

HPLC 法同时测定风湿骨痛液中常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量^{*}

韦焕丽^{1**} 杜星¹ 吴梦苑² 郭东艳²

(1. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学/陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 建立 HPLC 法同时测定风湿骨痛液中常春藤皂苷元、齐墩果酸含量。方法 采用 PFchrom C₁₈ 色谱柱, 流动相乙腈-水(90:10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 检测波长为 205 nm, 进样量 10 μL。结果 常春藤皂苷元、齐墩果酸具有良好的线性关系, 其线性范围分别为 32.76~655.20 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$)、20.88~417.60 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$); 平均回收率($n=9$)分别为 99.19%、99.74%, RSD 分别为 0.91%、1.08%。含量测定结果($n=3$)分别为 0.0947~0.0961 mg·mL⁻¹、0.0473~0.0489 mg·mL⁻¹。结论 该方法为提高风湿骨痛液的质量标准研究提供了参考。

关键词: 风湿骨痛液; 高效液相色谱; 常春藤皂苷元; 齐墩果酸; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标识码: A

文章编号: 1672-0571(2023)03-0118-04

DOI: 10.13424/j.cnki.mtem.2023.03.021

风湿骨痛液是陕西中医药大学第二附属医院研制的外用止痛酊剂, 由黑顺片、雪上一支蒿、威灵仙等八味药配伍组成。经临床用药观察, 该制剂可治疗多种疼痛, 如关节疼痛、软组织痛、颈椎腰椎痛等均有显著疗效^[1]。方中黑顺片辛、甘, 大热, 回阳补火, 散寒除湿, 以为君药; 配合威灵仙、雪上一支蒿, 功能祛风除湿, 通络止痛; 桂枝、花椒、红花、白术, 具有温经、发汗解肌、化瘀止痛、健脾除湿等功效, 用作臣佐药。甘草补气, 调和方中各味药物, 为使药^[2-7]。其中威灵仙具有祛风除湿、通络止痛的功效, 为中医临床使用治疗风湿痹痛的要药, 广泛应用于风湿性关节炎、四肢麻木、肌肉痉挛、屈伸不利等疾病, 治疗风湿性关节炎、类风湿关节炎、骨鲛咽喉、乳腺炎及痔疮等^[8-12]。风湿骨痛液原标准仅有生物碱、皂苷类成分的理化鉴别、威灵仙的薄层色谱鉴别及乌头碱的限量检查, 尚缺方中主要药味的含量测定, 难以有效控制制剂的质量。因此本文拟采用 HPLC 法对风湿骨痛液中的活性成分(常春藤皂苷元和齐墩果酸)

含量进行测定, 以期提升制剂的质量标准, 更好地控制制剂质量。

1 仪器与试药

1.1 仪器 岛津 LC-2030C 3D Plus 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU); ME204E 电子分析天平(瑞士 METTLER 梅特勒托利多); KH-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试药 常春藤皂苷元对照品(批号: HR2002W6, 纯度 98%, 宝鸡辰光生物科技有限公司); 齐墩果酸对照品(批号: 160314, 纯度 98%, 成都普菲德生物技术有限公司); 无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司); 风湿骨痛液(批号: 20210601, 20210701, 20210801)陕西中医药大学附属医院制剂室提供; 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国飞世尔科学世界公司); 纯净水(陕西娃哈哈乳品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 风湿骨痛液阴性样品的制备 根据处方

* 基金项目: 陕西省教育厅资助项目(17jk0217)

** 作者简介: 韦焕丽, 主任药师, 研究方向: 院内中药制剂研发与应用。E-mail: hlw1971@126.com

比例,称取黑附片、雪上一枝蒿、桂枝、花椒、红花、白术、甘草,粉碎成粗粉,用 45% 乙醇做溶剂,浸渍 48 h 后,以每分钟 2~4 mL 的速度渗漉,收集初漉液 750 mL,将药渣内余液压出,与初漉液合并,加 45% 乙醇至 1000 mL,混匀,过滤,即得。

2.1.2 混合对照品溶液 称取常春藤皂苷元、齐墩果酸对照品适量,精密称定,用甲醇配成含常春藤皂苷元 1.0920 mg·mL⁻¹、齐墩果酸 1.0440 mg·mL⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液 精密移取风湿骨痛液 10 mL,水浴蒸干,加适量甲醇复溶,定容至 2 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

