中图分类号：R932;R284.1;R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)13－0074－03
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.13.017

高效液相色谱法测定复方黄番口服液中芍药苷含量

张育勤[1]，米婷婷[1△]，赵俊红[1]，辜燕茹[2]，王曦叶[1]

（1. 中国人民解放军西部战区总医院，四川 成都　610083；　2. 川北医学院药学院，四川 南充　637000）

摘要：目的　建立测定复方黄番口服液中芍药苷含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为Agilent Eclipse Plus C_{18}柱（150 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇－0.1%磷酸溶液（26∶74，*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**　芍药苷的质量浓度在15.35～168.85 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好（r=0.9996，n=6）；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于1.0%（n=6）；平均回收率为95.03%，*RSD*为0.78%（n=9）。**结论**　该方法结果准确、稳定性和重复性均良好，可用于复方黄番口服液中芍药苷的含量测定。

关键词：高效液相色谱法；复方黄番口服液；芍药苷；含量测定

Content Determination of Paeoniflorin in Compound Huangfan Oral Liquid by HPLC

ZHANG Yuqin[1], MI Tingting[1], ZHAO Junhong[1], GU Yanru[2], WANG Xiye[1]

(1. General Hospital of Western Theater Command of the PLA, Chengdu, Sichuan, China　610083;　2. School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China　637000)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of paeoniflorinof in Compound Huangfan Oral Liquid. **Methods**　The chromatography column was Agilent Eclipse Plus C_{18} column (150 mm×4 6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol－0.1% phosphoric acid solution (26∶74, *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 range of paeoniflorin was 15.35－168.85 μg/mL (r=0.9996, n=6). The *RSD*s of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 1.0% (n=6). The average recovery of paeoniflorin was 95.03% with an *RSD* of 0.78% (n=9). **Conclusion**　The method is accurate, stable, and has good repeatability, which can be used for the content determination of paeoniflorin in Compound Huangfan Oral Liquid.

Key words: HPLC; Compound Huangfan Oral Liquid; paeoniflorin; content determination

第一作者：张育勤，男，大学本科，副主任药师，研究方向为医院药学与药事管理学，（电子信箱）yuqin_zhang@139.com。
△通信作者：米婷婷，女，硕士研究生，副主任药师，研究方向为医院药学与药事管理学，（电子信箱）342836517@qq.com。

21(2)：153－163.
[14] SIM DS, JEONG MH, KIM HS, et al. Clopidogrel versus Aspirin after Dual Antiplatelet Therapy in Acute Myocardial Infarction Patients Undergoing Drug－Eluting Stenting[J]. Korean Circ J, 2020, 50(2): 120－129.
[15] LIU ZY, XIANG Q, MU GY, et al. The effect of smoking on residual platelet reactivity to clopidogrel: a systematic review and meta－analysis[J]. Platelets, 2020, 31(1): 3－14.
[16] VAVURANAKIS MA, KALANTZIS C, VOUDRIS V, et al. Comparison of Ticagrelor Versus Clopidogrel on Cerebrovascular Microembolic Events and Platelet Inhibition During Transcatheter Aortic Valve Implantation[J]. Am J Cardiol, 2021, 154: 78－85.
[17] EL－KHODARY NM, EL－BEHERY AM, EL－ASKARY NA, et al. The correlation between platelet responsiveness to clopidogrel and CYP2C19 polymorphism in patients with peripheral vascular disease[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(19): 6065－6076.
[18] 贾　媛，白世茹，李如意，等. 二磷酸腺苷血小板聚集率与急性冠脉综合征患者近期心血管事件的相关性研究[J]. 中国循证心血管医学杂志，2019，11(3)：371－375.
[19] SHOJI S, SAWANO M, SANDHU AT, et al. Ischemic and Bleeding Events Among Patients with Acute Coronary Syndrome Associated with Low－Dose Prasugrel *vs* Standard－Dose Clopidogrel Treatment[J]. JAMA Netw Open, 2020, 3(4): e202004.
[20] PARK MW, KIM CJ, KIM MC, et al. A prospective, multicentre, randomised, open－label trial to compare the efficacy and safety of clopidogrel versus ticagrelor in stabilised patients with acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention: rationale and design of the TALOS－AMI trial[J]. EuroIntervention, 2021, 16(14): 1170－1176.
[21] 郑燕红，蔡海明，张　旭. 不同剂量氯吡格雷对急性脑梗死患者神经功能及预后不良事件的影响[J]. 实用临床医药杂志，2019，23(22)：24－26.
[22] BI SS, ZHAO Y, PENG QL, et al. Contradictions between DAPT and PRECISE－DAPT scores with the severity of coronary lesion in acute coronary syndrome[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(16): e19699.
[23] 张　颖，魏显敬，张曙影，等. 冠心病患者PCI后应用氯吡格雷治疗发生出血事件的相关因素研究[J]. 海南医学，2017，28(22)：3645－3647.

