

# 筋骨痛消丸HPLC指纹图谱的建立及其中7个成分的含量测定<sup>Δ</sup>

孙 实<sup>1,2\*</sup>, 王一方<sup>1</sup>, 赵新杰<sup>1,2</sup>, 王 昭<sup>1</sup>, 张 丽<sup>1</sup>, 王丹丹<sup>1</sup>, 武爱玲<sup>1,2</sup>, 吴晓龙<sup>1#</sup>[1.河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)药学部,河南 洛阳 471003;2.河南省洛正药业有限责任公司研发部,河南 洛阳 471013]

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)10-1235-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.10.13

**摘要** 目的:建立筋骨痛消丸的指纹图谱,并测定其中7个成分的含量。方法:采用高效液相色谱法(HPLC),以Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II为色谱柱,以乙腈-0.02%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为1.0 mL/min,检测波长为230 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立10批筋骨痛消丸的HPLC指纹图谱并进行相似度评价,通过与混合对照品比对指认共有峰;采用同一HPLC法测定所指认共有峰对应成分的含量。结果:10批筋骨痛消丸样品中共确定共有峰20个,与对照指纹图谱的相似度均不低于0.980。通过与混合对照品比对,指认化学成分7个,分别为马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>。上述7个成分检测质量浓度的线性范围分别为4.509~45.090、15.090~150.900、14.985~149.850、14.982~149.820、2.967~29.670、1.944~19.440、3.094~30.940 μg/mL(*r*均大于0.999),检测限分别为0.060 1、0.161 0、0.399 6、0.159 8、0.031 6、0.051 8、0.082 5 μg/mL,定量限分别为0.200 4、0.503 0、0.999 0、0.399 5、0.079 1、0.259 2、0.412 6 μg/mL;精密密度、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于3.0%(*n*=6);平均加样回收率为98.81%~100.28%,RSD为0.20%~1.21%(*n*=6)。10批样品中上述成分的含量分别为0.441 0~0.969 4、3.283 4~4.733 4、1.947 7~3.674 9、1.336 6~2.270 9、0.293 2~0.372 1、0.190 2~0.293 9、0.352 8~0.518 8 mg/g。结论:本研究成功建立了筋骨痛消丸的HPLC指纹图谱和含量测定方法,可用于其质量控制。

**关键词** 筋骨痛消丸;指纹图谱;含量测定;高效液相色谱法

## Establishment of HPLC Fingerprints and Content Determination of 7 Components of Jingu Tongxiao Pill

SUN Shi<sup>1,2</sup>, WANG Yifang<sup>1</sup>, ZHAO Xinjie<sup>1,2</sup>, WANG Zhao<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, WANG Dandan<sup>1</sup>, WU Ailing<sup>1,2</sup>, WU Xiaolong<sup>1</sup>[1. Dept. of Pharmacy, Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province (Orthopedic Hospital of Henan Province), Henan Luoyang 471003, China; 2. Research and Development Department, Henan Luozheng Pharmaceutical Co., Ltd., Henan Luoyang 471013, China]

- 探讨[J].中国化工贸易,2014,6(25):145-147.
- [8] 陈颖,唐俊. PIVAS药品配置后的稳定性及滴注时间[J]. 海峡药学,2018,30(1):285-289.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:84-85、122-129、480-483.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:1516、1520.
- [11] 何伍,凌霄.含葡萄糖注射液中5-羟甲基糠醛限度的检测方法[J].中国医药工业杂志,2008,39(1):47-49.
- [12] 彭姝,张军,李慧芬,等.输液中不溶性微粒的危害综述[J].中国药事,2018,32(8):1058-1063.
- [13] European Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia[S]. 9.0 edition. Strasbourg: European Directorate for Quality Medicines, 2017:335-337.
- [14] British Pharmacopoeia Commission. British pharmacopoeia [S]. 2015 edition. London: Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2015: V701- V705.
- [15] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan. The Japanese pharmacopoeia[S]. 17th edition. Tokyo: the Ministry of Health, Labor and Welfare, 2016:137-139.
- [16] 国家食品药品监督管理总局.塑料输液容器用聚丙烯组合盖(拉环式):YBB 00242004-2015[S]. 2015-12-01.
- [17] 国家食品药品监督管理总局.多层共挤输液用膜、袋通则:YBB 00342002-2015[S]. 2015-12-01.
- [18] 国家食品药品监督管理总局.聚丙烯输液瓶:YBB 00022002-2015[S]. 2015-12-01.

