

高效液相色谱法测定化湿败毒汤中芍药苷含量的研究

牟新^{1*}, 张灵晓², 谢丽芬¹, 王俊亮¹, 查圣华¹

(1. 北京同仁堂健康药业股份有限公司健康研究院, 北京 100085; 2. 罗斯德全球高中, 北京 100085)

摘要: **目的** 建立测定化湿败毒汤中芍药苷含量的高效液相色谱法。**方法** 色谱柱为 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05% 磷酸水溶液 (20 : 80, V/V), 流速为 0.8 mL/min, 柱温 30°C, 检测波长为 237 nm, 进样量为 10 μL。**结果** 芍药苷浓度在 24.68~246.8 μg/mL 范围内线性良好 ($r^2=0.9999$, $n=5$), 精密度、稳定性、重复性实验结果良好, RSD 值均小于 2%; 回收率为 102.0%, RSD 为 1.49% ($n=9$)。**结论** 该方法简单便捷, 易于操作, 专属性强, 分离度好, 重复性好, 适用于化湿败毒汤中芍药苷的测定, 能够为以赤芍为原料的复方制剂中芍药苷含量测定提供参考依据。

关键词: 化湿败毒汤; 赤芍; 芍药苷; 高效液相色谱法

Determination of paeoniflorin in a natural Chinese herbal medicine by high performance liquid chromatography

MOU Xin^{1*}, ZHANG Ling-Xiao², XIE Li-Fen¹, WANG Jun-Liang¹, ZHA Sheng-Hua¹

(1. The health research institute of Beijing TongRenTang Health-Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100085, China;
2. Rosedale Global High School, Beijing 100085, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of paeoniflorin in a natural Chinese herbal medicine. **Methods** The chromatographic column was C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile -0.05% phosphoric acid aqueous solution (20 : 80, V/V), the flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 30°C, the detection wavelength is 237 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of paeoniflorin was 24.68~246.8 μg/mL, the linearity of paeoniflorin was good ($r^2 = 0.9999$, $n = 5$), the results of precision, stability and repeatability experiment were good, and the RSD values were less than 2%, the average recovery was 102.0%, RSD was 1.49% ($n = 9$). **Conclusion** The method is simple, convenient, easy to operate, and with strong specific, good separation and good repeatability. It is suitable for the determination of paeoniflorin in natural Chinese herbal medicine, and provides a reference for the determination of paeoniflorin in compound preparations with Radix *Paeoniae rubra* as raw material.

KEY WORDS: a natural Chinese herbal medicine; Radix *Paeoniae Rubra*; paeoniflorin; high performance liquid chromatography method

0 引言

化湿败毒汤是在中医理论指导下, 用于治疗疫病的一种方剂^[1]。化湿败毒汤是由麻黄(Ephedra)、甘草(Licorice)、赤芍(Red peony)、厚朴(Hopu)等 10 余味中药组成的复方制剂, 具有清热解毒、燥湿利水、清虚火益肾阴的功效^[2]。在临床应

用中, 化湿败毒汤常用于治疗湿毒侵肺所致的发热、咳嗽、乏力、纳差、胸闷等症状。它通过调节人体的气血、阴阳平衡, 改善体内的湿毒环境, 增强机体的抵抗力, 从而达到治疗疾病的目的^[3]。

化湿败毒汤方剂中, 赤芍作为一种重要的组成部分, 其有效成分芍药苷是一种重要的活性成分。芍药苷是一种单萜

* 通信作者: 牟新, 研究方向为保健食品与食品的研究与开发。E-mail: xin_mu@trtjk.com

*Corresponding author: MOU Xin, Beijing Tong Ren Tang Health-Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100085, China. E-mail: xin_mu@trtjk.com

