

蒙药成方制剂健脾五味丸(布特格勒其-5)中 胡黄连苷 I、II 的含量测定

于海云, 王丽君, 白春杰, 关金凤, 杨晓磊, 闫凤杰, 韩清
(通辽市市场检验检测中心, 通辽 028000)

摘要 目的: 建立蒙成药健脾五味丸中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 含量测定方法。**方法:** 采用高效液相色谱法, 选用 Agilent 5 HC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(33:67)为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量为 10 μL, 检测波长为 275 nm。结果: 胡黄连苷 I 在 2.188 ~ 87.52 μg · mL⁻¹、胡黄连苷 II 在 12.18 ~ 121.82 μg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好, 回归方程为: $Y = 23\,275.9X + 19\,398$ ($r = 0.999\,3$)、 $Y = 9\,958.7X - 22\,358$ ($r = 0.999\,6$), 胡黄连苷 I 加样回收率为 101.9%, RSD 为 1.2%, 胡黄连苷 II 加样回收率为 102.7%, RSD 为 0.65%。比较 2 个厂家不同批次的蒙成药健脾五味丸, 根据测定结果可知, 库伦蒙药厂的胡黄连苷 I、胡黄连 II 平均含量为 3.21、7.83, 内蒙古蒙药股份有限公司的胡黄连 I、胡黄连 II 平均含量为 14.55、11.11。**结论:** 该法简便易行, 准确度和精密度优异, 适用于蒙药成方制剂健脾五味丸中胡黄连的含量测定, 填补了蒙成药健脾五味丸胡黄连含量测定的空白。

关键词: 高效液相色谱法; 蒙成药; 健脾五味丸; 胡黄连苷 I; 胡黄连苷 II

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2023)03-0000-00

doi:10.19778/j.chp.2023.04.00?

Content determination of picroside- I and picroside- II in mongolian medicine formulation Jianpi Wuwei pills (Buglech-5)

YU Haiyun, WANG Lijun, GUAN Jinfeng, BAI Chunjie, YANG Xiaolei, YAN Fengjie
(Tongliao Market Inspection and Testing Center, Tongliao 028000, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of picroside- I and picroside- II in Mongolian medicine Jianpi Wuwei pills. **Methods:** HPLC was performed with Agilent 5 HC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution (33:67) was the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 30 °C, the injection quantity was 10 μL, the detection wavelength was 275 nm. **Results:** The results showed that the linear relationship between picroside- I and picroside- II was good in the range of 2.188 μg · mL⁻¹ to 87.52 μg · mL⁻¹ and 12.18 μg · mL⁻¹ to 121.82 μg · mL⁻¹. The regression equation was $Y = 23\,275.9X + 19\,398$ ($r = 0.999\,3$), $Y = 9\,958.7X - 22\,358$ ($r = 0.999\,6$). The recovery of picroside- I was 101.9%, RSD was 1.2%, and the recovery of picroside- II was 102.7%. RSD was 0.65%. It was compared the content of picroside-I and picroside-II in different batches of Jianpi Wuwei pills which were produced by Kulun Mongolian Medicine Factory and Inner Mongolia Mongolian Medicine Company Limited. According to the test results, the average contents of picroside-I and picroside-II which is produced by Kulun Mongolian Medicine Factory were 3.21 and 7.83, while the average contents of picroside-I and picroside-II which is produced by Inner Mongolia

第一作者简介: 于海云, 理化检验副主任技师; 研究方向: 食品与药品理化检验及质量控制。Tel: 0475-6388735; E-mail: yhy1984811@163.com

Mongolian Medicine Company Limited were 14.55 and 11.11. **Conclusion:** The method is specific and accurate, which is suitable for the determination of picroside in Jianpi Wuwei pills of Mongolian medicine preparation, and fills the blank of determination of picroside in Jianpi Wuwei pills of Mongolian medicine preparation.

Key words: hgh performance liquid chromatography; Mongolian medicine; Jianpi Wuwei Wan; picroside- I ; picroside- II

蒙药成方制剂健脾五味丸收录于《中华人民共和国卫生部药品标准》1998年版蒙药分册^[1],方剂由诃子、五灵脂、寒水石(煨)、土木香、胡黄连组成,为蒙医常用健脾类药物,有健脾和胃,理气镇痛之功效,用于急慢性或萎缩性胃炎引起的上腹痛患者,“赫依协日”,“宝日”溃疡性、“巴达干”病引起的胃脘胀痛、上腹疼痛之证^[2]。