（收稿日期：2023－05－18；修回日期：2024－01－14）

复方黄番口服液由白芍、白术、当归、地黄、肉苁蓉、枳壳、苦杏仁、火麻仁、大黄、番泻叶组方，用于治疗老年性便秘、习惯性便秘、术后和产后便秘等，疗效确切，且无毒副作用[1]。目前，复方黄番口服液的质量标准中仅测定阿魏酸的含量，检测成分单一，无法全面控制药品质量。白芍为方中君药，是常用补血类药物，具有敛阴养血、柔肝止痛等功效，主要含有单萜和苷类化合物，包括芍药苷、白芍新苷、苯甲酰羟基白芍苷等[2-5]。为更好地控制药品质量，本研究中建立了测定制剂中指标性成分芍药苷含量的高效液相色谱（HPLC）法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司）；AB135 - S 型电子天平（梅特勒 - 托利多仪器 < 上海 > 有限公司，精度为十万分之一）；GT - 2013QTS 型固特智能双频双功率超声波清洗机（广东固特超声股份有限公司，功率为 210 W，频率为 60 kHz）；HH - 824S 型恒温水浴锅（上海君竺仪器制造公司）；R - 3 型旋转蒸发仪（瑞士 Bucher 公司）。

1.2 试药

大黄（四川禾木源药业有限公司，批号为 20110105）；苦杏仁（四川一爻良方健康药业有限公司，批号为 210802）；当归（批号为 201204），白芍（批号为 211201），均购自森科药业（成都）有限公司；肉苁蓉（四川光然中药材饮片有限公司，批号为 201205）；白术（四川利民中药饮片有限责任公司，批号为 211202）；地黄（成都欣福源中药饮片有限公司，批号为 G596220101）；炒火麻仁（四川国强中药饮片有限公司，批号为 21110105）；麸炒枳壳（四川千方中药股份有限公司，批号为 202201031）；番泻叶（安徽广和中药有限公司，批号为 211026）；芍药苷对照品（成都麦德生科技有限公司，批号为 RP210609，纯度为 99.28%）；甲醇（色谱纯，成都市科隆化学品有限公司，批号为 2022010601）；磷酸（分析纯，成都市科龙化工试剂厂，批号为 2019022302）；复方黄番口服液（医院制剂，批号分别为 220315，220511，220515，220525）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱（150 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 0.1% 磷酸溶液（26∶74，*V* / *V*）；流速：1.0 mL / min；检测波长：230 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