糖苷类化合物(Monoterpene glycosides)^[4],多为白色吸湿性无定形粉末,其化学性质不稳定,受强碱和温度影响明显,需在低温、冷冻条件下保存^[5]。近年来,芍药苷的方法研究不断取得进展,主要的检测方法有高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)^[6],液相色谱-质谱联用法(Liquid Chromatography Mass Spectrometry, LC-MS)^[7],超高效液相色谱法(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)^[8]等。以上方法均能准确高效地测定白芍、赤芍药材中芍药苷的含量,对于特定的含有芍药苷的复方制剂需要研究建立特定实验条件及方法,以准确测定其中芍药苷含量具有重要意义。从药效角度讲,芍药苷有抗炎作用,可以减轻炎症反应,在新型冠状病毒感染治疗中,对缓解肺部炎症等症状可能起到积极的辅助作用,因此通过检测其含量,能够更好地了解药物发挥抗炎作用的情况^[9]。从质量控制方面考虑,化湿败毒汤是复方制剂。芍药苷的含量检测有助于控制药物的质量,确保每一批次的化湿败毒汤中芍药苷含量稳定。通过了解复方中各成分之间的相互作用和配伍规律,可以保证药物疗效的一致性和稳定性,这对于临床安全、有效用药至关重要^[10]。

本研究以方剂中的赤芍为主要成分作为质控指标,采用高效液相色谱法测定,分析芍药苷的含量。对于赤芍中药材采用《中华人民共和国药典(2020版):一部》赤芍^[11]项下含量检测的方法,样品出峰良好,适用性强。对于本研究中,赤芍与其他汤剂中的中药材混合,预实验采用《中华人民共和国药典(2020版):一部》赤芍项下含量检测的方法,出峰效果较差,干扰因素较多,分离度差,信噪比高。因此,本研究拟在现行赤芍的检测标准上,优化检验条件,选择更适用于此产品化湿败毒汤中芍药苷的检测方法,旨在建立化湿败毒汤的质量控制方法和标准对方法进行分析研讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

化湿败毒汤混合药材样品(由杏仁、生麻黄、甘草、藿香、厚朴、苍术、草果、法半夏、茯苓、生大黄、生黄芪、葶苈子、生石膏、赤芍混合组成,购自同仁堂药店);芍药苷标准品(96.8%,中国食品药品检定研究院);甲醇、乙腈(色谱纯)、磷酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪[waters e2695,沃特世(美国)公司];电子天平(精度0.1 mg, ME204TE 梅特勒公司),本草萃取机(TRT889,北京同仁堂健康药业有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品溶液制备

将化湿败毒汤混合方剂中的混合药材进行粉碎,过40目

筛。准确称取混匀样品2 g,用本草萃取机(TRT889)萃取该样品,萃取溶液为水,萃取温度80℃,萃取压力1个标准大气压,搅拌速度200 r/min,萃取时间1 min,得到萃取液体为200 mL。萃取液用0.45 μm微孔滤膜过滤,备用。准确称取缺少赤芍样品的阴性样品2 g,按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液,备用。

1.3.2 标准溶液配制

准确称取芍药苷标准品12.75 mg,置25 mL容量瓶中,用甲醇溶解定容,作为标准品储备液,备用。精密吸取标准品储备液0.5、1、1.5、2、5 mL置10 mL容量瓶中,加甲醇定容至刻度,得到不同浓度的芍药苷标准溶液。

1.3.3 色谱柱的选择

色谱柱的选择过程中,充分考虑了流动相的比例及pH值等因素。对Agilent Zorbax SB-C₁₈、Kromasil-C₁₈及Waters Symmetry C₁₈三种色谱柱进行了考察。通过对比峰形、出峰时间和分离度效果等关键指标,最终确定Waters Symmetry C₁₈色谱柱为最佳选择。选择过程严谨且科学,确保了后续分析的准确性和可靠性。

1.3.4 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈:0.05%磷酸水溶(80:20);流速0.8 mL/min;检测波长237 nm;柱温为室温;进样量10 μL。在该色谱条件下,样品中被测成分芍药苷能够达到基线分离,理论塔板数均高于3000。

