

非遗传方鳖甲风湿丸中芍药苷含量测定方法研究

陈世勇¹ 胡晶鼎¹ 陈明² 李尚仁^{1*}

(1. 咸宁市药品质量检验检测所, 湖北 咸宁 437100;

2. 咸宁市公共检验检测中心, 湖北 咸宁 437100)

【摘要】目的: 采用HPLC法测定鳖甲风湿丸中芍药苷含量。方法: Thermo AcclaimC18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以0.2% 磷酸溶液-乙腈 (83: 17) 为流动相, 流速为1.0 mL/min; 检测波长为230 nm; 柱温为30℃。结果: 芍药苷在2.052~102.599 μg/ml范围内呈现良好线性关系, $r \geq 0.9999$, 精密度、稳定性均达标, 平均加样回收率为92.3%, RSD为1.67%。结论: 本实验所建立的方法简单、稳定、灵敏, 可用于鳖甲风湿丸的质量控制。

【关键词】芍药苷; 高效液相色谱法; 鳖甲风湿丸; 含量测定

鳖甲风湿丸是由国家级非物质文化遗产《镇氏风湿病马钱子疗法》加工而来, 主治类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等, 具有益气养阴, 蠲痹通络, 除湿止痛等功效^[1]。常用于寒湿型风湿病, 预后效果较好, 方剂由醋鳖甲、桂枝、川穹、制草乌、制川乌、白芍、当归、赤芍等二十二位中药组成^[2]。

芍药苷是白芍与赤芍中重要活性物质, 是一种单萜类糖苷化合物, 具有抗炎、镇痛、调节免疫等药理作用^[3]。常配伍制草乌、制川乌在治疗风寒湿痹时可以取得较好的疗效^[4], 同时由于制草乌、制川乌含有乌头类生物碱, 易产生心血管系统毒性和神经系统毒性, 导致心律衰竭等副作用^[5, 6]。芍药苷可以减缓制草乌、制川乌的心肌、神经等毒副作用, 增强消炎镇痛效果^[7, 8]。本文通过高效液相色谱法测定芍药苷的含量, 为评估鳖甲风湿丸的质量和药效具有重要临床意义。

一、材料与方法

(一) 仪器与试剂

Ultimate3000高效液相色谱仪 (美国赛默飞公司); AU120十万分之一电子天平 (日本岛津); SK8200H超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); PGJ-20-YS品冠系列超纯水机 (武汉品冠仪器设备有限公司);

芍药苷对照品 (批号: 110736-202246; 纯度: 96.7%, 购自中国食品药品检定研究院); 鳖甲风湿丸 (批号: 20230401, 20230601, 20230602, 20230603, 20231001, 20231002, 20231003, 20240101, 20240102, 20240103 咸宁市麻塘风湿病医院制剂); 乙腈为色谱纯, 其余试剂皆为分析纯; 实验用水为超纯水。

(二) 色谱条件与系统适应性

色谱柱: C18赛默飞Acclaim (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2%磷酸水-乙腈 (83: 17); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL; 芍药苷理论塔板数>4000。

(三) 对照品溶液制备

精确称量芍药苷对照品, 加入50%乙醇溶解制成53.05 μg/ml的对照品溶液。

(四) 供试品溶液制备

将鳖甲风湿丸研细, 精密称定0.5 g, 倒入25 ml的量瓶中, 加50%乙醇适量, 浸泡1 h后, 进行20 min超声处理 (功率500 W, 频率40 kHz), 取出冷却至室温, 加入50%乙醇定容, 震荡均匀后使用0.45 μm滤膜过滤, 即得。