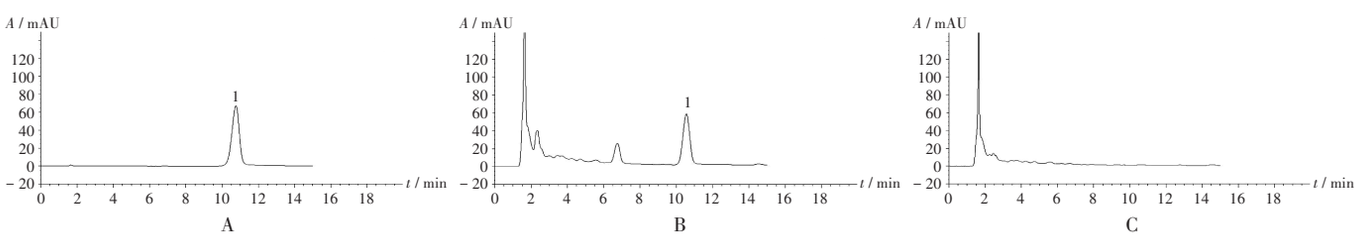
取样品，离心，精密量取上清液 2 mL，置 25 mL 容量瓶中，加甲醇 15 mL，摇匀，超声处理 3 min，放冷，用甲醇定容，摇匀，过滤，取续滤液，即得供试品溶液。取芍药苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 1.535 mg 的对照品贮备液，精密量取 1 mL，置 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，即得对照品溶液。按处方工艺称取除白芍外的其余药材，制备缺白芍的阴性样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验：精密量取 2.2 项下对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL，按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相同保留时间处有色谱峰出现，且阴性对照无干扰，芍药苷峰的理论板数超过 3 000，表明方法专属性良好。色谱图见图 1。

线性关系考察：精密量取 2.2 项下对照品贮备液 0.1，0.3，0.5，0.7，0.9，1.1 mL，分别置 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，分别精密量取 10 μL，按 2.1 项下色谱条件进样测定，以进样质量浓度（*X*，μg / mL）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y = 12.342\,4X + 75.382\,4$（$r = 0.999\,6$，$n = 6$）。结果表明，芍药苷的质量浓度在 15.35 ~ 168.85 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：精密量取 2.2 项下对照品溶液 10 μL，按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果芍药苷峰面积的 *RSD* 为 0.68%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。



1. 芍药苷

A. 对照品溶液　B. 供试品溶液　C. 阴性对照品溶液

图 1　高效液相色谱图

1. Paeoniflorin

A. Reference solution　B Test solution　C Negative reference solution

Fig. 1　HPLC chromatograms

重复性试验：取样品（批号为220315）适量，按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果芍药苷峰面积的*RSD*为0.98%（$n=6$），表明方法重复性良好。

稳定性试验：取重复性试验项下供试品溶液，分别于0，2，4，6，8，10，12，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果芍药苷含量的*RSD*为0.62%（$n=6$），表明供试品溶液放置24 h内稳定性良好。

加样回收试验：取样品（批号为220315，芍药苷质量浓度为1.435 7 mg/mL），离心，精密量取上清液1 mL，共9份，分别按50%，100%，150%加入2.2项下对照品贮备液，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，计算回收率。结果见表1。

表1 芍药苷加样回收试验结果（$n=9$）

Tab. 1 Results of the recovery test of paeoniflorin（$n=9$）

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
1.435 7	0.767 5	2.150 4	93.12		
1.435 7	0.767 5	2.167 5	95.35		
1.435 7	0.767 5	2.164 3	94.93		
1.435 7	1.535 0	2.896 4	95.16		
1.435 7	1.535 0	2.902 4	95.55	95.03	0.78
1.435 7	1.535 0	2.899 6	95.37		
1.435 7	2.302 5	3.626 8	95.16		
1.435 7	2.302 5	3.624 9	95.08		
1.435 7	2.302 5	3.635 5	95.54		

2.4 样品含量测定

取样品（批号分别为220315，220511，220515，220525），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，以外标法计算含量。结果样品中芍药苷含量分别为1.41，1.43，1.47，1.58 mg/mL，平均含量为1.47 mg/mL。综合考察，大规模生产时中药材受产地、采收时间、炮制工艺、贮存条件、贮存时间的影响，拟订复方黄番口服液中芍药苷含量为1.0 mg/mL。根据2020年版《中国药典（一部）》白芍药材项下的规定，饮片中芍药苷含量不得少于1.6%，得本品芍药苷理论含量为2.4 mg/mL。按拟订限度与理论含量[6]计算，芍药苷转移率为41.67%。故最终暂订样品中芍药苷含量不得少于1.0 mg/mL。