1.4 数据处理

采用Office Excel 2023和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)数据计算器对所有数据进行统计分析,使用Waters e2695对图谱进行采集与分析。

2 结果与分析

2.1 方法线性关系

分别吸取不同浓度的芍药苷标准溶液10 μL进样上机,测定其峰面积。以芍药苷浓度为横坐标,以其峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归,其回归方程分别为 $y=15590.0038x+18184.12$,相关系数为 $r^2=0.9999$,由此可知,芍药苷浓度在24.68~246.8 μg/mL范围内,线性关系良好。线性含量数据见表1,含量线性趋势见图1,对照品溶液色谱图见图2。

表1 含量测定线性实验
Table 1 Linear test for content determination

芍药苷浓度 (mg/mL)	24.6778	49.3557	74.0335	98.7114	246.7784
峰面积(AU)	421595	752517	1181412	1565347	3864602

2.2 方法专属性

分别精密吸取 1.3.1 及 1.3.2 项下的制备溶液, 结果显示供试品溶液色谱图与标准品溶液色谱图相同保留时间处有相应的色谱峰, 而且阴性对照品在相同保留时间处未出现相应的色谱峰, 排除阴性样品的干扰, 表明方法专属性良好。阴性对照品溶液色谱图见图 3。

2.3 重复性

取同一批化湿败毒汤供试品 6 份, 按 1.3 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 分别取 10 μ L 注入液相色谱仪, 根据液相色谱分析结果计算芍药苷的含量。由表 2 可知, 6 份样品芍药苷测定平均值为 8.53 mg/mL, 重复性良好, 其相对标准偏差(RSD)为 0.04%。重复性试验数据见表 2。供试品溶液色谱图见图 4。

