

HPLC 法同时测定筋骨伤喷雾剂中 7 种成分

李佳蔚¹, 王 娇¹, 徐家怡¹, 程吉祥², 刘 青², 伍 庆^{1*}

(1. 贵州师范大学, 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州远程制药有限责任公司, 贵州 贵阳 550018)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定筋骨伤喷雾剂 (赤胫散、赤芍、淫羊藿等) 中芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含有量。 **方法** 该药物水饱和正丁醇提取液的分析采用 Agilent C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 230、254、270 nm。 **结果** 7 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 5$), 平均加样回收率 93.5% ~ 99.6%, RSD 1.41% ~ 2.86%。 **结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 可用于筋骨伤喷雾剂的质量控制。

关键词: 筋骨伤喷雾剂; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)02-0301-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.006

Simultaneous determination of seven constituents in Jingushang Spray by HPLC

LI Jia-yu¹, WANG Jiao¹, XU Jia-yi¹, CHENG Ji-xiang², LIU Qing², WU Qing^{1*}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Information System and Protection of Mountainous Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Yuancheng Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of paeoniflorin, ellagic acid, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin and baohuoside I in Jingushang Spray (*Polygonum runcinatum* Buch. -Ham. ex D. Don var. *sinense* Hemsl., *Paeoniaeradix Rubra*, *Epimedii Folium*, etc.). **METHODS** The analysis of water-saturated *n*-butanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic Agilent C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate-methanol flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 230, 254, 270 nm. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 5$), whose average recoveries were 93.5% - 99.6% with the RSDs of 1.41% - 2.86%. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Jingushang Spray.

KEY WORDS: Jingushang Spray; chemical constituents; HPLC

筋骨伤喷雾剂是以贵州苗药赤胫散为主, 配以地龙、赤芍、淫羊藿、制草乌、薄荷脑、55% 乙醇浸制而成, 具有消肿止痛、活血化瘀的作用, 用于摔伤、扭伤等软组织损伤, 方中君药赤胫散为蓼科植物赤胫散 *Polygonum runcinatum* Buch. -Ham. ex D. Don var. *sinense* Hemsl. 的干燥根茎, 分布于四川、贵州、云南等地, 其性寒, 味苦、涩, 无毒, 具有活血舒筋、清热解毒之功效, 主治劳伤腰痛、跌打损伤等^[1-4], 主要含有酚酸、挥发油^[5-7], 其中鞣花酸是一种有效的凝血剂^[8], 对多种细菌、

收稿日期: 2019-06-26
基金项目: 国家新药创制重大专项-中药经典名方开发子课题 (2015ZX09101043-007); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-GZ-10); 喀斯特地区生物与信息技术协同创新中心 (黔教合协同创新字 [2014] 04); 贵州中药生产过程质量控制研究 (黔教合 KY 字 [2018] 014)
作者简介: 李佳蔚 (1995—), 女, 硕士生, 研究方向为药用植物开发与利用。Tel: 15043183095, E-mail: 605105268@qq.com
* 通信作者: 伍 庆 (1970—), 男 (侗族), 教授, 研究方向为分析化学。Tel: 13984029735, E-mail: wq0851@126.com

病毒都有很好的抑制作用^[9]，能保护创面免受细菌侵入，防止感染，抑制溃疡^[10]；赤芍主要成分芍药苷具有广泛的抗炎作用^[11-14]，并且表现出明显镇痛活性^[15]；淫羊藿主要包括黄酮、生物碱、多糖等多种活性成分，其中淫羊藿苷、宝藿苷 I、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 是黄酮类代表成分，具有促进骨骼发育的作用，可提高骨密度，增加骨强度^[16]，上述 7 种成分药效均与筋骨伤喷雾剂功能主治一致。

然而，现行筋骨伤喷雾剂质量标准对君药赤胫散仅有 TLC 定性鉴别^[17]，而定量指标仅为赤芍中芍药苷^[3]，过于简单，难以有效控制产品质量。为了进一步发挥中药多组分的协同作用，保证产品质量均一、稳定、可控^[18-20]。本实验建立 HPLC 法同时测定筋骨伤喷雾剂中芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含有量，以期为该制剂质量标准建立提供理论依据和数据支撑。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪（配置在线脱气机、四元泵、自动进样器、DAD 检测器）、Agilent 色谱工作站（美国 Agilent 公司）；CH-250 超声波清洗机（北京创新德超声电子研究所）；HH-4 数显恒温水浴锅（邦西仪器科技有限公司）；XS-105 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；移液枪（20~200、100~1 000 μL，德国 Eppendorf 公司）。

