0.4% 范围内与乙醇 / 正丙醇峰面积值线性关系良好。2) 甲醇。精密量取甲醇对照品贮备液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL, 分别置 50 mL 容量瓶中, 均加水定容, 摇匀, 作为甲醇系列对照品溶液。各精密量取 6 mL, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 以甲醇体积分数 ($X, \%$) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y_2 = 1297.7X_2 - 1.6776$ ($R^2 = 0.9992, n = 6$)。结果表明, 甲醇体积分数在 0.005% ~ 0.16% 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 分别精密量取 2.2.2 项下乙醇、甲醇对照品溶液各 6 mL, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果乙醇 / 正丙醇峰面积值的 RSD 为 1.09% ($n = 6$), 甲醇峰面积的 RSD 为 1.35% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 分别精密量取 2.2.2 项下乙醇、甲醇供试品溶液各 6 mL, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算体积分数。结果乙醇和甲醇体积分数的 RSD 分别为 0.74% 和 10.91% ($n = 5$), 表明供试品溶液在室温下放置 8 h 内基本稳定。

重复性试验: 取同一批样品 (批号为 20210406) 适量, 共 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录体积分数。结果乙醇、甲醇平均体积分数分别为 64.48% 和 0.0084%, RSD 分别为 0.18% 和 5.66% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 1) 乙醇。精密吸取已知乙醇体积分数 (64.48%) 的样品 (批号为 20210406) 5.0 mL, 共 9 份, 置 100 mL 容量瓶中, 精密加入正丙醇 5.0 mL, 分别精密加入无水乙醇 2.0, 3.5, 5.0 mL, 加水定容, 摇匀; 精密量取 1.0 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 分别精密量取 6 mL, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。2) 甲醇。精密吸取已知甲醇体积分数 (0.0084%) 的同一批样品 (批号为 20210406) 5.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 精密加入 2.2.2 项下甲醇对照品溶液 1.0 mL, 加水定容, 摇匀, 平行 6 份, 作为加样供试品溶液。精密量取上述溶液各 6 mL, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 1。

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品各适量, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 计算乙醇、甲醇体积分数, 平行 2 次。结果批号为 20210406, 20210410, 20210414 的样品中, 乙醇体积分数分别为 64.21%, 64.44%, 65.49%, 符合制剂质量标准要求的 55% ~ 75%^[3]; 甲醇体积分数分别为 0.0070%, 0.0080%, 0.0085%, 均未高于《中国药典 (四部)》规定的 0.05%^{[5]121}。

3 讨论

3.1 TLC 法建立

固定相选择: 香卿止痛喷雾剂由徐长卿和红茴香两味中药组方, 根据相关 TLC 鉴别标准规范, 红茴香药材的指标性成分为槲皮苷, 采用聚酰胺作为固定相^[3]; 徐长卿药材的指标性成分为丹皮酚, 采用硅胶 G 薄层板^[4]。槲皮苷是黄酮类化合物的氧糖苷^[9], 结构中含芳香核和共轭双键; 丹皮酚结构中含酚羟基。两者在聚酰

表1 加样回收试验结果(%)

Tab. 1 Results of the recovery test (%)

待测成分	样品含量	加入量	测得量	回收率	\bar{X}	RSD
乙醇 (n=9)	3.224	2.0	5.359	106.75	104.06	2.52
	3.224	2.0	5.419	109.75		
	3.224	2.0	5.313	104.45		
	3.224	3.5	6.807	102.37		
	3.224	3.5	6.841	103.34		
	3.224	3.5	6.847	103.51		
	3.224	5.0	8.327	102.06		
	3.224	5.0	8.328	102.08		
	3.224	5.0	8.334	102.20		
甲醇 (n=6)	0.004 2	0.005 0	0.010 0	116.00	110.00	4.74
	0.004 2	0.005 0	0.009 9	114.00		
	0.004 2	0.005 0	0.009 5	106.00		
	0.004 2	0.005 0	0.009 4	104.00		
	0.004 2	0.005 0	0.009 5	106.00		
	0.004 2	0.005 0	0.009 9	114.00		

胺固定相中均可与聚酰胺形成氢键,产生较强的吸附作用,难以实现有效分离。而两者极性相差较大,在极性吸附的硅胶G薄层板上均能实现良好分离,故采用硅胶G薄层板进行鉴别试验。