Δ 基金项目:河南省科技攻关项目(No.202102310193);河南省中医药科学研究专项课题(No.2017ZY1001, No.20-21ZY2241)

\* 主管药师,硕士。研究方向:中药质量控制与活性评价。电话:0379-63785541。E-mail:sunshi0812@163.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:中药质量控制与制剂开发。电话:0379-63785541。E-mail:HLOH\_WXL@163.com

(收稿日期:2020-12-09 修回日期:2021-03-02)

(编辑:陈宏)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the fingerprint of Jingu tongxiao pill, and to determine the contents of 7 components. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS- II column with acetonitrile-0.02% phosphoric acid solution as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 230 nm and the column temperature was set at 25 °C. The sample size was 10 μL. HPLC fingerprint of 10 batches of Jingu tongxiao pill was established by using *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition), and common peak was identified by comparing with the mixed reference substance. The contents of corresponding components of the identified common peak were determined by the same HPLC method. RESULTS: There were 20 common peaks in HPLC fingerprint of 10 batches of samples, and the similarity with the control fingerprint was not less than 0.980. By comparing with the mixed reference substance, 7 components were identified, which were loganic acid, gentiopicroside, paeoniflorin, salvanolic acid B, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II<sub>A</sub>. The linear range of the above 7 components were 4.509-45.090, 15.090-150.900, 14.985-149.850, 14.982-149.820, 2.967-29.670, 1.944-19.440, 3.094-30.940 μg/mL (all  $r > 0.999$ ), respectively. The limits of detection were 0.060 1, 0.161 0, 0.399 6, 0.159 8, 0.031 6, 0.051 8, 0.082 5 μg/mL, respectively. The limits of quantitation were 0.200 4, 0.503 0, 0.999 0, 0.399 5, 0.079 1, 0.259 2, 0.412 6 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all lower than 3.0% ( $n=6$ ). Average recoveries were 98.81% -100.28%, RSDs were 0.20% -1.21% ( $n=6$ ). In 10 batches of samples, the contents of the above 7 components were 0.441 0-0.969 4, 3.283 4-4.733 4, 1.947 7-3.674 9, 1.336 6-2.270 9, 0.293 2-0.372 1, 0.190 2-0.293 9 and 0.352 8-0.518 8 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: In this study, HPLC fingerprint and content determination method of Jingu tongxiao pill are successfully established and can be used for quality control.

**KEYWORDS** Jingu tongxiao pill; Fingerprint; Content determination; HPLC

筋骨痛消丸是以国家级非物质文化遗产“平乐郭氏正骨法”经验方为基础开发的中药新药,为国家中药保护品种,由11味中药组成。方中丹参、鸡血藤活血化瘀、舒筋止痛,为君药;香附、乌药行气止痛、温经散寒,为臣药;桂枝、威灵仙、秦艽温经通络、祛风除湿、消肿止痛,白芍、地黄养血敛阴、补虚止痛,川牛膝活血化瘀、通利关节,三味药材共为佐药;甘草缓急止痛、调和诸药,为使药。全方共奏活血行气、温经通络、消肿止痛之功,临床上主要用于血瘀寒凝以及骨质增生引起的膝关节疼痛、肿胀、活动受限等症,疗效显著<sup>[1-3]</sup>。此外,有临床报道,筋骨痛消丸单用或与其他药物联用对肩关节周围炎、髌骨软化症、类风湿性关节炎、腰椎间盘突出症、膝关节骨坏死等疾病均有明显的改善作用<sup>[4-8]</sup>。

目前,国家药品标准中筋骨痛消丸仅以丹参酮 II<sub>A</sub> 作为“含量测定”项下的考察指标<sup>[9]</sup>。这种以方中药材所含单一有效成分作为定量指标的方法难以全面控制其内在质量,更无法体现“多成分、多靶点”理论下的中药整体质量,故有必要探索一种更加全面、相对更能反映中药整体内涵的质量控制方法。中药色谱指纹图谱能够提供丰富的鉴别信息,其兼顾“整体性”和“模糊性”的特点,非常适合中药复杂体系的质量控制,是一种国际公认的控制中药或天然药材质量的方法<sup>[10-12]</sup>。基于此,本研究建立了筋骨痛消丸的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,通过与对照品比对指认共有峰,测定所指认共有峰对应成分的含量,以期建立科学、合理的筋骨痛消丸质量控制方法提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Nexera XR 型 HPLC 仪及