1.2 试剂与药物 芍药苷（批号 wkq18032104）、鞣花酸（批号 wkq18020502）、朝藿定 A（批号 wkq17040509）、朝藿定 B（批号 wkq17032809）、朝藿定 C（批号 wkq17040701）、宝藿苷 I（批号 wkq16081303）对照品均购于四川维克奇生物科技有限公司；淫羊藿苷（批号 110737-200414）对照品购于中国食品药品检定研究院。筋骨伤喷雾剂（100 mL/瓶，贵州远程制药有限责任公司，批号 20181003）。乙腈、甲醇为色谱纯；甲醇、正丁醇、磷酸二氢钾为分析纯；水为超纯水（自制）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.05 mol/L 磷酸二氢钾（B）-甲醇（C），梯度洗脱，程序见表 1；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 0~23 min 时 230 nm，23~54 min 时 254 nm，54~137 min 时 270 nm；柱温 35 ℃；进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	A 乙腈/%	B 0.05 mol/L 磷酸二氢钾/%	C 甲醇/%
0~14	8~10	92~90	0
14~17.5	10	90	0
17.5~22	10~12	90~88	0
22~33	12~17	88~83	0
33~50	17~21	83~79	0
50~51	21~22.5	79~77.5	0
51~80	22.5	77.5	0
80~80.01	22.5~22	77.5~67	0~11
80.01~97	22~35	67~65	11~0
97~107	35	65	0
107~117	35~50	65~50	0
117~137	50~65	50~35	0

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 对照品适量，甲醇溶解制得质量浓度分别为 4.000、2.400、1.500、1.200、0.900、1.180、0.900 mg/mL，精密量取适量，甲醇稀释，即得（质量浓度分别为 0.529、0.322、0.034、0.022、0.050、0.056、0.029 mg/mL）。

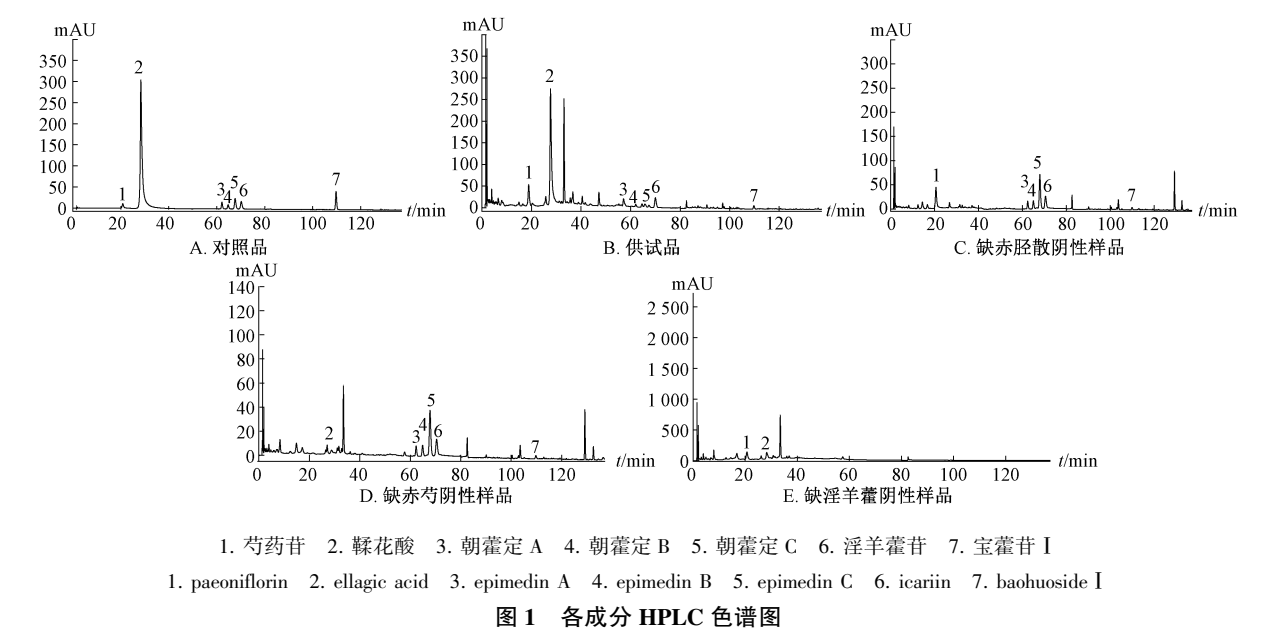
2.2.2 供试品溶液 精密吸取本品 5 mL，置于蒸发皿中蒸干，精密加入 5 mL 水溶解，溶解液转移至分液漏斗中，10 mL 水饱和正丁醇溶液萃取 2 次，取上层澄清液置于蒸发皿中蒸干，甲醇溶解后定容至 10 mL 量瓶中，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照本品处方及生产工艺，分别制备缺赤胫散、赤芍、淫羊藿的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，理论塔板数均大于 5 000。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下鞣花酸对照品溶液 0.134、0.335、0.671、1.010、1.340、1.675 mL，置于 5 个 5 mL 量瓶中，分别加入芍药苷对照品溶液 0.132、0.331、0.661、0.992、1.322、1.653 mL，朝藿定 A 对照品溶液 275、220、165、110、55、22 μL，朝藿定 B 对照品溶液 225、180、135、90、45、18 μL，朝藿定 C 对照品溶液 700、560、420、280、140、56 μL，淫羊藿苷对照品溶液 600、480、360、240、120、