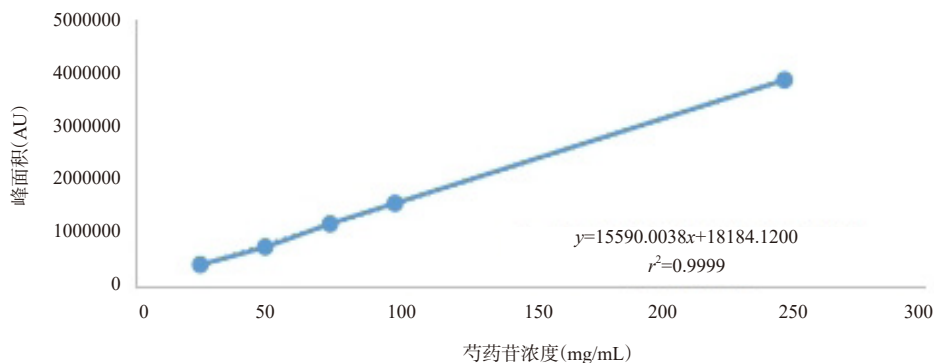


图 1 含量线性图

Fig.1 Content linear graph

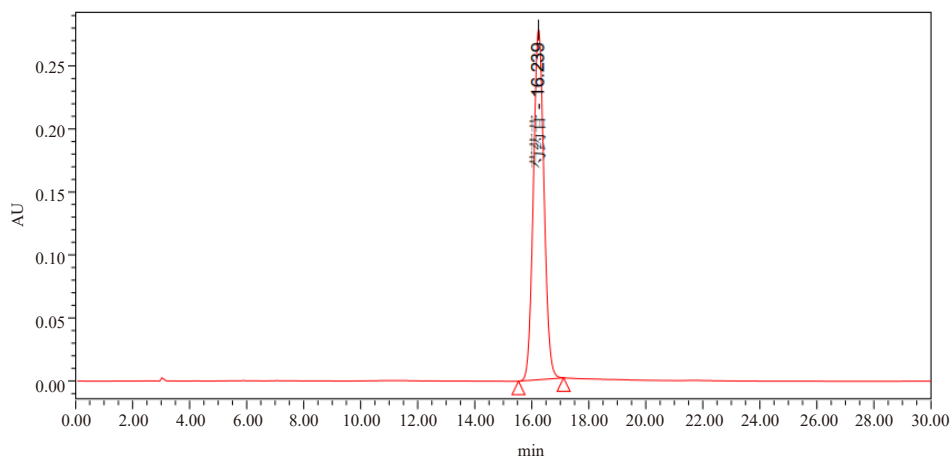


图 2 芍药苷对照品溶液色谱图

Fig.2 Chromatogram of paeoniflorin reference substance solution

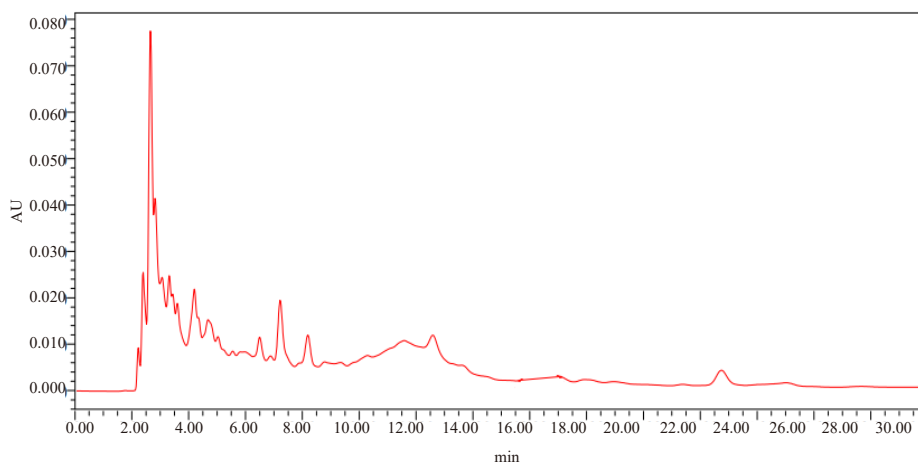


图 3 阴性对照品溶液色谱图

Fig.3 The chromatogram of negative control solution

2.4 稳定性

移取带测定溶液,并分别在不同时间进行样品检测($t=0$ 、2、4、8、12、24、48 h),根据检测结果计算RSD值。计算结果显示芍药苷质量分数检测结果的RSD值为0.56%,即不同时间段待测样品检测结果相对标准偏差均小于2.00%,这表明待测样品溶液在48 h内基本稳定,可满足本研究要求。

2.5 准确度

采用加标回收法,准确吸取制备的化湿败毒汤样品0.4 mL,共9份,编号1~9。已知样品中芍药苷含量为8.53 mg/mL,则样品所含芍药苷约为0.0341 mg,依据《中华人民共和国药典(2020年版):四部》药品质量标准分析方法验证指导原则^[12]准确度的要求,高、中、低浓度对照品加入量与所取供试品中待测成分量控制在合理范围内,则样品中分别加入约0.0204、

0.0308、0.0408 g对照品,即7~9号加入约0.0408 g芍药苷标准品,4~6号加入约0.0308 g芍药苷标准品,1~3号加入0.0204 g芍药苷标准品。按此方法制备待测溶液,并继续制备供试品溶液,取10 μ L注入液相色谱仪,测定含量。结果表明,芍药苷的平均回收率为102.0%,RSD=1.49%,表明方法可信,回收率数据见表3。

表2 含量测定方法重复性实验($n=6$)
Table 2 Repeatability test of assay method ($n=6$)

样品编号	称样量(g)	含量(mg/mL)	平均值(mg/mL)	RSD(%)
1	2.0371	8.55	8.53	0.04
2	2.0299	8.55		
3	2.0176	8.55		
4	2.0107	8.46		
5	2.0087	8.54		
6	2.0022	8.54		