2.1.4 阴性样品溶液 取除处方中威灵仙以外的其他药,按照“2.1.1”项下方法处理后,再按“2.1.3”项下方法制备威灵仙阴性供试溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱为 PFchrom C₁₈ 色谱柱 (4.6×250 mm);流动相:乙腈-水 (90:10);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:25 ℃;检测波长 205 nm;进样量 10 μL。

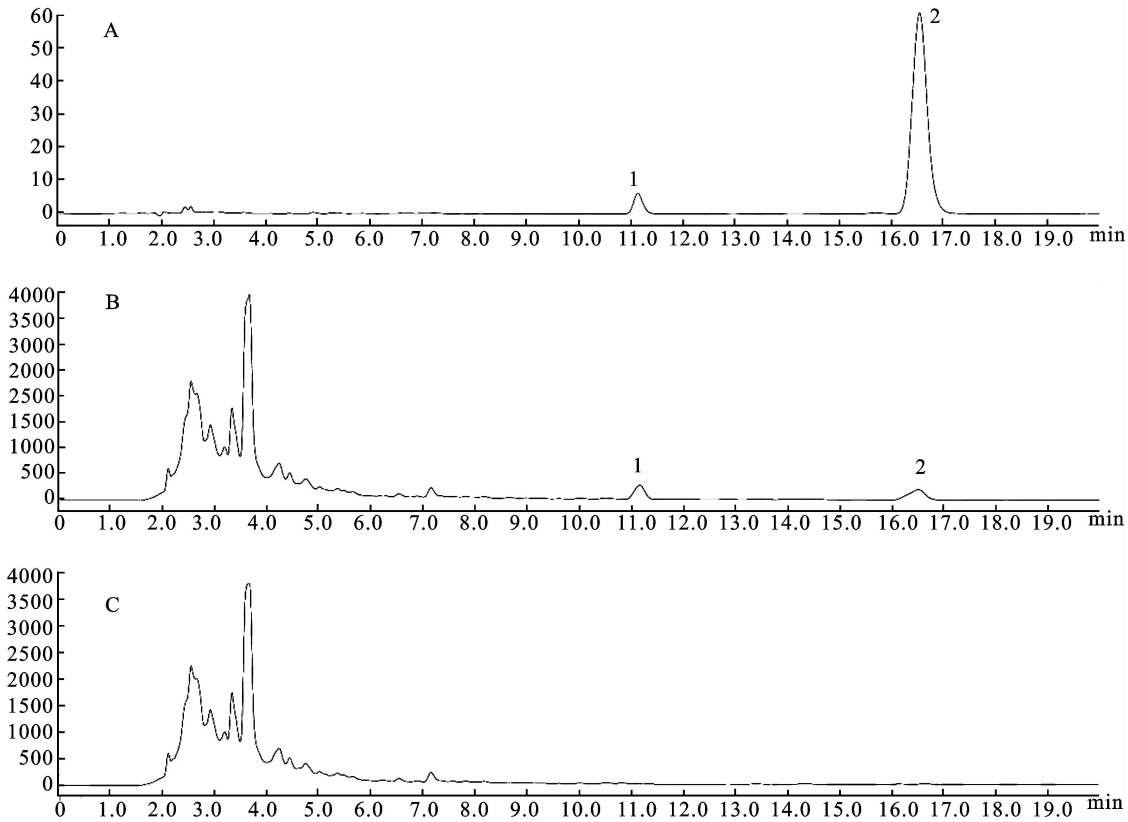
2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取常春藤皂苷元对照品溶液及齐墩果酸对照品溶液,分别加甲醇稀释成含常春藤皂苷元 32.76,65.52,131.04,196.56,327.60 和 655.2 μg·mL⁻¹,含齐墩果酸 20.88,41.76,83.52,125.28,208.80 和 417.6 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液,进样,HPLC 分析,以峰面积 (Y)为纵坐标,浓度 (X)为横坐标绘制标准曲线。各成分的回归方程、线性范围见表 1。

表 1 线性回归方程

成分	回归方程	r	线性范围 (μg·mL ⁻¹)
常春藤皂苷元	$Y=0.5454X+7.0015$	0.9995	32.76~655.20
齐墩果酸	$Y=6.3275X+47.6180$	0.9993	20.88~417.60