48 μL, 宝藿苷I对照品溶液 400、320、240、160、80、32 μL, 甲醇定容, 摇匀, 在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定。以峰面积为纵坐标 (Y), 溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 结果见表 2, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents			
成分	回归方程	r	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
芍药苷	Y=73.856X-1.317 5	0.999 8	0.105 6~1.322 4
鞣花酸	Y=5 387X -1 149. 5	0.999 8	0.064 3~0.804 0
朝藿定 A	Y=1 548. 5X+8. 160 7	0.999 8	0.006 6~0.082 5
朝藿定 B	Y=1 640. 7X +9. 846 3	0.999 9	0.004 3~0.054 0
朝藿定 C	Y=2 006. 6X +27. 168	0.999 5	0.010 1~0.126 0
淫羊藿苷	Y=1 499. 5X-22. 376	0.999 8	0.011 3~0.141 6
宝藿苷 I	Y=5 024. 7X-29. 95	0.999 9	0.005 7~0.072 0

2.3.3 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 峰面积 RSD 分别为 2.1%、2.9%、0.8%、1.6%、0.7%、0.6%、0.7%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批本品 (批号 20181003), 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 含有量 RSD 分别为 1.4%、2.3%、2.8%、2.4%、2.4%、2.3%、2.3%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取“2.3.4”项下供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 峰面积 RSD 分别为 2.2%、2.7%、2.5%、1.8%、2.2%、1.6%、0.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密量取含有量已知的本品 (批号 20181003) 9 份, 每份 2.5 mL, 置于 100 mL 蒸发皿中, 精密加入适量芍药苷 (0.500 mg/mL)、鞣花酸 (0.448 mg/mL)、朝藿定 A (0.024 mg/mL)、朝藿定 B (0.037 mg/mL)、朝藿定 C (0.023 mg/mL)、淫羊藿苷 (0.152 mg/mL)、宝藿苷 I (0.011 mg/mL) 对照品溶液, 使高、中、低质量浓度对照品加入量与供试品中待测定成分量之比分别在 0.5 : 1、1 : 1、1.5 : 1 左右, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 每种质量浓度 3 份, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。测得芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 平均加样回收率分别为 95.6%、96.0%、97.8%、94.5%、93.5%、96.7%、99.6%, RSD 分别为 1.4%、1.8%、2.3%、1.5%、2.7%、2.4%、1.9%。

2.4 样品含有量测定 取 3 批本品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 每批 3 份, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算含有量, 结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/mL, n=3)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/mL, n=3)