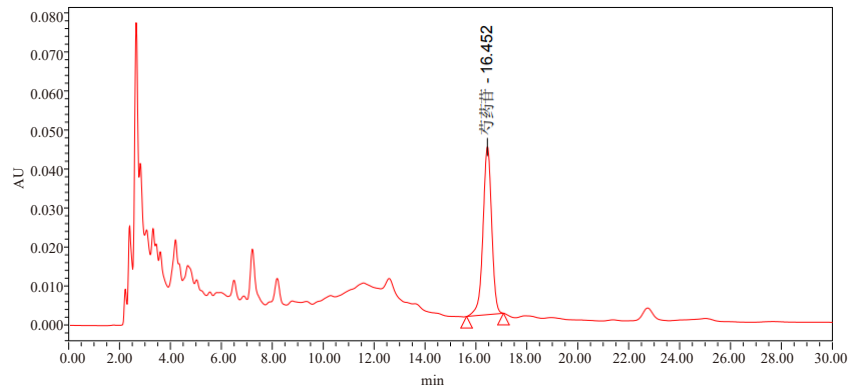


图4 芍药苷供试品溶液色谱图
Fig. 4 Chromatogram of paeoniflorin solution

表3 含量测定回收率试验
Table 3 Test for determination of content recovery rate

样品编号	称样量(mL)	样品中含量(mg)	标品加入量(mg)	测定总量(mg)	回收率(%)
1	0.4	0.0341	0.0204	0.0546	100.53
2	0.4	0.0341	0.0204	0.0546	100.62
3	0.4	0.0341	0.0204	0.0547	100.98
4	0.4	0.0341	0.0306	0.0658	103.38
5	0.4	0.0341	0.0306	0.0653	102.03
6	0.4	0.0341	0.0306	0.0647	99.93
7	0.4	0.0341	0.0408	0.0761	102.86
8	0.4	0.0341	0.0408	0.0765	103.88
9	0.4	0.0341	0.0408	0.0764	103.72
平均值			102.0		
RSD(%)			1.49		

3 结论与讨论

在对化湿败毒汤中赤芍所含芍药苷的研究中,预实验先是采用《中华人民共和国药典(2020年版):一部》赤芍项下含量检测的方法,以甲醇:0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(40:65)为流

动相,检测波长设为230 nm,流速设置为1.0 mL/min。然而,在此条件下,样品的出峰效果未达预期。随后又对《中华人民共和国药典(2020年版):一部》白芍^[13]项下含量测定方法及甘草^[14]项下含量测定方法展开考察,并在190~400 nm区间进行光谱扫描,经过大量反复实验,对流动相及流动相比例,流

速进行优化。最终使用乙腈:0.1%磷酸水溶液及乙腈:0.05%磷酸水溶液对供试品溶液进行上机检测,分析其对供试品溶液色谱峰分离效果的影响。结果显示,以流动相乙腈:0.05%磷酸水溶液(80:20);流速0.8 mL/min;检测波长237 nm;柱温30°C;按照此色谱条件进样测定,芍药苷色谱峰形良好,且受干扰性少。此方法线性在24.68~246.8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内相关性较好;此方法重复性良好,专属性强,稳定性和准确度高,满足要求;平均回收率可达102.0%,说明此方法准确、可靠,适用于化湿败毒汤中芍药苷的含量测定。在利用高效液相测定化湿败毒汤中芍药苷的研究过程中,采用的新型的流动相体系,可在更短的时间内,使芍药苷与化湿败毒汤中其他复杂成分(如多种黄酮类、生物碱类等成分)实现更理想的分离。相较于测定单一成分的药典方法,新的流动相组成选择性更佳,有效减少了峰展宽和拖尾现象,极大提高了分离效率和分析速度。针对化湿败毒汤这种复杂的中药复方样本,在样品前处理方面开发了一种全新的提取方法,这种方法融合了现代提取技术(高效萃取机)和特定的净化步骤,不仅能够更高效地从复方中提取芍药苷,而且可去除杂质干扰。与传统的熬制中药的方式相比,这种新方法能够更精准地提取目标成分,大幅缩短提取时间,同时提高了有效成分的溶出率及稳定性。

