

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.13.018

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)13-0083-04



高效液相色谱法同时测定追风透骨丸中龙胆苦苷和芍药苷含量*

江涛, 陈丽斯, 彭红英[△], 唐冬兰, 曾晨, 苏锐辉, 汤迎湛, 曾利杰

(广州白云山敬修堂药业股份有限公司, 广东 广州 510130)

摘要:目的 建立同时测定追风透骨丸中龙胆苦苷和芍药苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(30:70, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 龙胆苦苷和芍药苷质量浓度分别在 15.718~157.175 μg/mL 和 16.095~160.949 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率分别为 99.77% 和 99.28%, RSD 分别为 0.66% 和 0.60% ($n=9$)。12 批样品中龙胆苦苷和芍药苷的平均含量分别为 0.856, 1.174 mg/g。结论 该方法操作简便、结果准确、重复性及专属性良好, 可用于同时测定追风透骨丸中龙胆苦苷和芍药苷的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 追风透骨丸; 龙胆苦苷; 芍药苷; 含量测定

Simultaneous Determination of Gentiopicroside and Paeoniflorin in Zhuifeng Tougou Pills by HPLC

JIANG Tao, CHEN Lisi, PENG Hongying, TAGN Donglan, ZENG Chen, SU Ruihui, TANG Yingzhan, ZENG Lijie

(Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou, Guangdong, China 510130)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of gentiopicroside and paeoniflorin in Zhuifeng Tougou Pills. **Methods** The chromatographic column was Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution (30:70, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of gentiopicroside and paeoniflorin were 15.718-157.175 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 16.095-160.949 μg/mL ($r=0.999\ 9$, $n=6$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were lower than 2.0%. The average recoveries of gentiopicroside and paeoniflorin were 99.77% and 99.28% with RSDs of 0.66% and 0.60% ($n=9$), respectively. The average contents of gentiopicroside and paeoniflorin in 12 batches of samples were 0.856 mg/g and 1.174 mg/g, respectively. **Conclusion** This method is simple and accurate with good repeatability and specificity, which can be used for the simultaneous determination of gentiopicroside and paeoniflorin in Zhuifeng Tougou Pills.

Key words: HPLC; Zhuifeng Tougou Pills; gentiopicroside; paeoniflorin; content determination

追风透骨丸由制川乌、香附(制)、川芎、制草乌、麻黄、秦艽、赤芍、天麻、防风等23味中药材组方,具有祛风除湿、通经活络、散寒止痛功效,用于治疗风寒湿痹、肢节疼痛、肢体麻木。质量标准收载于2020年版《中国药典(一部)》^[1],但含量测定项仅测定芍药苷的含量。对于含23味中药材的成方制剂,该质量标准较简单,检测指标较局限,无法全面控制产品质量。秦艽为方中臣药,始见于《神农本草经》^[2],具有祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热的功效^[3-6],主要活性成分龙胆苦苷具有抗炎、镇痛等药理作用^[7-12]。中药方剂由多味中药组成,共同发挥治疗作用^[13],强调从整体上发挥作用,仅靠单一成分的检测不能反映药品实际质量。多指标成分质量控制模式已广泛应用于中药及中药制剂,尤其是中

成药复方制剂^[14]。为保证药品质量的稳定、均一、可控,本研究中建立了同时测定追风透骨丸中龙胆苦苷和芍药苷2种活性成分含量的高效液相色谱法,以完善其质量控制标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有 G1311C 型四元梯度泵、G1322A 型在线真空脱气机、G1329B 型自动进样器、G1316A 型柱温箱、G1315D 型二极管阵列检测器(DAD)、Agilent Technologies 色谱工作站;KQ-600DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为 480 W,频率为 40 kHz);XA105 型电子分析天平(精度为十万分之一),ME204T

*基金项目:广东省广州市荔湾区科技计划项目[202004051]。

第一作者:江涛,男,硕士,制药高级工程师,研究方向为中药学,(电话)020-81157722(电子信箱)jiangtao1609@163.com。

[△]通信作者:彭红英,女,大学本科,教授级高级工程师,研究方向为中药学,(电话)020-81157716(电子信箱)jxytjs1790@163.com。

型电子分析天平(精度为万分之一),均购自瑞士 Mettler-Toledo 公司。

1.2 试药

龙胆苦苷对照品(批号为110770-201716,含量为97.6%),芍药苷对照品(批号为110736-201539,含量为96.4%),均购自中国食品药品检定研究院;追风透骨丸(广州白云山敬修堂药业股份有限公司,批号分别为A11063, A11064, A11065, A11066, A11067, A11068, A11069, A11070, A11071, A12072, A12073, A12074);甲醇、磷酸均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(30:70, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。在此色谱条件下,龙胆苦苷峰和芍药苷峰的分离度均大于1.5。

