

HPLC 法测定利儿康口服液中芍药苷含量

赵沛月^{1,2}, 徐松^{1,2}, 邓斌^{1,2}, 金笛^{1,2}, 沈红娅^{1,2}, 杨志^{1,2}, 刘伍云^{3*}

(1. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111; 2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111;
3. 云南白药集团股份有限公司, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 建立利儿康口服液中芍药苷含量测定的高效液相色谱法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Waters Sunfire RP18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液 (v/v 15:85), 流动相流速为 1.0 mL/min, 设定柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 230 nm。精密量取利儿康口服液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加纯净水至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 进样 10 μL 测定。结果 该方法选用较为环保的溶剂, 简化了供试品的前处理方法。芍药苷含量在 0.006 0~0.602 5 mg/mL 范围内与峰面积呈良好线性关系, $R^2=1.000$ 0。该法的平均回收率为 100.34%, RSD 值为 0.49% ($n=6$)。结论 本研究建立的方法测定结果准确, 相比现行标准, 供试品制备方法简便、快捷、低成本、环境友好, 更适用于利儿康口服液的质量评价控制。

关键词: 高效液相色谱法; 利儿康口服液; 芍药苷; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2025)02-0103-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2025.02.016

利儿康口服液(以下简称为“利儿康”)为云南白药集团股份有限公司独家产品,是由白术、莲子、白芍、牡蛎(煅)、龙骨、陈皮、麦芽(炒)、谷芽(炒)、鸡内金(炙)等经提取制成的口服液,具有健脾、消食、开胃作用。临床用于治疗小儿疳积,脾虚所致的小儿体弱、厌食、多汗、性情焦躁、大便异常等。利儿康现行质量标准为通过对指标性成分芍药苷含量的测定和白芍的薄层鉴别进行质控,其中芍药苷含量测定项供试品溶液制备方法操作繁琐。在日常质量检验过程中,大大增加了检验人员的工作量,消耗更多的时间和试剂。原质量标准中采用丙酮-乙醇进行索氏回流提取,制备污染的水直接稀释样品所得。简化样品前处理方法,不仅提高利儿康口服液中芍药苷含量检测的准确度,还可降低企业的检验成本,减少检验人员的工作量,更有利于利儿康口服液的质量控制。

1 仪器和试剂

高效液相色谱仪:Waters e2695(美国 Waters 公司);Agilent 1260 series(美国 Agilent 公司)。利儿康口服液(批号:ZKA1801S、ZKA1802S 和 ZKA1803S;

云南白药集团股份有限公司);芍药苷对照品(含量以 97.2%计;批号:110736-201741 和 110736-201842;购自中检院);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Waters Sunfire RP18(5 μm , 4.6mm \times 250mm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;以乙腈-0.1%磷酸溶液(v/v 15:85)为流动相;测定流速为 1.0 mL/min;芍药苷色谱峰出峰 3 min 后用纯乙腈洗脱色谱柱 10 min,并平衡色谱柱,检测波长为 230 nm。在此条件下测得芍药苷色谱峰的 t_R 约为 13 min,分离度大于 1.5;色谱柱的理论板数按芍药苷色谱峰计算大于 6 000。

2.2 溶液制备方法

2.2.1 对照品溶液的制备 对照品溶液:芍药苷对照品经 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重,取适量,精密称定,加纯净水,使每 1 mL 溶液中含芍药苷约 0.2 mg,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取利儿康口服液 5 mL,置 50 mL 玻璃量瓶中,加纯净水至刻度,摇匀,

基金项目:云南实验室-云南特色植物筛选与研发服务 CXO 平台建设(2022YKZY001)