3 讨论

3.1 指标性成分选择

芍药苷为白芍的主要有效成分，是一种蒎烷单萜苦味苷，易溶于水，通过水煎方式可有效提取，且在酸性和中性条件下相对较稳定，受光照的影响较小[7]，可作为质量控制的指标性成分。

3.2 色谱条件选择

参考2020年版《中国药典（一部）》收载的白芍药材项下含量测定方法[8]，并结合文献[9－11]，选择芍药苷的最大吸收波长230 nm作为含量测定的吸收波长。芍药苷易溶于甲醇[12－13]，以甲醇为溶剂。在流动相的选择上，参考文献[14－15]进一步优化，将流动相中的乙腈改为甲醇，将流动相中的水相改为0.1%磷酸溶液，结果芍药苷峰形对称，基线平稳，可准确定量检测。为考察芍药苷与其他组分的分离效果，进一步筛选不同洗脱比例，确定比例为甲醇－0.1%磷酸溶液（26∶74，*V*/*V*）时，芍药苷保留时间适宜，且阴性对照无干扰，故流动相选择甲醇－0.1%磷酸溶液（26∶74，*V*/*V*）。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法结果准确、稳定性和重复性均良好，可用于复方黄番口服液中芍药苷的含量测定。本研究中减少了乙腈的用量，减轻了对人和环境的危害，节约了成本。

参考文献

[1] 李园白，崔 蒙，杨 阳，等. 方剂剂量与君臣佐使关系初探[J]. 中草药，2015，46(13)：2011－2014.
[2] 徐佳新，许 浚，曹 勇，等. 中药白芍现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志，2021，49(21)：5486－5495.
[3] 崔 虹，朱佳茜，冯秋芳，等. 中药白芍化学成分及生物活性研究进展[J]. 海峡药学杂志，2017，29(9)：1－5.
[4] 曾兴琳，杨向东，杨 桃，等. 便秘临床分型与病因分类探讨[J]. 中华胃肠外科杂志，2022，25(12)：1120－1125.
[5] 贲 睿，孙 怡，李菲菲，等. 中药靶向治疗气虚型便秘的临床观察[J]. 中国中医药科技，2022，29(2)：295－296.
[6] 胡 婧，胡 斌，邓 莉，等. 胃炎颗粒中3种活性成分的定性鉴别及芍药苷含量测定[J]. 中国药业，2019，28(1)：31－34.
[7] 霍晓光，胡欣彤，陈丽霞，等. 芍药苷稳定性研究[J]. 中国科技论文，2017，12(18)：2092－2097.
[8] 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，2020：109.
[9] 张 艳，申丽莎，扬 帆，等. 赤芍药材中芍药苷含量测定方法的改进[J]. 中国药业，2017，26(24)：28－30.
[10] 杨丁懿，张永萍，杨芳芳，等. 壮骨舒筋丸药品质量标准研究[J]. 中国中医中药杂志，2020，41(2)：78－84.
[11] 王 玲，张悠杉，张长林. 丹栀颗粒的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学，2021，38(22)：2836－2840.
[12] 刘慧星. 益血膏中芍药苷含量测定方法的建立[J]. 药品评价，2021，18(23)：1429－1431.
[13] 程中琴，刘小妹，施崇精，等. HPLC法同时测定平脏调神颗粒中8种成分的含量[J]. 中国药房，2018，29(1)：33－37.
[14] 朱艺欣，李宝莉，马宏胜，等. 白芷的有效成分提取、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国医药导报，2014，11(31)：159－166.
[15] 解江纯，刘志东，田 慧，等. 芍药苷稳定性研究[J]. 天津中医药，2010，27(4)：344－345.

（收稿日期：2023－07－17；修回日期：2024－01－01）