

[质 量]

祛风止痛胶囊 HPLC 指纹图谱建立及 7 种成分同时测定

廖禹程^{1,2}, 丁 一², 张娟利², 王婧雯², 文爱东², 李锐莉², 胡君萍^{1*}, 杨建华^{1,3*}
(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 空军军医大学第一附属医院药剂科, 陕西 西安 710032; 3. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 建立祛风止痛胶囊(老鹳草、槲寄生、续断等) HPLC 指纹图谱, 并同时测定没食子酸、马钱苷酸、紫丁香苷、柯里拉京、马钱苷、鞣花酸、蛇床子素含量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 254 nm。**结果** 10 批样品 HPLC 指纹图谱中有 21 个共有峰, 相似度均大于 0.986。7 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999\ 7$), 平均加样回收率 99.1%~101.5%, RSD 1.42%~1.96%。**结论** 该方法简便高效, 稳定可靠, 可用于祛风止痛胶囊的质量控制。
关键词: 祛风止痛胶囊; HPLC 指纹图谱; 化学成分
中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2022)10-3111-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.005

Establishment of HPLC fingerprints for Qufeng Zhitong Capsules and simultaneous determination of seven constituents

LIAO Yu-cheng^{1,2}, DING Yi², ZHANG Juan-li², WANG Jing-wen², WEN Ai-dong², LI Rui-li², HU Jun-ping^{1*}, YANG Jian-hua^{1,3*}
(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints for Qufeng Zhitong Capsules (*Geranii Herba*, *Visci Herba*, *Dipsaci Radix*, etc.) and to simultaneously determine the contents of gallic acid, loganylic acid, syringin, corilagin, loganin, ellagic acid and osthole. **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic Agilent C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 254 nm. **RESULTS** There were twenty-one common peaks in the HPLC fingerprints of ten batches of samples with the similarities of more than 0.986. Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 7$), whose average recoveries were 99.1%–101.5% with the RSDs of 1.42%–1.96%. **CONCLUSION** This simple, efficient, stable and reliable method can be used for the quality control of Qufeng Zhitong Capsules.
KEY WORDS: Qufeng Zhitong Capsules; HPLC fingerprints; chemical constituents

祛风止痛胶囊收载于 2020 年版《中国药典》一部, 中老鹳草为君药, 用量最大, 具有清热利湿、祛风通络等功效^[1]; 槲寄生、续断为臣药, 具有强筋骨、补肝肾、止崩漏、祛风湿等功

收稿日期: 2021-06-09
基金项目: 国家自然科学基金项目(82074321); 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(XJDX1713); 陕西省重点研发计划社会发展项目(2021SF-379)
作者简介: 廖禹程(1988—), 男, 博士, 主管药师, 从事药品质量控制研究。E-mail: 414419797@qq.com
* 通信作者: 胡君萍(1971—), 女, 博士, 教授, 从事药品质量控制研究。Tel: (0991) 4362893, E-mail: hjp-yft@163.com
杨建华(1971—), 男, 博士, 主任药师, 从事药品质量控制研究。Tel: (0991) 7920270, E-mail: yjh-yft@163.com

效^[2-3]；威灵仙、独活、制草乌、红花为佐使药，具有活血化瘀、祛风除湿、散湿去肿、通络止痛等功效^[4-5]，该制剂在祛风寒、补肝肾、壮筋骨方面疗效确切，可用于治疗风寒湿邪闭阻、肝肾亏虚所致的痹病，同时对类风湿关节炎、偏头痛也能起到良好效果^[6-8]。

近年来，通过指纹图谱来全面反映中药制剂中化学成分的质量控制方法已成为国内外流行的评价模型^[9-12]，但尚无祛风止痛胶囊的相关报道。因此，本实验首次建立了祛风止痛胶囊 HPLC 指纹图谱，并同时测定没食子酸、马钱苷酸、紫丁香苷、柯里拉京、马钱苷、鞣花酸、蛇床子素的含量，该方法实用高效，可为该制剂质量控制提供科学依据，从而保证临床用药的安全性和有效性。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AD 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；YP10002 型电子分析天平（十万分之一，上海衡际科学仪器有限公司）；KQ-300DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Milli-Q System 超纯水仪（美国密理博公司）。