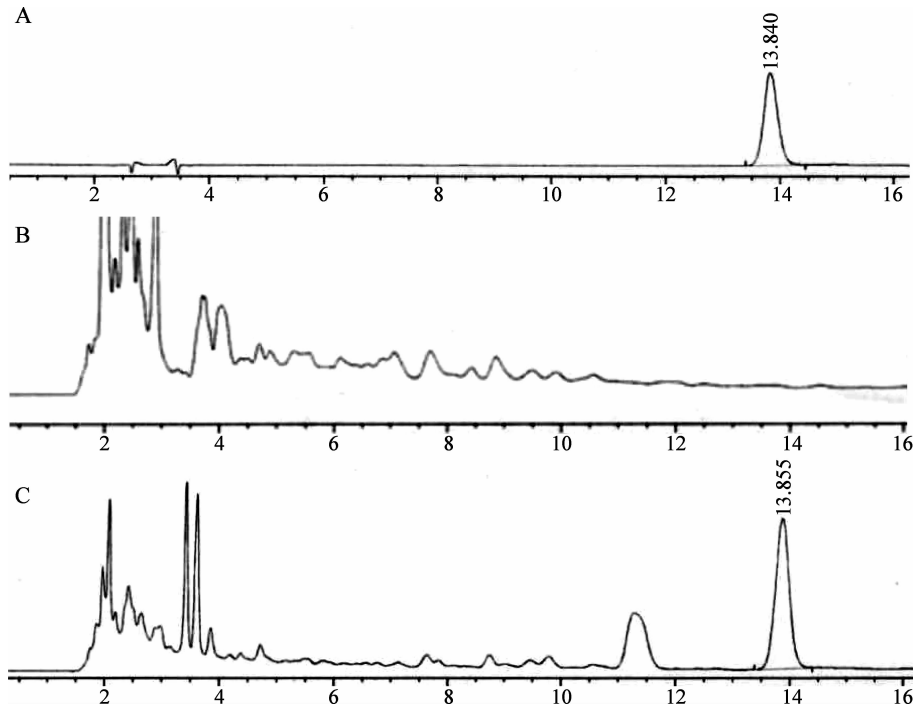
作者简介:赵沛月(1982-),女,副主任药师,E-mail: zhaopeiyue@ynby.cn

* 通信作者:刘伍云(1980-),男,副主任药师,研究方向:药品质量管理,E-mail: 754830688@qq.com

用 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按利儿康口服液处方及制法,取除白芍的其他饮片制备白芍阴性对照口服液,按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性 取上述制备好的对照品溶液、供试品溶液和不含白芍的阴性对照溶液,照“2.1”项色谱条件测定,分别记录色谱图。结果表明,本法专属性良好,阴性对照不干扰芍药苷的含量检测。结果见图 1。



注:A 为芍药苷对照品;B 为阴性样品;C 为供试品

图 1 利儿康口服液典型色谱图

2.4 线性关系 精密称取经 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的芍药苷对照品,加适量甲醇配制成每 1 mL 含芍药苷 0.602 5 mg 的对照品储备液,取储备液用纯净水分别稀释成 0.301 3、0.120 5、0.060 3、0.024 1、0.012 1 和 0.006 05 mg/mL 的供试品溶液。分别精密吸取各对照品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定,记录色谱图。以芍药苷吸收峰面积的积分值为纵坐标 y ,进样浓度为横坐标 x (mg/mL),绘制标准曲线(图 2)。回归方程 $y = 11909219.0167x + 770.5591$, $R^2 = 1.0000$ 。表明芍药苷在测定浓度 0.006 0~0.602 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)与峰面积线性关系良好。

2.5 重复性试验 取利儿康(批号:ZKA1803S)6 份,分别按供试品溶液制备方法制备,按“2.1”项色谱条件测定。结果显示,每支口服液含芍药苷 8.980 1、9.117 3、9.130 5、9.088 1、8.828 6 和 9.149 8 mg, RSD 值为 1.37% ($n = 6$),表明该方法重复性较好。

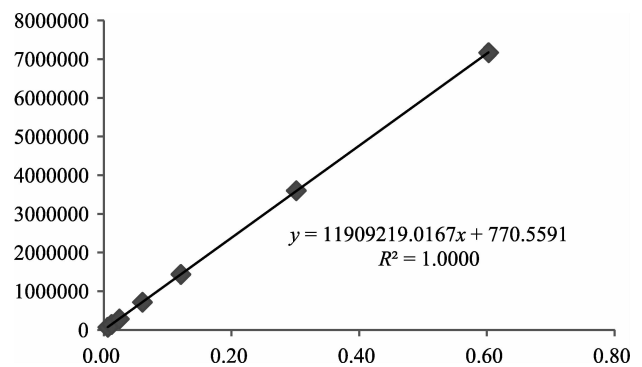


图 2 芍药苷线性关系图

2.6 精密度试验 精密吸取供试品溶液(批号:ZKA1803S)10 μL ,重复进样 6 次,按“2.1”项色谱条件测定。峰面积分别为 1 102 936、1 108 003、1 104 255、1 106 071、1 104 688 和 1 105 952, RSD 值为 0.16% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(批号:ZKA1803S)10 μL ,分别于 0、2、4、8 和 24 h 进样,