2.2 溶液制备

分别取龙胆苦苷对照品、芍药苷对照品各适量,精密称定,加60%甲醇制成每1 mL含龙胆苦苷和芍药苷各40 μg的混合溶液,即得混合对照品溶液。取样品适量,研成细粉,过65目筛,取1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入60%甲醇25 mL,称定质量,超声处理(功率为480 W,频率为40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用60%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方和生产工艺分别制备缺秦

芩、缺赤芍、缺秦芩和赤芍的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

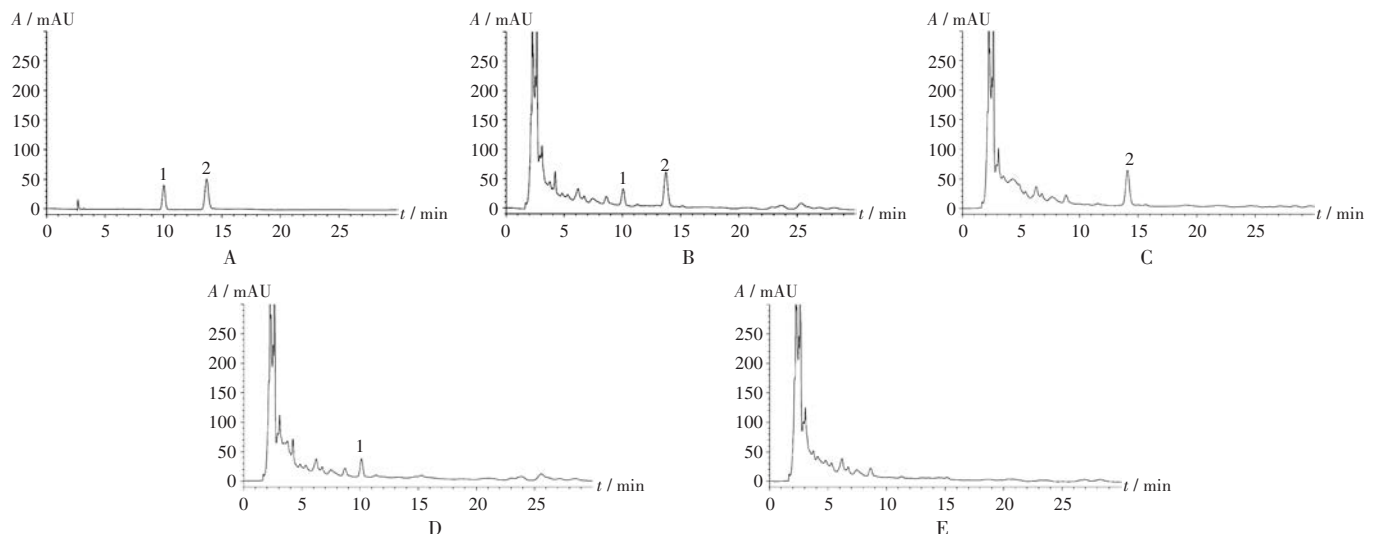
2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取2.2项下3种溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:取龙胆苦苷对照品和芍药苷对照品各20 mg,精密称定,置同一50 mL容量瓶中,加60%甲醇溶解并定容,作为对照品贮备液,分别精密吸取上述对照品贮备液1, 2, 3, 5, 7, 10 mL,置25 mL容量瓶中,加60%甲醇定容,摇匀,配制成系列混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $Y_{\text{龙}} = 16.837X_{\text{龙}} - 1.8488$ ($r = 0.9999, n = 6$), $Y_{\text{芍}} = 26.624X_{\text{芍}} + 10.640$ ($r = 0.9999, n = 6$)。结果表明,龙胆苦苷、芍药苷质量浓度分别在15.718~157.175 μg/mL和16.095~160.949 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果龙胆苦苷、芍药苷峰面积的RSD分别为0.35%和0.72% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为A11071)粉末1.0 g,精密称定,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按



1. 龙胆苦苷 2. 芍药苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C-E. 阴性对照品溶液(分别缺秦芩、赤芍、秦芩和赤芍)