现行的质量标准仅仅收录了性状、检查及鉴别项,没有药物成分的含量测定项,直接影响到蒙成药的质量,关系着蒙药成方制剂的安全与有效,不能很好评价蒙成药的药品质量,标准的提升亟待解决;而文献[3-5]仅测定了胡黄连苷 I、II 的含量,没有对限度进行分析与讨论。

本试验在参考相关文献[3-8]的基础上,建立高效液相色谱法测定健脾五味丸中胡黄连苷 I、胡黄连苷 II 的含量测定方法,方法简便易行,准确度和精密度优异,可以用于胡黄连苷 I、胡黄连苷 II 含量的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 SPD-20A 二极管阵列检测器, JT-613HT 型超声波清洗器(深圳市洁拓电子科技有限公司); Mettler AE-100 型电子天平(万分之一,梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药

胡黄连苷 I 对照品(批号 111727-201702,含量 95.6%,中国食品药品检定研究院);胡黄连苷 II 对照品(批号 111596-201805,含量 93.2%,中国食品药品检定研究院);健脾五味丸(批号 201008、203004、202020,规格:2 g/10 粒,内蒙古库伦蒙药有限公司);健脾五味丸(批号 2009027、211004、210112,规格:2 g/10 粒,内蒙古蒙药股份有限公司);甲醇(色谱纯);磷酸(优级纯);纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取健脾五味丸,置研钵中,研

细,取约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声(功率 250 W,频率 33 kHz)处理 40 min,放冷,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,离心,取续滤液,过微孔滤膜(0.45 μm),作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液 取胡黄连苷 I 对照品 11.44 mg、胡黄连苷 II 对照品 13.06 mg,分别置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,制成胡黄连苷 I、胡黄连苷 II 储备溶液,精密量取胡黄连苷 I 储备溶液 2 mL、胡黄连苷 II 储备溶液 4 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 质量浓度分别为 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例,取除胡黄连外的四味药材,按成方制剂比例制成阴性对照溶液,照“2.1”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2 色谱条件和系统适用性

色谱柱:Agilent 5 HC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1%磷酸水溶液(33:67);流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL ;检测波长 275 nm。理论板数按胡黄连 II 峰计算为 10 166,不低于 3 000。

2.3 专属性试验

分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图,供试品溶液保留时间与对照品溶液保留时间一致,且阴性对照中未见有胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II,表明阴性无干扰,见图 1。供试品溶液中胡黄连苷 II 与后侧杂质峰可以实现基线分离,分离度为 2.219,符合《中华人民共和国药典》2020 年版通则要求。

2.4 线性关系考察

精密量取胡黄连苷 I 对照品储备溶液 0.1、0.25、1.5、2.5、4.0 mL 和胡黄连苷 II 对照品储备溶液 0.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置 5 个 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 中约含胡黄连苷 I 2 ~ 80 μg 、胡黄连苷 II 10 ~ 120 μg 的混合标准系列浓度溶液,按“2.2”项下色谱条件测定峰面积,绘制标准曲线,得胡黄连苷 I、胡黄连苷 II

的回归方程:

$$Y = 23\,275.9X + 19\,398 \quad r = 0.999\,3$$

$$Y = 9\,958.7X - 22\,358 \quad r = 0.999\,6$$

结果表明,胡黄连苷 I 在 2.188 ~ 87.52 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、胡黄连苷 II 在 12.18 ~ 121.82 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈现良好的线性关系。