(五) 阴性样品溶液制备

在投料中去除白芍和赤芍进行加工处理, 制成

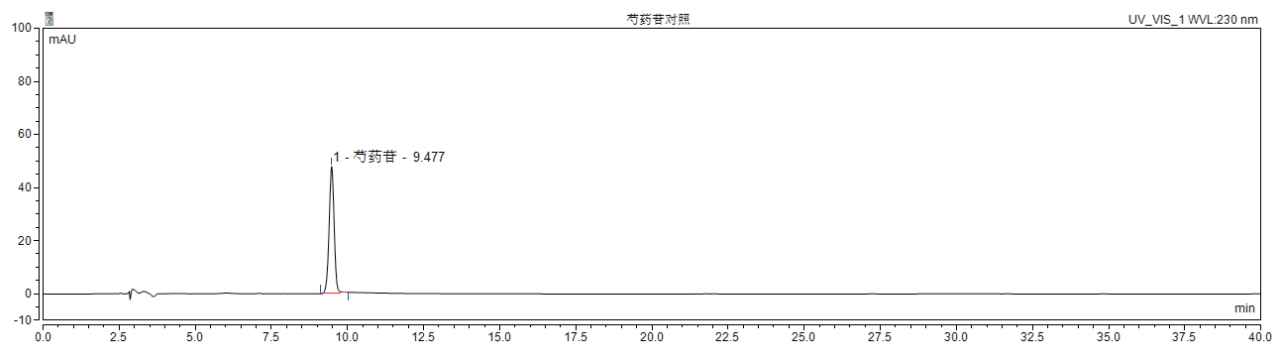


图1 芍药苷对照品溶液

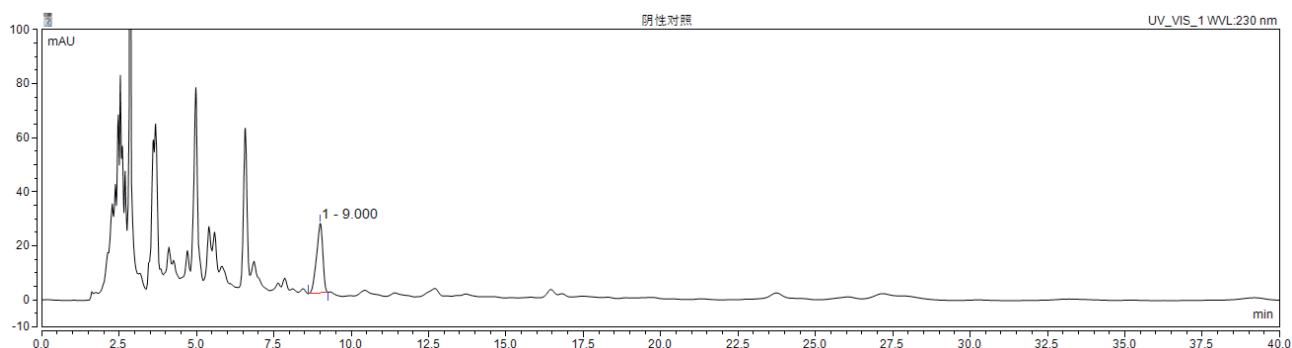


图2 阴性对照溶液

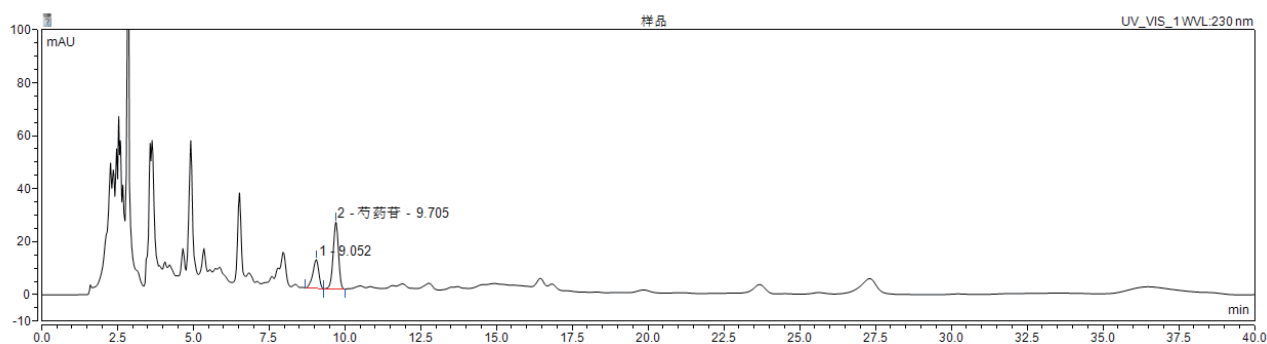


图3 样品溶液

成品后按1.4 上述方法制备阴性样品溶液。

二、方法学考察

在实验过程中，为使测定结果准确可靠，依次进行了方法学验证。

(一) 专属性考察

取芍药苷对照品溶液，阴性对照品溶液与供试品溶液，依照1.2色谱条件进行测定，结果图1-3所示。结果显示在当前的色谱条件下，芍药苷的峰形分离效果较好，能够有效地从其他物质中分离出来，同时对阴性样品具有的抗干扰能力。

(二) 线性关系考察

精密称取10.61mg的芍药苷对照品，稀释至

20 ml作为储备液。吸取不同体积储备液，制备6个不同梯度的溶液。在相同的色谱条件下进行含量测定。通过对峰面积（Y）与浓度（X）进行线性回归分析，结果显示芍药苷在此条件下的响应与浓度之间线性关系良好。回归方程为 $Y = 0.2268 \times X - 0.0726$ ， $R^2 = 0.9999$ ，芍药苷线性范围为2.052~102.599 $\mu\text{g/ml}$ 。

(三) 耐用性考察

1. 流速的考察

选用0.8 mL/min、1.0 mL/min和1.2 mL/min三种流速条件，分别对同一样品进行含量测定。结果显示，RSD为2.80%，表明流速的变化对芍药

表 1 稳定性考察结果

时间 /h	芍药苷对照品平均峰面积 / 积分值	供试品品平均峰面积 / 积分值	含量 / (mg/g)	平均值 / (mg/g)	RSD/%
0	8.807	5.008	1.118		
2	8.725	5.018	1.120		
4	8.722	5.050	1.128	1.126	0.54%
8	8.738	5.025	1.122		
12	8.966	5.078	1.134		
24	8.978	5.064	1.131		