图1 高效液相色谱图

1. Gentiopicroside 2. Paeoniflorin

A. Mixed reference solution B. Test solution C-E. Negative reference solution (lacking Gentiana Radix alone, Paeonia Radix Rubra alone, both Gentiana Radix and Paeonia Radix Rubra, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 1 加样回收试验结果 ($n = 9$)
Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 9$)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
龙胆苦苣	芍药苣	龙胆苦苣	芍药苣	龙胆苦苣	芍药苣	龙胆苦苣	芍药苣	龙胆苦苣	芍药苣	龙胆苦苣	芍药苣	龙胆苦苣	芍药苣
0.401 2	0.401 2	0.347 8	0.491 5	0.339 0	0.502 5	0.683 0	0.988 2	98.88	98.85				
0.403 0	0.403 0	0.349 4	0.493 7	0.339 0	0.502 5	0.688 0	0.997 2	99.88	100.20				
0.403 4	0.403 4	0.349 7	0.494 2	0.339 0	0.502 5	0.690 3	0.993 3	100.47	99.32				
0.500 2	0.500 2	0.433 7	0.612 7	0.452 0	0.603 0	0.881 2	1.207 9	99.00	98.71				
0.502 4	0.502 4	0.435 6	0.615 4	0.452 0	0.603 0	0.888 1	1.220 7	100.11	100.38	99.77	99.28	0.66	0.60
0.500 9	0.500 9	0.434 3	0.613 6	0.452 0	0.603 0	0.884 1	1.211 2	99.51	99.10				
0.603 2	0.603 2	0.523 0	0.738 9	0.565 0	0.703 5	1.092 5	1.435 4	100.80	99.00				
0.600 4	0.600 4	0.520 5	0.735 5	0.565 0	0.703 5	1.085 6	1.432 4	100.02	99.06				
0.601 1	0.601 1	0.521 2	0.736 3	0.565 0	0.703 5	1.081 8	1.432 1	99.22	98.91				

表 2 追风透骨丸中龙胆苦苣和芍药苣含量测定结果 (mg / g, $n = 2$)
Tab. 2 Results of the content determination of gentiopicroside and paeoniflorin in Zhuifeng Tougou Pills (mg / g, $n = 2$)

成分	A11063	A11064	A11065	A11066	A11067	A11068	A11069	A11070	A11071	A12072	A12073	A12074
龙胆苦苣	0.848	0.871	0.896	0.933	0.862	0.802	0.810	0.884	0.867	0.768	0.879	0.851
芍药苣	1.179	1.143	1.154	1.172	1.191	1.194	1.169	1.179	1.225	1.150	1.161	1.168

2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果龙胆苦苣、芍药苣含量的 RSD 分别为 0.48% 和 0.37% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验下供试品溶液适量,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果龙胆苦苣、芍药苣峰面积的 RSD 分别为 0.51% 和 0.83% ($n = 7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量(含龙胆苦苣 0.867 mg / g、芍药苣 1.225 mg / g)的样品(批号为 A11071)粉末 0.4, 0.5, 0.6 g, 各 3 份,精密称定,分别精密加入 2 种对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 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。

2.4 样品含量测定

取 12 批样品粉末各 2 份,每份 1.0 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品中龙胆苦苣和芍药苣的含量。结果样品中龙胆苦苣和芍药苣的平均含量分别为 0.856, 1.174 mg / g, RSD 分别为 5.24%, 1.91%。详见表 2。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法选择

预试验中,供试品溶液的制备考察了超声提取和加热回流提取 2 种方式,并在此基础上采用三因素三水平的正交试验考察甲醇体积分数(40%, 60%, 90%),提取时间(15, 30, 45 min),溶剂体积(25, 50, 75 mL)对供试品溶液提取效果的影响。结果表明,加热回流提取与

超声提取对含量测定结果影响不大,故选择操作方便的超声提取。正交试验结果显示,对提取得率的影响因素从大到小为甲醇体积分数 > 溶剂体积 > 提取时间,最佳提取条件以 60% 甲醇 25 mL、超声提取 30 min 为宜。由最佳提取条件制备的供试品溶液的主峰峰面积较大,峰形较好,故最终确定 2.2 项下供试品溶液制备方法。

3.2 色谱条件选择

考察了甲醇与不同体积分数醋酸(0.1%, 0.3%, 0.5%)和不同体积分数磷酸(0.1%, 0.3%, 0.5%)组成的流动相,不同柱温(26, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$),不同检测波长(230, 254 nm),不同品牌色谱柱[Thermo Scientific ODS - 2 HYPERSIL C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), Phenomenex synergi C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 4 μm), Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)]等对供试品溶液色谱峰分离效果的影响。结果表明,以 2.1 项下色谱条件进样测定时,龙胆苦苣和芍药苣色谱峰峰形均良好,主峰与相邻杂质峰的分离度均大于 1.5。

3.3 结果分析

本研究中测定了 12 批样品中龙胆苦苣、芍药苣 2 种成分的含量,结果表明,各批样品中龙胆苦苣含量差异相对较大($RSD = 5.24\%$),芍药苣含量差异较小($RSD = 1.91\%$),究其原因可能为不同批次秦艽的质量差异导致。中药材质量的影响因素较多,自然环境因素与人工干预因素如土壤、光照、环境温度、降水量、农艺措施、采收时间、药材初加工、储运方式、药材掺假等对中药材品质的影响最大^[15]。故制订追风透骨丸中 2 种指标成分的合理限度时仍需参考更多批次样品的含量测定数据及药品的稳定性试验考察数据。