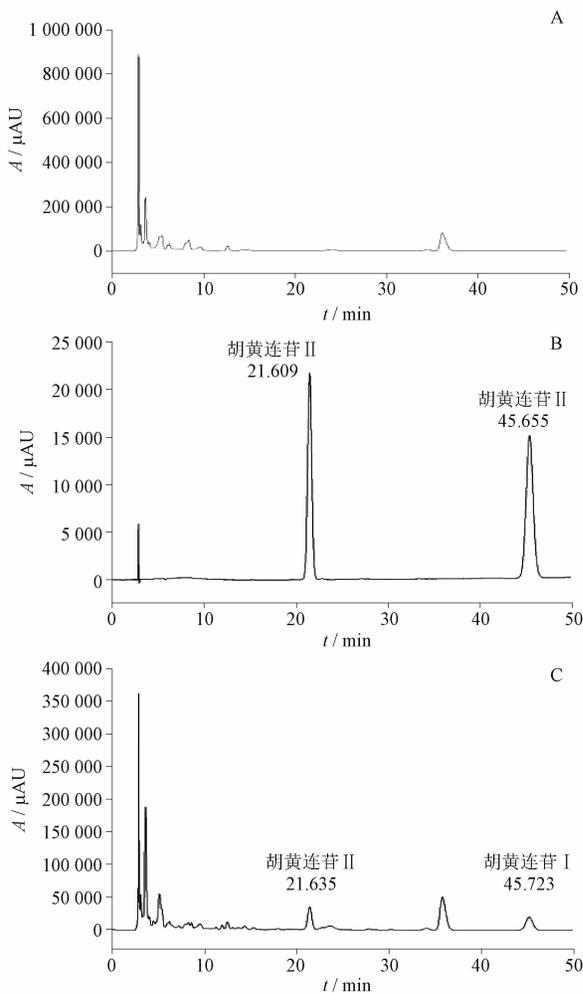


图1 阴性对照溶液(A)对照品溶液(B)供试品溶液(C)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of negative control solution (A) reference substance solution (B) and sample solution (C)

2.5 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件,精密量取 10 μL ,连续进样 6 次,胡黄连苷 I 峰,平均峰面积为 1060313, RSD 为 0.21% ($n=6$),胡黄连苷 II 峰,平均峰面积为 956118, RSD 为 0.22% ($n=6$),说明方法的精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一份供试品溶液(批号 201008)6 份,按

“2.2”项下色谱条件测定含量,结果显示,6 份样品中胡黄连苷 I 平均含量为 3.283 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.3%;胡黄连苷 II 的平均含量为 7.657 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.94%,说明本方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 201008),分别于配制后 0、6、12、18、24 h 测定峰面积,胡黄连苷 I 峰面积的平均值为 620752, RSD 为 0.56%,胡黄连苷 II 峰面积的平均值为 596326, RSD 为 0.67%,可知供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收试验

取已知含量供试品 9 份,(批号 201008,测得胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 含量分别为 3.283 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 7.657 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),每份约 0.1 g,分别加入已知量的胡黄连苷 I 对照品储备溶液 0.8、1.6、2.4 mL 和胡黄连苷 II 对照品储备溶液 1.5、3.0、4.5 mL,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,定容体积为 12.5 mL,按“2.2”项下条件进样并记录色谱图。计算回收率,结果见表 1。

2.8 提取方法与时间考察

选择不同厂家供试品两批次(批号 211004、201008),采用超声提取与回流提取 30、40、50 min,按“2.2”项下色谱条件测定含量,进行考察,结果显示回流提取方法与超声提取方法差别不大,可以选择较为简便的超声处理方法,从回流时间上看,40 min 为宜。

2.9 耐用性试验

分别选用不同厂家仪器设备、不同品牌色谱柱,选取供试品(批号 202020),按“2.2”项下色谱条件测定含量,进行耐用性试验,见表 3,结果表明,该方法的耐用性良好。

2.10 含量测定

选取 2 个厂家,每个厂家 3 个批次供试品各约 0.2 g,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下条件进样记录色谱图。计算胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 的含量。结果见表 4、表 5。

3 讨论

3.1 含量结果分析

从含量测定的结果可以看出,不同厂家不同批次的健脾五味丸中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 的含量存在一定的差异,《中国药典》2020 年版一部中规定胡黄连药材中含胡黄连苷 I 与胡黄连苷 II 的总量不得少于 9.0% (表 6)。

表 1 回收率试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery

成分 (composition)	取样量 (sample amount)/g	加入量 (added)/mg	测定量 (determined)/(mg · g ⁻¹)	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%
胡黄连苷 I (picroside- I)	0. 108 3	0. 174 9	4. 668	101. 37	101. 9 ± 1. 2
	0. 107 6	0. 174 9	4. 689	100. 81	
	0. 106 7	0. 174 9	4. 753	102. 26	
	0. 108 8	0. 349 9	6. 368	104. 18	
	0. 105 5	0. 349 9	6. 522	102. 84	
	0. 106 3	0. 349 9	6. 477	102. 97	
	0. 103 8	0. 524 9	8. 292	101. 43	
	0. 104 4	0. 524 9	8. 237	101. 30	
	0. 103 5	0. 524 9	8. 248	100. 10	
胡黄连苷 II (picroside- II)	0. 108 3	0. 365 1	10. 546	103. 10	102. 7 ± 0. 65
	0. 107 6	0. 365 1	10. 623	103. 33	
	0. 106 7	0. 365 1	10. 706	103. 15	
	0. 108 8	0. 730 3	13. 922	102. 56	
	0. 105 5	0. 730 3	14. 353	102. 49	
	0. 106 3	0. 730 3	14. 268	102. 82	
	0. 103 8	1. 095 4	18. 291	103. 42	
	0. 104 4	1. 095 4	17. 968	101. 34	
	0. 103 5	1. 095 4	18. 222	102. 26	