1.2 试剂与药物 祛风止痛胶囊共 10 批（陕西步长制药有限公司，批号分别为 20190322、20190423、20190508、20190606、20190712、20190820、20190915、20191007、20191108、20191202）。没食子酸（批号 110831-201906，纯度 91.5%）、马钱苷酸（批号 111865-202005，纯度 97.5%）、紫丁香苷（批号 111574-201605，纯度 95.2%）、柯里拉京（批号 111623-200302，纯度 98%）、马钱苷（批号 111640-201808，纯度 99%）、鞣花酸（批号 111959-201903，纯度 88.8%）、蛇床子素（批号 110822-201710，纯度 99.5%）对照品均购于中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯（天津市富宇精细化工有限公司）；磷酸为优级纯（天津永晟精细化工有限公司）。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流动相甲醇（A）-0.2% 磷酸（B），梯度洗脱（0~10 min，5% A；10~20 min，5%~20% A；20~40 min，20%~25% A；40~50 min，25%~40% A；50~70 min，40%~50% A；70~80 min，50%~70% A；80~90 min，70%~90% A；90~100 min，90%~100% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35℃；检测波长 254 nm；进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取没食子酸、马钱

苷酸、紫丁香苷、柯里拉京、马钱苷、鞣花酸、蛇床子素对照品适量，甲醇制成质量浓度分别为 58、122、24、58、25、26、27 μg/mL 的溶液，即得。

2.3 供试品溶液制备 取本品 5 粒，混合均匀，研成细粉，精密称取 0.2 g，置于量瓶中，甲醇定容至 10 mL，称定质量，超声处理 30 min，冷却，甲醇补足减失的质量，充分摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似性评估系统（2012A 版）”^[13]，中位数法生成对照图谱，计算相似度，结果见表 1，可知均大于 0.986，表明本品内在质量相对稳定。

表 1 10 批样品相似度
Tab. 1 Similarities of ten batches of samples

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.998	S6	0.999
S2	0.999	S7	0.986
S3	0.999	S8	0.988
S4	0.999	S9	0.999
S5	0.999	S10	0.999

2.5 色谱峰鉴定 10 批样品 HPLC 指纹图谱中有 21 个共有峰，见图 1，通过与对照品比对，指出 4 号峰为没食子酸，6 号峰为马钱苷酸，7 号峰为紫丁香苷，10 号峰为柯里拉京，11 号峰为马钱苷，16 号峰为鞣花酸，20 号峰为蛇床子素，见图 2，由于 16 号峰（鞣花酸）峰面积最大，分离度良好，故选择其作为参考峰。

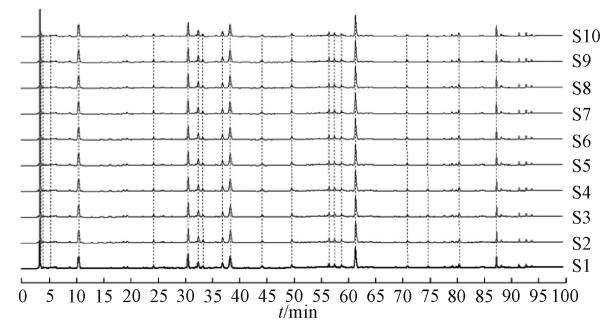
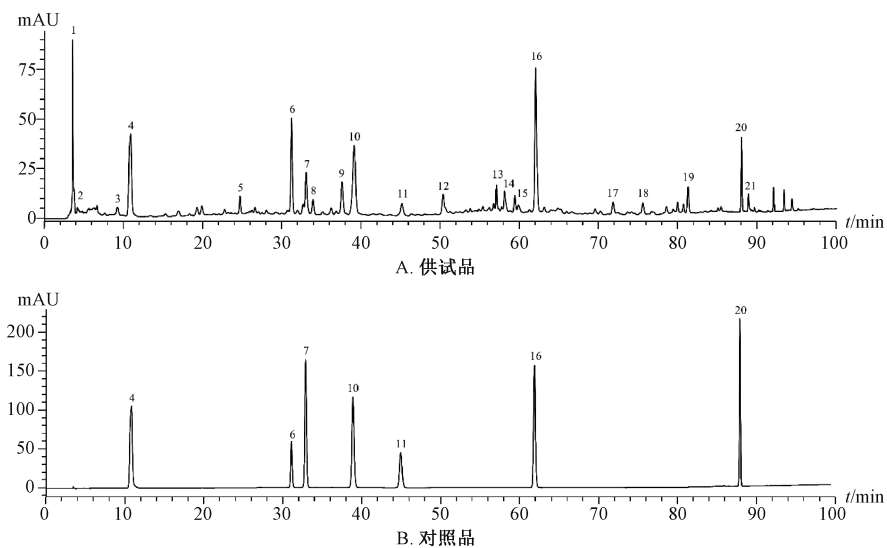