本研究准确测定了化湿败毒汤中芍药苷的含量,为化湿败毒汤的质量控制提供了关键数据支撑。例如,经研究发现不同批次的化湿败毒汤中芍药苷含量存在一定的波动范围,而这种波动可能与药材来源、炮制方法等因素相关。通过对大量样本的分析,能够确定一个合理的含量范围,以此作为质量标准的参考依据。基于芍药苷含量测定结果,可以构建更为完善的化湿败毒汤质量控制体系。除对单一成分芍药苷进行含量测定外,还将结合其他指标成分的分析,并运用化学计量学方法,如主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)等,实现对化湿败毒汤质量全面且精准的评价。

通过本研究及现阶段化湿败毒汤的临床应用,可以进一步深入探究芍药苷与化湿败毒汤中其他成分的协同作用机制。例如,借助细胞实验和动物模型,观察芍药苷与其他活性成分(如黄芪中的黄芪甲苷等)共同作用时,对免疫调节、抗病毒等药效产生的影响;开展芍药苷在体内的药代动力学研究,深入了解其在动物或人体中的吸收、分布、代谢和排泄过程。这对于确定化湿败毒汤的给药方案、剂量等至关重要,同时有助于进一步理解芍药苷在体内发挥药效的具体过程。

本研究在化湿败毒汤中赤芍的芍药苷测定方面取得了一定成果,优化了实验条件,简化了实验流程,有效避免了混合汤剂中其他药材的干扰,成功建立了化湿败毒汤中芍药苷测定的新方法。这一新方法提高了质量控制的准确性,能够精确

检测化湿败毒汤中有效成分芍药苷的含量。本研究为化湿败毒汤质量标准的提升提供了坚实的实验依据,并且能够推动行业的标准化进程,在同类产品领域建立统一且更科学的质量控制标准,促使不同企业生产的以赤芍为主要原料的复方制剂都能在高质量标准下进行生产和检验,进而提升整个行业的质量水平。

参考文献

- [1] 陈琳,郭敬,车前子,等.基于“抗疫四方”浅谈古代经典明方化裁方新药中医理论研究[J].中国中医基础医学杂志,2024,30(07):1161-1166.
- [2] 李国卫,罗宇琴,魏梅,等.基于多元统计的化湿败毒颗粒特征图谱分析及活性成分含量测定[J].今日药学,2022,32(07):490-498,519.
- [3] 魏朝法.基于代谢组学-网络药理学研究化湿败毒方的药效物质基础[D].北京:中国中医科学院,2023.
- [4] WU SH, WU DG, CHEN YW. Chemical constituents and bioactivities of plants from the genus paeonia [J].Chem Biodivers,2010,7(01):90-104.
- [5] 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.
- [6] 丁家昱,韩宪忠,番正.高效液相色谱法测定复方香芍口服液芍药苷含量[J].中国药业,2022,31(19):74-76.
- [7] 黄开福,王学美,孟志云.液相色谱-串联质谱法研究四物汤中芍药苷和芍药内酯苷在大鼠体内药代动力学[J].国际药学研究杂志,2014,41(01):108-113.
- [8] 陆小云,楚楚,颜继忠.超高效液相色谱法同时测定白芍芍药苷和芍药内酯苷的含量[J].中南药学,2012,10(02):98-100.
- [9] 王倩,李柳潼,马永彝,等.白芍与赤芍化学成分和药理作用比较研究及质量标志物的预测分析[J].中国新药杂志,2021,30(12):1093-1098.
- [10] 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.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2020年版):一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:165-166.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2020年版):四部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2020年版):一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:108-109.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2020年版):一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:88-89.