按“2.1”项色谱条件测定。峰面积分别为 1 104 717、1 105 497、1 106 419、1 112 971 和 1 101 438, RSD 值为 0.38% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率 取利儿康(批号:ZKA1803S)6 份, 分别加入芍药苷对照品溶液,按供试品溶液的制备方法操作,按“2.1”项色谱条件测定。按外标法计算含量,并计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 芍药苷回收率

样品名称	供试品取样量/mL	供试品加入量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
供试品含量	10	9.530 0	/	/	/	/	/
加样样品 1	5	4.763 0	3.627 7	8.408 9	100.50	99.92	0.49
加样样品 2	5	4.763 0		8.366 5	99.33		
加样样品 3	5	4.763 0		8.395 6	100.14		
加样样品 4	5	4.763 0		8.365 3	99.30		
加样样品 5	5	4.763 0		8.396 0	100.14		
加样样品 6	5	4.763 0		8.394 7	100.11		

2.9 样品含量测定 取利儿康样品 3 批,按“2.2”项下制备供试品溶液,“2.1”项色谱条件测定。结果见表 2。

表 2 利儿康口服液芍药苷含量测定结果($n = 3$)

样品批号	现行标准			拟修订方法		
	含量 ($\text{mg}\cdot\text{支}^{-1}$)	RSD /%	制样时间 /min	含量 ($\text{mg}\cdot\text{支}^{-1}$)	RSD /%	制样时间 /min
ZKA1801S	6.116 8	1.46		7.134 1	0.49	
ZKA1802S	8.098 0	2.91	360	8.042 0	0.06	5
ZKA1802S	8.207 3	5.56		9.089 8	0.23	

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的对比 利儿康口服液为

云南白药股份有限公司独家产品,在样品检验时发现样品含量测定结果重复性差,有检验结果不符合标准要求的风 险。本研究对利儿康口服液现行国家标准 WS3-027(X-012)-2000(Z)和拟修订方法进行详细对比研究,结果详见表 3。现行标准供试品在制备时使用丙酮和乙醇为溶剂,成本高,方法较繁琐,供试品制备时间较长,需约 6 h,方法准确度偏低,重复性差,对企业来说检验成本较高。研究证实现行标准的含量测定供试品溶液制备过程中部分芍药苷在碱性条件下会水解(见图 3),部分芍药苷被硅藻土和碱性氧化铝吸附,从而使检测结果不准确,不利于商业化生产样品的质量检验。本研究拟定的供试品制备方法所用溶剂为水,廉价易得,供试品制备仅需

表 3 供试品溶液的制备方法对比

项目	现行标准	拟修订方法
方法描述	精密量取本品 10 mL,置蒸发皿中,加入碱性氧化铝和硅藻土各 2 g,置水浴锅上缓缓搅拌加热至近干,置索氏提取器中,加丙酮-乙醇(2:1)回流提取 4 h,提取液浓缩至 1~2 mL,用水 12 mL 分次溶解,滤过(可加少许硅藻土助滤),滤液置 25 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,摇匀,即得。	精密量取本品 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加纯净水稀释至刻度,摇匀,用 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。
操作繁易	繁琐、重复性差	简便、快捷、重复性好
溶剂	丙酮、乙醇	纯水
制样时间/min	360	5
准确度/RSD	91.03%/4.87%	99.92%/0.49%
碱性氧化铝和硅藻土中芍药苷残留率/%	5~10	/

5 min,且方法准确度较高(回收率接近100%),样品制备无吸附过程,完全转移,检验结果能够真实反映样品质量,极大减少制样时间成本及溶剂成本。供试品制备方法改进不仅可以降低企业的检验成本,减少检验人员的工作量,还更有利于对利儿康口服液的质量控制。