2.3.2 专属性试验 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL,进样,HPLC 分析,对照品及样品常春藤皂苷元、齐墩果酸的色谱峰分离良好,阴性样品中指标成分相应保留时间均无吸收峰,表明该方法专属性良好 (见图 1)。



注:A.混合对照品;B.风湿骨痛液样品;C.威灵仙阴性;1.常春藤皂苷元;2.齐墩果酸

图 1 HPLC 图

2.3.3 精密度实验 精密吸取同一混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,进行 HPLC 分析,测得常春藤皂苷元、齐墩果酸峰面积的 RSD 值分别为 0.17%、0.28%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液,分别于配制后的 0,2,4,8,12 和 24 h 按“2.2”项下色谱条件进样 HPLC 分析,测得常春藤皂苷元、齐墩果酸 24 h 内峰面积的 RSD 值分别为 2.65%、1.74%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性实验 取 6 份风湿骨痛液样品,每

份 10 mL,精密量取,分别按“2.1.3”项下方法制备供试液,按“2.2”项下色谱条件进样 HPLC 分析,测得常春藤皂苷元、齐墩果酸的平均含量分别为 0.0961 mg·mL⁻¹、0.0477 mg·mL⁻¹,其 RSD 分别为 1.14%、1.70%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率实验 精密移取已知含量的风湿骨痛液样品 6 份,分别加入适量对照品,按“2.1.3”项下方法制备加样供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样 HPLC 分析,记录色谱峰面积,计算回收率及 RSD 值,结果见表 2。

表 2 加样回收率实验结果(n=9)

成分	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)
常春藤皂苷元	0.0961	0.0481	0.1448	101.25	99.19	0.91
	0.0961	0.0481	0.1441	99.79		
	0.0961	0.0481	0.1433	98.13		
	0.0961	0.0961	0.1910	98.75		
	0.0961	0.0961	0.1906	98.34		
	0.0961	0.0961	0.1913	99.06		
	0.0961	0.1442	0.2384	98.68		
	0.0961	0.1442	0.2400	99.79		
	0.0961	0.1442	0.2388	98.96		

成分	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)
齐墩果酸	0.0477	0.0238	0.0715	100.00	99.74	1.08
	0.0477	0.0238	0.0711	98.32		
	0.0477	0.0238	0.0713	99.16		
	0.0477	0.0477	0.0951	99.37		
	0.0477	0.0477	0.0948	98.74		
	0.0477	0.0477	0.0962	101.68		
	0.0477	0.0715	0.1184	98.88		
	0.0477	0.0715	0.1200	101.12		
	0.0477	0.0715	0.1195	100.42		

2.4 样品测定 取 3 批风湿骨痛液样品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样 HPLC 分析,计算样品中常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(n=3)

样品编号	常春藤皂苷元(mg·mL ⁻¹)	齐墩果酸(mg·mL ⁻¹)
20210601	0.0947	0.0489
20210701	0.0969	0.0473
20210801	0.0966	0.0477
平均值	0.0961	0.0480
RSD(%)	1.02	1.45

3 讨论

3.1 检测波长的选择 参考文献^[13-16] 并对比检测波长 205 nm、215 nm 下的色谱图,发现在 205 nm 下常春藤皂苷元、齐墩果酸均有较好的吸收。

3.2 流动相的选择 实验考察了甲醇-水溶液、乙腈-水溶液等多种不同比例的流动相系统,结果表

明以乙腈-水(90:10)为流动相时分离效果最好。

3.3 柱温的选择 试验考察了 25℃、30℃、35℃、40℃等多种不同柱温,结果表明当色谱柱柱温为 25℃时,分离效果最好。

因方中黑顺片与雪上一枝蒿均为毛茛科植物乌头类药材,近年来研究表明^[17-19],乌头类药材的化学成分主要为生物碱,具有镇痛、抗炎、局麻、抗肿瘤等药理活性同时又具有心血管、神经等毒性^[20-22]。应进行毒性限定实验,因原标准已进行乌头碱限量检查,故本文未选取黑顺片及雪上一枝蒿中生物碱类成分进行含量测定。威灵仙具有祛风湿,通经络的功效,临床上多用于风湿痹痛等病症又兼本方之臣药,故选取威灵仙中有效成分常春藤皂苷元与齐墩果酸进行含量测定。

本文采用 HPLC 法对风湿骨痛液臣药威灵仙中的有效成分常春藤皂苷元和齐墩果酸同时进行了含量测定^[23-25],同时所建立的方法可以对样品

中的两个及以上的指标成分进行同步分析,减少了样品分析时间及溶剂的消耗。经方法学考察,本文所建立的含量测定方法准确、稳定、可靠,可作为风湿骨痛液的质量控制方法之一,为今后风湿骨痛液质量标准提升奠定基础。

参考文献

[1] 辛玲歌. 风湿骨痛液的制备与临床应用[J]. 西北药学杂志,2007,22(6):335-336.