展开剂优化:TLC鉴别试验中,红茴香以正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1:5, V/V/V)为展开剂展开时,斑点拖尾严重。槲皮苷呈弱酸性(解离常数约为6.17)^[9],若展开剂pH \geq 7会增加其在展开剂中的解离度,易造成拖尾,故向展开剂中加入酸性物质进行优化^[10-11]。比较石油醚-乙酸乙酯-甲酸(6:4:0.5, V/V/V)和二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(3:6:1, V/V/V)的层析效果发现,后者可有效改善斑点的拖尾,且主斑点比移值适中。

供试品溶液制备方法优化:徐长卿药材TLC鉴别供试品溶液的制备采用乙醚振摇提取丹皮酚等挥发油成分^[3],但香卿止痛喷雾剂中加入冰片作为经皮促渗剂,其中的挥发油成分也可被乙醚萃取^[12],后续难以分离。故利用冰片的水不溶性,将溶液于蒸发皿中蒸发、挥干后用热水溶解,去除水不溶性的冰片后,再用乙酸乙酯萃取制备供试品溶液。优化后的供试品溶液制备方法有效去除了干扰斑点。

3.2 HS-GC法优化

色谱柱筛选:参考相关标准^{[5]96-97,121}和文献^[13-16],综合考虑待测组分甲醇、乙醇和正丙醇的沸点差异和极性差异,选择2.2.1项下毛细管柱(弱极性),结果甲醇峰和乙醇峰的分度大于1.5,乙醇峰和正丙醇峰的分度大于2.0,均实现良好分离。

进样条件优化:甲醇和乙醇均属挥发性有机化合物,为降低制剂中的水(强极性)对弱极性色谱柱的伤害,首选顶空进样。比较不同进样分流比(1:1、10:1、100:1, V/V)发现,当进样分流比为100:1(V/V)时,甲醇峰和乙醇峰的分度度高,且峰形最佳。

3.3 方法评价

本研究中建立的TLC法和HS-GC法简单可行、专属性强、稳定性好,可分别从定性和定量两方面对香卿止痛喷雾剂的质量标准进行完善和提升;同时可为其他含醇制剂检查项研究,尤其是制剂中挥发性有机化合物检测相关GC法的开发提供参考。

参考文献

- [1] 王曙东,刘文雅,江再茂,等. 红茴香与徐长卿的协同镇痛抗炎作用研究[J]. 解放军药学报,2013,29(3):256-258.
- [2] 王曙东,刘文雅,王争,等. 香卿止痛喷雾剂提取工艺研究[J]. 现代中药研究与实践,2015,29(5):53-55.
- [3] 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,2020:298.
- [4] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范(2015年版)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2016:297-298.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [6] 张文凯,梁中卫,王兰,等. 气相色谱法测定舒必利原料药中甲醇、乙醇的残留量[J]. 广东化工,2021,48(15):232.
- [7] 唐立超,郑淑凤,李玲玲. 顶空气相色谱法测定愈创木酚甘油醚中的残留溶剂[J]. 海峡药学,2022,34(6):30-32.
- [8] 蔡锦雄,庞赛,刘敏,等. 顶空气相色谱法测定愈创木酚甘油醚中残留溶剂[J]. 黑龙江医药,2022,35(2):313-315.
- [9] 汤小平,马哲龙,施宁川,等. 槲皮苷衍生物的合成及药理作用研究[J]. 中国药师,2016,19(2):251-254.
- [10] 周文杰,饶伟文,王丽丽. 枫香精油质量标准研究[J]. 中国药业,2023,32(3):80-83.
- [11] 翟巧利,麦格皮热提·阿不力米提,李媛,等. 解热颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2023,32(1):72-75.
- [12] 陈建南,曾惠芳,李耿,等. 龙脑樟挥发油及天然冰片成分分析[J]. 中药材,2005,28(9):781-782.
- [13] 王璐,李金慈,乔立业,等. 顶空进样-气相色谱法测定双乌止痛酊中甲醇和乙醇含量[J]. 海峡药学,2019,31(8):106-108.
- [14] 李惠民,冯锁民,张博,等. 气相色谱法测定桑葚酒中甲醇限度及乙醇含量[J]. 中国食品添加剂,2019,30(7):204-208.
- [15] 陈胜慧子,侯晓杰,乔通通,等. 气相色谱法同时测定慕萨莱思中甲醇和乙醇的含量[J]. 食品研究与开发,2022,43(3):146-151.
- [16] 李珉,侯金凤,刘海涛,等. 顶空气相色谱法测定国产米格列奈钙原料药中有机溶剂残留[J]. 中国药业,2021,30(17):61-64.

(收稿日期:2023-03-06;修回日期:2023-06-10)