苷含量测定的结果影响较小。

2. 柱温考察

选择20℃、25℃、30℃和35℃四种柱温条件，分别对同一样品进行含量测定。结果显示，RSD为4.68%，表明柱温的变化对芍药苷含量测定的结果影响影响较小。

3. 不同色谱柱的考察

选用二个不同品牌的C18色谱柱，依照相同色谱条件进行了含量测定。结果显示，不同品牌的色谱柱对含量测定结果的影响较小。

4. 不同流动相比比例的考察

采用五种不同比例的乙腈（13%、15%、17%、19%、21%）作为流动相，相同条件下进行含量测定。结果显示：RSD为3.52%，表明乙腈比例在17%±4%范围内变化，对含量测定的准确性影响较小。

（四）稳定性考察

精密量取相同量的对照品和供试品溶液，在系列时间点（0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h）内，依法进行测定。计算芍药苷峰面积的相对标

准偏差（RSD，n=6），测定结果如表1所示。结果表明，对照品和供试品溶液在24小时内，均具有良好的稳定性。

（五）精密度考察

分别精密吸取同一浓度芍药苷对照品，重复进样6次，测定峰面积的RSD（n=6）值与平均值，结果如表2所示。结果表明，本试验方法的精密度良好。

表2 精密度考察结果

编号	芍药苷对照品平均峰面积 / 积分值	平均值 / 积分值	RSD/%
1	8.906		
2	8.882		
3	8.989	8.947	0.62%
4	8.906		
5	9.017		
6	8.982		

（六）重现性试验

精密称取同一批的样品6份，按要求制备6份供试品溶液，依次测定芍药苷含量。结果见表3。结果表明，本试验方法重现性好。

表 3 重现性试验

编号	称样量 /g	样品平均峰面积 / 积分值	芍药苷含量 / (mg/g)	RSD/%
1	0.5059	5.095	1.126	
2	0.5066	5.071	1.119	
3	0.5093	5.176	1.136	1.58%
4	0.5005	5.071	1.133	
5	0.5084	4.950	1.089	
6	0.5050	4.999	1.107	

表 4 回收率实验结果

编号	称样量 /g	样品中芍药苷含量 /mg	对照品加入量 /mg	测定结果 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
1	0.2527	0.292	0.308	0.562	90.73%		
2	0.2509	0.290	0.308	0.562	91.53%		
3	0.2528	0.292	0.308	0.562	90.70%		
4	0.2518	0.291	0.308	0.568	93.21%	92.3%	1.67%
5	0.2562	0.296	0.308	0.577	94.30%		
6	0.2560	0.296	0.308	0.574	93.51%		

（七）准确度试验

精密称取6份0.25 g同批样品，放入25 ml量瓶中。每瓶加入0.6 ml浓度为53.05 μg·mL⁻¹芍药苷对照品溶液与适量稀乙醇，超声处理20 min溶解。冷却后，用50% 乙醇稀释至刻度，摇匀并过滤。收集续滤液作为供试品溶液。结果显示本方法能准确测定样品中芍药苷含量，准确性良好（结果见表4）。

三、结论

本文通过高效液相色谱法，对咸宁麻糖风湿病医院院内制剂鳖甲风湿丸中芍药苷的含量进行了测定，该检测方法操作简单、准确度高且稳定，其方法学验证结果符合相关规定，可以被确立为本制剂的质量控制方法。

参考文献：

[1]石欣，镇树清.鳖甲风湿丸治疗肩周炎60例疗效观察[J].中医临床研究，2019，11（13）：111-113.

[2]艾相乾.鳖甲风湿丸治疗肱二头肌长头腱鞘炎的临床观察[J].中国中医药科技，2016，23（05）：605-606.

[3]刘平，赵俊超，李日光.芍药苷药理作

用及其机制研究进展[J].中医药导报，2023，29（08）：84-88.

[4]谢小红，苏绥和，王柄楠.制川乌、制草乌临床运用探析[J].中外医疗，2023，42（09）：189-193.

[5]王芳静.制草乌的产业化生产工艺关键技术研究[D].安徽中医药大学，2020.

[6]吴丹丹，刘艳，郭鹏飞，等.不同产地川乌炮制前后差异性成分研究[J].广西植物，2022，42（05）：820-832.

[7]董辉，李太平，孙晖.川乌配伍白芍减毒增效作用研究进展[J].中国医药导报，2020，17（04）：32-35.

[8]张舒涵.芍药苷减轻乌头碱心脏毒性的机制研究[D].电子科技大学，2018.

基金项目：湖北省药品监督管理局科研项目（20220203）。

作者简介：

陈世勇（1991—），主管药师，从事药品检验的工作。

通讯作者简介：李尚仁（1982-），主管药师，从事药品检验和药品生产检查的工作。