[2] 蓝鲜艳,周畅均,毛敏,等. 附子不同炮制品的相关差异及临床合理选用探讨[J]. 中成药,2021,43(4):994-997.

[3] 赵继荣,杨文通,陈文,等. 威灵仙有效化学成分及镇痛机制研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊:1-6[2022-05-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20220118.1022.002.html>.

[4] 欧阳罗丹,肖苏萍,周建新,等. 桂枝的薄层鉴别及含量测定[J]. 中国药物警戒,2022,19(4):380-383.

[5] 张晋森,兰林,汪晟羽,等. 花椒麻素对 SD 大鼠肥胖模型脂代谢的影响[J]. 西华大学学报(自然科学版),2022,41(3):74-79.

[6] 杜航,何文生,胡红兰,等. 白术活性成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药,2022,54(5):76-80.

[7] 李泽宇,郝二伟,李卉,等. 甘草配伍应用的药理作用及机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(14):270-282.

[8] 张敏. 威灵仙化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(7):165-168.

[9] 鞠成国,张强,唐婷婷,等. 不同来源威灵仙抗炎镇痛谱效关系研究[J]. 现代中药研究与实践,2021,35(5):28-31,37.

[10] 徐小云,王云霞,李智勇. 威灵仙化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代中医药,2003,23(4):67-69.

[11] 曹玲,崔琳琳,孙艳,等. 威灵仙的药理作用及其机制研究进展[J]. 药物评价研究,2022,45(11):2364-2370.

[12] 燕丽君,佟胜全,刘静,等. 威灵仙总皂苷对类风湿关节炎大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 吉林大

学学报(医学版),2020,46(6):1241-1246.

[13] 王林凤,杨红侠. HPLC 法测定潮安颗粒中齐墩果酸的含量[J]. 现代中医药,2007,27(2):64-65.

[14] 徐正龙. HPLC 法同时测定凌霄花中常春藤皂苷元、齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国处方药,2020,18(11):23-24.

[15] 张明,梁志云,张俊杰,等. 高效液相色谱法测定无患子果三蒸三烘炮制前后的常春藤皂苷元含量[J]. 蛇志,2021,33(4):398-400.

[16] 舒柯,程韬,苕玲,等. HPLC 法测定刺楸皮中常春藤皂苷元的含量[J]. 中国民族民间医药,2019,28(12):39-41.

[17] 荣宝山,黄凯丽,袁琳嫣,等. 乌头类药材化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药事,2021,35(8):932-947.

[18] 李谦,过立农,郑健,等. 乌头属药用植物的研究进展[J]. 药物分析杂志,2016,36(7):1129-1149.

[19] 许多河,李兰霞,李生伟. 乌头类中药及其制剂的镇痛作用研究[J]. 中国农村卫生,2019,11(12):38.

[20] 李淑芳,朱文斌. 乌头类药物中毒及治疗[J]. 陕西中医函授,1998,18(1):22-24.

[21] 董迎春. 乌头类中药的不良反应及其影响因素分析[J]. 医学食疗与健康,2020,18(13):29,31.

[22] 中国医师协会急诊医师分会,中国医师协会急救复苏和灾难医学专业委员会,中国急诊专科医联体,等. 急性乌头类生物碱中毒诊治专家共识[J]. 中华急诊医学杂志,2022,31(3):291-296.

[23] 李瑛,吴小明,汪永忠,等. UPLC 法同时测定痺苓祛痛颗粒中常春藤皂苷元和齐墩果酸含量[J]. 安徽医学,2015,36(3):259-261.

[24] 李璐,林文华,严萍,等. 不同来源威灵仙常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量测定[J]. 安徽农业科学,2013,41(7):2910-2911,2940.

[25] 赵圆圆. 威灵仙的指纹图谱研究[D]. 淮安:淮阴工学院,2019.

(修回日期:2022-06-10 编辑:崔春利)