图 1 10 批样品 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprints for ten batches of samples

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液适量，依次倍量稀释，分别吸取 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品峰面积（Y）对其质量浓度（X）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。



4. 没食子酸 6. 马钱苷酸 7. 紫丁香苷 10. 柯里拉京 11. 马钱苷 16. 鞣花酸 20. 蛇床子素
4. gallic acid 6. loganin acid 7. syringin 10. corilagin 11. loganin 16. ellagic acid 20. osthole

图 2 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of various constituents

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
没食子酸	$Y=17\,227X-44\,832$	0.999 8	9.63~346.52	
马钱苷酸	$Y=6\,012.1X-15\,629$	0.999 8	20.41~734.92	
紫丁香苷	$Y=17\,877X-44\,592$	0.999 8	3.98~143.32	
柯里拉京	$Y=16\,466X-45\,334$	0.999 8	9.67~348.15	
马钱苷	$Y=7\,395.8X-20\,473$	0.999 8	4.13~148.71	
鞣花酸	$Y=51\,628X-51\,044$	0.999 7	4.28~153.92	
蛇床子素	$Y=12\,842X-31\,434$	0.999 8	4.57~163.97	

2.6.2 精密度试验 精密称取同一批本品（批号 191202）0.2 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得没食子酸、马钱苷酸、紫丁香苷、柯里拉京、马钱苷、鞣花酸、蛇床子素峰面积 RSD 分别为 0.49%、0.49%、0.38%、0.55%、0.78%、0.48%、0.48%，表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 精密称取同一批本品（批号 191202）0.2 g，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、马钱苷酸、紫丁香苷、柯里拉京、马钱苷、鞣花酸、蛇床子素峰面积 RSD 分别为 0.70%、0.40%、0.37%、0.47%、0.44%、1.27%、0.37%，表明该方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 精密称取同一批本品（批号 191202）0.2 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、3、6、9、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、马钱苷酸、紫丁香

苷、柯里拉京、马钱苷、鞣花酸、蛇床子素峰面积 RSD 分别为 0.24%、0.33%、0.37%、0.26%、0.42%、0.93%、0.28%，表明溶液在室温〔（25±5）℃〕下 24 h 内稳定性良好。

2.6.5 加样回收率试验 取各成分含量已知的本品（批号 191202）0.1 g，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，加入对照品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，没食子酸、马钱苷酸、紫丁香苷、柯里拉京、马钱苷、鞣花酸、蛇床子素平均加样回收率分别为 101.0%、100.1%、100.6%、99.1%、99.1%、101.5%、101.3%，RSD 分别为 1.89%、1.42%、1.71%、1.82%、1.58%、1.92%、1.96%。

2.7 样品含量测定 精密称取 10 批样品，每批 0.2 g，按“2.3”项下方法各平行制备 3 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 3。

3 讨论

本实验优化了不同色谱条件下流动相组成，其中溶剂 A 选用甲醇、乙腈，发现前者洗脱时色谱图上有更多峰；溶剂 B 选用纯水、0.1% 磷酸、0.2% 磷酸、0.5% 磷酸，发现 0.2% 磷酸洗脱时出现更多峰，在抑制峰拖尾、增加峰形对称性方面更理想。再考察了柱温 30、35、40℃，发现在 35℃ 下呈现出更好的色谱峰分离。最后，记录了 200~400 nm 波长处各成分紫外光谱，最终确定为 254 nm，

表 3 各成分含量测定结果 (μg/g, n=3)							
Tab. 3 Results of content determination of various constituents (μg/g, n=3)							
批号	没食子酸	马钱苷酸	紫丁香苷	柯里拉京	马钱苷	鞣花酸	蛇床子素
20191202	292. 36	612. 44	121. 45	293. 72	126. 67	132. 89	136. 44
20191108	294. 31	611. 23	123. 33	297. 36	125. 65	131. 78	137. 74
20191007	291. 55	615. 31	125. 41	294. 75	128. 88	130. 37	133. 33
20190915	296. 73	617. 78	120. 73	293. 77	122. 67	133. 47	135. 52
20190820	298. 45	613. 33	118. 86	289. 63	123. 34	129. 74	136. 69
20190712	287. 36	608. 54	123. 99	291. 84	125. 99	132. 23	137. 51
20190606	288. 21	606. 63	126. 35	289. 27	127. 73	128. 55	132. 63
20190508	293. 83	610. 21	119. 27	287. 83	126. 34	131. 38	135. 29
20190423	289. 75	610. 75	120. 30	292. 56	127. 66	127. 54	136. 39
20190322	288. 95	612. 53	123. 35	292. 34	125. 46	128. 83	132. 88