表 2 不同处理方法与时间考察

Tab. 2 Different treatment methods and time investigation

批号 (lot No.)		30 min		40 min		50 min	
		超声	回流	超声	回流	超声	回流
		(ultrasonic extraction) (flow inversely)		(ultrasonic extraction) (flow inversely)		(ultrasonic extraction) (flow inversely)	
211004	胡黄连苷 I	13. 38	13. 09	14. 65	14. 79	14. 54	14. 33
	II	10. 33	10. 76	11. 34	11. 02	11. 44	11. 09
201008	I	3. 11	3. 04	3. 28	3. 10	3. 31	3. 08
	II	6. 96	6. 88	7. 18	7. 64	7. 23	7. 35

表 3 耐用性试验

Tab. 3 Durability test

色谱柱 (columns)	仪器 (instruments)	胡黄连苷 I (picroside- I)/(mg · g ⁻¹)	RSD/ %	胡黄连苷 II (picroside- II)/(mg · g ⁻¹)	RSD/ %
Wondasil C ₁₈ -WR 4. 6 mm × 250 mm	UltiMate® 3000	3. 36	0. 17	7. 82	0. 38
Symmetry C ₁₈ 4. 6 mm × 250 mm	Waters e2695	3. 19	0. 45	7. 44	0. 57

比较发现,不同厂家胡黄连苷 I、II 总量有差异,考虑差异原因应来自两方面,一是原料来源可能不同,直接影响含量的高低;二是生产工艺差异的影响,在样品制备过程中发现,库伦蒙药有限公司生产的水丸更加细小紧实,内蒙古蒙药股份有限公司生产的水丸相对大一些、松散一些,更易研细,溶解性

也相对好一些。蒙药股份有限公司生产的批次为 211004 胡黄连 II 含量略有差别,考虑应为提取过程中出现随机误差引起。

实验室^[5]认为转移率在 65% 以上为可接受范围,据此计算蒙成药中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 总量 = (30 ÷ 150 × 9%) × 65% = 11. 7 mg ·

g^{-1} ,但考虑到厂家使用的原药材不同、生产工艺差别、提取方法的不同,故暂定蒙成药健脾五味

丸中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 的总量应不少于 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 4 样品中胡黄连苷 I 含量测定结果

Tab. 4 Determination of Picroside- I in samples

厂家 (manufacturer)	批号 (lot No.)	称样量 (sample amount)/g	峰面积 (peak area)	胡黄连苷 I 含量 (content)/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	平均含量 (average)/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD /%
内蒙古库伦蒙药有限公司 (Kulun Mongolian Medicine Factory)	201008	0.200 5	618582	3.271	3.29	0.02
		0.200 4	623366	3.298		
		0.200 1	622617	3.299		
	203004	0.201 3	597525	3.084	3.09	0.02
		0.200 9	592852	3.065		
		0.200 7	600170	3.108		
	202020	0.200 8	619492	3.271	3.27	0.02
		0.200 3	621441	3.290		
		0.201 5	619011	3.257		
内蒙古蒙药股份有限公司 (Inner Mongolia Mongolian Medicine Company Limited)	2009027	0.200 5	2724988	14.495	14.48	0.01
		0.200 6	2724290	14.483		
		0.200 8	2725221	14.474		
	211004	0.200 4	2766205	14.636	14.62	0.01
		0.200 6	2765734	14.619		
		0.201 2	2771743	14.607		
	210115	0.200 3	2766329	14.644	14.56	0.09
		0.201 1	2744987	14.557		
		0.201 4	2732998	14.472		

表 5 样品中胡黄连苷 II 含量测定结果

Tab. 5 Determination of Picroside- II in samples

厂家 (manufact-urer)	生产批号 (production lot number)	称样量 (sample amount)/g	峰面积 (peak area)	含量 (content)/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	平均含量 (average)/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD /%
内蒙古库伦蒙药有限公司 (Kulun Mongolian Medicine Factory)	201008	0.200 5	644622	8.275	8.23	0.09
		0.200 4	633094	8.131		
		0.200 1	639048	8.298		
	203004	0.201 3	592852	7.580	7.64	0.06
		0.200 9	600170	7.689		
		0.200 7	597525	7.663		
	202020	0.200 8	596810	7.650	7.63	0.02
		0.200 3	594060	7.633		
		0.201 5	596540	7.620		
内蒙古蒙药股份有限公司 (Inner Mongolia Mongolian Medicine Company Limited)	2009027	0.200 5	872048	11.196	11.27	0.22
		0.200 6	864485	11.092		
		0.200 8	898755	11.520		
	211004	0.200 4	859908	11.044	11.01	0.03
		0.200 6	855908	10.982		
		0.201 2	859676	10.997		
	210115	0.200 3	854942	10.986	11.06	0.07
		0.201 1	867358	11.107		
		0.201 4	867337	11.090		