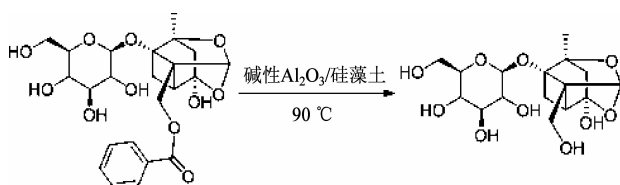


图 3 芍药苷在碱性条件下的水解过程

3.2 供试品制备稀释溶剂的选择 供试品的制备方法选择直接稀释利儿康口服液,滤过,取续滤液的处理方法,参照《中华人民共和国药典》(2020 年版一部) 收载“白芍”含量测定项下供试品制备方法^[1]和相关文献报道^[2],纯化水、甲醇、75%乙醇、稀乙醇均可作为芍药苷的提取溶剂,且无显著性差异,因此分别选择纯化水、甲醇、80%乙醇、50%乙醇作为稀释溶剂进行考察。结果显示,纯化水、甲醇、80%乙醇、50%乙醇作为稀释溶剂的样品峰面积 RSD 值为 1.11%,无显著性差异。在 3 种溶剂中,纯化水具有较好的安全性,可以避免甲醇较强的毒性,且纯化水廉价,因此使用纯化水优于甲醇和乙醇。

3.3 测定波长的选择 取对照品溶液,应用 Waters PAD 检测器对芍药苷对照品溶液在 200~400 nm 的波长范围内扫描,芍药苷在 230 nm 处具有最大吸收,因此将检测波长确定为 230 nm。

3.4 流动相的优化 结合文献[3-8]报道及《中华人民共和国药典》(2020 年版一部)收载“白芍”的含量测定方法,选择乙腈-磷酸溶液、乙腈-甲醇-水、甲醇-水、甲醇-磷酸溶液进行最佳流动相的探索。结果显示,当流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85)时,芍药苷可以达到有效分离且干扰的色谱峰不会影响芍药苷的含量测定,在实际检测过程中发现,色谱柱中残留成分会对芍药苷的测定产生影响。因此,选择乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85),流速 1.0 mL/min,芍药

苷吸收峰出峰 3 min 后用纯乙腈洗脱色谱柱 10 min,并平衡色谱柱作为利儿康口服液中芍药苷 HPLC 含量测定的流动相条件。

3.5 质量控制指标的选择 利儿康口服液中白术、莲子、牡蛎(煅)、龙骨、陈皮、麦芽(炒)、谷芽(炒)、鸡内金(炙)等药味中,白术的多数报道均是测定白术内酯 I、白术内酯 II 和白术内酯 III,但其在药材中含量极低,在口服液中因其低于鉴定限,未能检出,在本品的质量标准中已通过薄层鉴别对白术进行鉴别。莲子中主要含黄酮类成分,暂未见专属性成分报道。牡蛎(煅)和龙骨主要成分为钙盐和微量元素。麦芽(炒)、谷芽(炒)、鸡内金(炙)等饮片暂未见专属成分或特定指标性成分报道。陈皮指标成分常选用橙皮苷,陈皮在处方中为佐药,已通过薄层鉴别对陈皮进行鉴别,暂未开展橙皮苷含量测定的相关研究。

综上所述,建立的新方法测定结果准确,且相比现行标准,供试品制备方法简便、快捷、低成本,更适合于利儿康口服液的质量评价控制。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》[M].一部.北京:中国医药科技出版社,2020:154.
- [2] 董明纲,郭春燕,张力,等.赤芍中芍药苷提取溶剂的选择[J].四川中医,2006,24(6):35-37.
- [3] 李娟,杨婉花,陈冰,等.HPLC 法测定伸筋活血合剂中芍药苷的含量[J].实用药物与临床,2010,13(1):27-29.
- [4] 张静,杨俊,李娟.HPLC 法测定消乳散结胶囊中芍药苷的含量[J].中医药导报,2011,17(2):73-74.
- [5] 江涛,莫斯.HPLC 法测定追风透骨胶囊中芍药苷的含量[J].海峡药学,2010,22(11):70-72.
- [6] 倪文澎,钱平,周琴妹,等.RP-HPLC 法同时测定养生丸中芍药苷和阿魏酸的含量[J].中国药师,2010,13(8):1114-1116.
- [7] 饶俊珍,程璐,熊鑫.根痛合剂中葛根素和芍药苷的含量测定[J].今日药学,2017,27(1):17-19,23.
- [8] 聂晓洁,尹云泽,赵欣,等.清心牛黄片中芍药苷含量测定方法的探索[J].天津药学,2016,28(4):15-17.

(收稿日期:2024-07-01)