此时基线更稳定，色谱峰更多。

方法学考察结果显示，所建立的祛风止痛胶囊 HPLC 指纹图谱可行性高，可靠性强，并且 10 批样品相似度均在 0. 986 以上，表明不同批次之间具有良好的一致性，可作为该制剂实用的定性鉴定工具，并可用于评价其制备工艺的标准性、均一性、稳定性。

含量测定结果显示，祛风止痛胶囊中马钱苷酸含量最高，其次为柯里拉京、没食子酸、蛇床子素、鞣花酸，马钱苷，而紫丁香苷较低。目前，该制剂相关研究大多是在同一色谱条件下测定单一成分含量^[14-18]，而本实验可同时测定上述 7 种成分含量，有助于全面控制其质量，并能节约成本。

参考文献：

[1] 李 倩, 买吾拉江·阿不都热衣木, 徐 芳, 等. 老鹳草素药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(8): 125-128.

[2] 关 玥, 孙长波, 李慧萍, 等. 榭寄生的化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(5): 102-105.

[3] 代 琪, 叶 臻, 叶俏波, 等. 续断来源考证、化学成分及药理作用综述[J]. 中国药物评价, 2020, 37(6): 432-436.

[4] 徐坤元, 荀筱雯, 刘文科. 威灵仙的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(5): 875-877.

[5] 李馨蕊, 刘 娟, 彭 成, 等. 红花化学成分及药理活性研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2021, 44(1): 102-112.

[6] 李景扬. 祛风止痛胶囊治疗类风湿性关节炎临床疗效分析

[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(8): 36.

[7] 张 薇, 李 涛, 李 萍, 等. 祛风止痛胶囊对关节炎模型大鼠抗炎作用及机制的实验研究[J]. 中国骨伤, 2009, 22(11): 848-851.

[8] 郭荣杰. 祛风止痛胶囊治疗偏头痛的临床研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(11): 157.

[9] Li N X, Zhang J J, Zhang Y, *et al.* Chromatographic fingerprints analysis and determination of seven components in Danmu preparations by HPLC-DAD/QTOF-MS[J]. *Chin Med*, 2020, 15(1): 19.

[10] Wu X D, Liu Q Y, Chen D, *et al.* Identification of quality control markers in Suhuang antitussive capsule based on HPLC-PDA fingerprint and anti-inflammatory screening[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 180: 113053.

[11] 周菲菲, 王彬杰, 张元媛, 等. 冠心舒通胶囊 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2016, 47(7): 1137-1141.

[12] 沈 晗, 黄玉宇, 沈夕坤, 等. 五味消毒饮 HPLC 指纹图谱建立及 10 种成分同时测定[J]. 中成药, 2021, 43(1): 22-28.

[13] 马瑞丽, 李锦田, 马桂芝. 扎冲十三味丸 HPLC 指纹图谱建立及 4 种成分测定[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1432-1436.

[14] 鲁 军, 李井涛. HPLC-DAD 法测定祛风止痛胶囊中没食子酸的含量[J]. 中国药品标准, 2015, 16(1): 13-16.

[15] 李大庆, 王曼宁, 梁晓莉, 等. 祛风止痛胶囊中川续断皂苷Ⅵ的含量测定[J]. 医药导报, 2012, 31(6): 791-792.

[16] 吴 锋, 豆久锋, 陈忠良. HPLC 法测定祛风止痛胶囊中鞣基红花黄色素 A[J]. 中草药, 2010, 41(11): 1817-1818.

[17] 周 和, 谭翔匀, 冯 华, 等. 通络止痛胶囊中 4 种成分测定及 HPLC 指纹图谱建立[J]. 中成药, 2020, 42(8): 1996-2002.

[18] 杨晓腾, 滕统华. 祛风止痛胶囊质量标准研究[J]. 中国药品标准, 2016, 17(1): 24-27.