批号	芍药苷	鞣花酸	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	宝藿苷 I
20181003	2.020 0	0.480 0	0.024 0	0.038 0	0.024 0	0.148 0	0.011 4
20181004	2.040 0	0.480 0	0.024 0	0.040 0	0.024 0	0.148 0	0.011 5
20181005	1.980 0	0.460 0	0.024 0	0.038 0	0.024 0	0.152 0	0.011 5

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法选择 本实验考察了水饱和和正丁醇、乙酸乙酯对各成分提取率的影响,发现后者萃取后不能检测出朝藿定 A,故选择前者作为萃取剂。然后,又对萃取时 pH 值(酸性、中性、碱性)、萃取次数(1、2、3 次)进行了考察,最终确定供试品溶液制备方法为中性纯净水加入 10 mL 水饱和和正丁醇萃取 2 次。

3.2 色谱条件优化 本实验考察了流动相甲醇-水、乙腈-甲醇-水、乙腈-甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾,确定乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾-甲醇,此时各色谱峰分离效果最佳。再考察了检测波长,发现芍药苷、鞣花酸、淫羊藿苷最大吸收波长分别为 230、254、270 nm,并且 0~23 min 时 230 nm、23~54 min 时 254 nm、54~137 min 时 270 nm 下各成分响应值较高,峰形良好,分离度理想。

4 结论

本实验建立 HPLC 法同时测定筋骨伤喷雾剂中芍药苷、鞣花酸、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含有量,该方法准确可靠,可用于该制剂的质量控制。

参考文献:

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典 (上册) [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1448-1449.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (蒙药卷) [M]. 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 691-692.

[3] 宋立人, 洪 询, 丁旭亮. 现代中药学大辞典 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1031.

[4] 巩忠福, 杨国林, 严作廷, 等. 蓼属植物的化学成分与药理学活性研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(1): 82-84.

[5] 王莉宁, 徐必学, 曹佩雪, 等. 赤胫散化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(1): 73-75.

[6] Zhou Z H, Liu M Z, Wang M H, *et al.* A new ellagic acid derivative from *Polygonum runcinatum*[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(9): 795-799.

[7] 李玉华, 张 磊. 分光光度法测定赤胫散不同部位总黄酮含量研究[J]. 毕节学院学报, 2011, 29(8): 89-93.

[8] Kosuge T, Ishida H, Yokota M, *et al.* Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. Ⅲ. On the antihemorrhagic principle in *Sanguisorba officinalis* L. [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1984, 32(11): 4478-4481.

[9] Ohemeng K A, Schwender C F, Fu K P, *et al.* DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1993, 3(2): 225-230.

[10] 丁运生, 孙小虎, 李有桂, 等. 鞣花酸及其衍生物研究进展 [J]. 合肥工业大学学报 (自然科学版), 2008, 31(11): 1809-1812.

[11] Wang P, Wang W X, Shi Q, *et al.* Paeoniflorin ameliorates acute necrotizing pancreatitis and pancreatitis-induced acute renal injury[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1123-1131.

[12] Jia Z L, He J. Paeoniflorin ameliorates rheumatoid arthritis in rat models through oxidative stress, inflammation and cyclooxygenase 2[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(2): 655-659.

[13] 刘家齐, 赵正晓, 魏 颖, 等. 芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子及受体的干预作用[J]. 中国实验动物学杂志, 2016, 24(5): 460-464.

[14] 袁 娜, 朱明燕, 杨宏发, 等. 芍药苷对脂多糖诱导的 THP-1 细胞炎症因子分泌和 ABCA1 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(9): 895-898.

[15] 金英善, 陈曼丽, 陶 俊. 芍药化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 745-750.

[16] Peng S L, Zhang G, He Y X, *et al.* Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone[J]. *Bone*, 2009, 45(3): 534-544.

[17] 许超飞. 苗药“筋骨伤喷雾剂”的质量研究与质量标准提升[D]. 贵阳: 贵阳医学院, 2015.

[18] 董乙文, 李天雪, 褚朝森, 等. UPLC-MS/MS 法同时定量测定补中益气丸中的 15 种化合物[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(7): 1228-1233.

[19] 黄 平, 毛坤军, 叶颖俊. HPLC 法同时测定胃肠宁片中 5 个活性成分含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1530-1534.

[20] 叶 隽, 陈 斌, 余岳林, 等. 高效液相色谱法同时测定清肺抑火片中 8 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 968-974.