表6 不同厂家胡黄连苷含量测定结果比较

Tab.6 Comparison of picroside content of different manufacturers

生产厂家 (manufacturer)	含量(content)/(mg·g ⁻¹)		总含量 (total content)/ (mg·g ⁻¹)	平均总含量 (average total content)/ (mg·g ⁻¹)
	胡黄连苷I (picroside I)	胡黄连苷II (picroside II)		
内蒙古库伦蒙药有限公司 (Kulun Mongolian Medicine Factory)	3.29	8.23	11.52	11.05
	3.09	7.64	10.73	
	3.27	7.63	10.90	
内蒙古蒙药股份有限公司 (Inner Mongolia Mongolian Medicine Company Limited)	14.48	11.27	25.75	25.66
	14.62	11.01	25.63	
	14.56	11.06	25.62	

3.2 提取方法与时间的选择

采用超声提取和回流提取方法进行比较,结果发现超声提取质量会有少量的损失,损失量均在0.3g以下,回流提取会使供试品质量增加,增加的水分可能会引起样液浓度减小而使测定结果偏小。考察提取时间因素的影响发现提取40min为最佳,所以选择超声处理40min作为提取方法。

3.3 结论

通过专属性试验、线性关系考察、精密度试验、重复性试验、稳定性考察、耐用性考察与加样回收考察等试验,显示该方法能够适用于蒙成药健脾五味丸中胡黄连苷I和胡黄连苷II的含量测定,检测方法简单,为蒙药成方制剂健脾五味丸胡黄连的含量测定填补了空白,可以作为药品质量控制的检验依据。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准·蒙药分册[S]. 1998:149
Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health. PR China. Mongolian Medicine Volume[S]. 1998:149
- [2] 杨夏,赵桂柱,孙丽君. 高效液相法测定蒙成药健脾五味丸中没食子酸的含量[J]. 临床医药文献电子杂志,2019,6(17):18
YANG X, ZHAOGZ, SUN LJ. Determination of Gallic Acid in Jianpi Wuwei Pills by HPLC[J]. Electr J Clin Med Liter, 2019, 6(17):18
- [3] 尚立霞,刘玲玲,王菲,等. 高效液相色谱测定清肝颗粒中胡

黄连苷I和胡黄连苷II含量的研究[J]. 食品与药品,2017,19(3):194

SHANG LX, LIU LL, WANG F, *et al.* Determination of picroside I and picroside II in Qinggan granules by HPLC [J]. Food Drug, 2017, 19(3):193

- [4] 石欣,鲍劲松,白雅静. RP-HPLC法测定清热八味胶囊中胡黄连苷I的含量[J]. 中国民族医药杂志,2011,17(3):52

SHI X, BAO JS, BAI JY. Determination of picroside I in Qingre Baiwei capsules by RP-HPLC [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2011, 17(3):52

- [5] 陈惠英,宋粉云. 高效液相色谱法测定万应胶囊中胡黄连苷I和胡黄连苷II的含量[J]. 中国药房,2006,17(13):1011

CHEN HY, SONG FY. Content Determination of picroside I and picroside II in Wanying capsule by HPLC [J]. China Pharm, 2006, 17(13):1011

- [6] 中华人民共和国药典:2020年版.一部[S]2020:1712,56,253

ChP 2020. Vol I [S]. 2020:1712, 56, 253

- [7] 赵丽娜. 蒙成药小儿清肺八味丸质量控制方法研究[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学华中农业大学,2020

ZHAO LN. Quality Control of Mongolia Medicine Xiaoe Qingfei Bawei Pills [D]. Hunhot: Inner Mongolia Medical University, 2020

- [8] 郝美玲,赵丽娜,籍学伟,等. HPLC法测定蒙成药小儿清肺八味丸中羟基红花黄色素A的含量[J]. 中国药品标准,2020,21(1):76

HAO ML, ZHAO LN, JI XW, *et al.* Determination of hydroxysafflor yellow A in Xiaoe Qingfei Bawei Pills by HPLC [J]. Drug Stand China, 2020, 21(1):76

(收稿日期:2023-01-06)