配套的 LC-20ADXR 型二元高压泵、FCV-11AL 型快速流路切换器、DGU-20A5R 型脱气单元、SIL-20AXR 型自动进样器、CTO-20AC 型柱温箱、SPD-M20A 型二极管阵列检测器、Labsolution DB (Ver. 6.70) 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司),KH-600DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司),MS204S 型万分之一电子分析天平、AB135-S 十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

筋骨痛消丸(批号 201127、201128、201129、201130、201131、201132、201133、201135、201201、201203,编号 S1~S10,规格每袋装 6 g)购自河南省洛正药业有限责任公司;马钱苷酸对照品(批号 111865-201704,纯度 ≥ 98%)、龙胆苦苷对照品(批号 110770-201918,纯度 ≥ 98%)、丹酚酸 B 对照品(批号 111562-201716,纯度 ≥ 98%)、丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品(批号 110766-202022,纯度 ≥ 98%)均购自中国食品药品检定研究院;芍药苷对照品(批号 MUST-18032901,纯度 ≥ 98%)、隐丹参酮对照品(批号 MUST-18041115,纯度 ≥ 98%)、丹参酮 I 对照品(批号 MUST-18032207,纯度 ≥ 98%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)均购自美国 TEDIA 公司;磷酸(色谱纯)、甲酸(色谱纯)均购自天津科密欧化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 以 Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS- II (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱,以乙腈(A)-0.02% 磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min, 5% A → 12% A;

15~35 min, 12% A→15% A; 35~75 min, 15% A→32% A; 75~90 min, 32% A→60% A; 90~130 min, 60% A→70% A); 检测波长为 230 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μL。

**2.1.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品各适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 0.300 6、0.503 0、0.499 5、0.499 4、0.197 8、0.216 0、0.206 3 mg/mL 的单一对照品贮备液。吸取上述单一对照品贮备液适量, 用甲醇配制成马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub> 质量浓度分别为 45.090、150.900、149.850、149.820、29.670、19.440、30.940 μg/mL 的混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取筋骨痛消丸样品, 研磨至细粉, 过六号筛(下同)。精密称取细粉 0.4 g, 置于 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 30 mL, 密塞, 称定质量, 超声(频率 45 kHz, 功率 600 W)提取 45 min, 放至室温; 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.1.4 精密度试验** 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号 S1) 适量, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次。以丹酚酸B为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 20 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.42% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 0.19%~2.91% (n=6), 表明本方法精密度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号 S1) 适量, 分别于室温下放置 0、3、6、9、12、24 h 时按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定。以丹酚酸B为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 20 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.04%~0.16% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 0.25%~2.93% (n=6), 表明供试品溶液于室温下放置 24 h 内稳定性良好。

**2.1.6 重复性试验** 取筋骨痛消丸样品(编号 S1) 约 0.4 g, 共 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以丹酚酸B为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 20 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.09%~0.73% (n=6), 相对峰面积的 RSD 为 0.66%~2.85% (n=6), 表明本方法重复性良好。

**2.1.7 HPLC 指纹图谱的建立** 取 10 批筋骨痛消丸样品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》, 选取 S1 样品色谱图作为参照, 将时间窗设置为 0.2 min, 经多点校正(3点)后自动匹配, 生成 HPLC 叠加指纹图谱, 采用中位数法生成 HPLC 对照指纹图谱(R) 详见图 1、图 2。

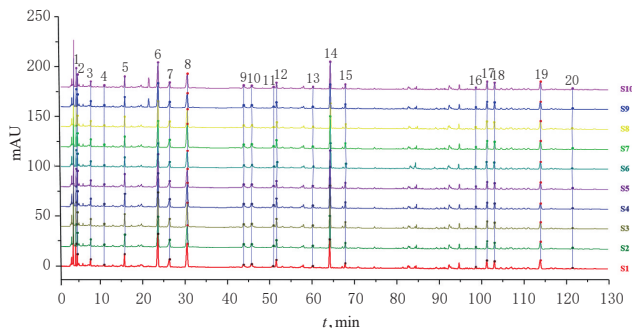


图 1 10 批筋骨痛消丸的 HPLC 叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprint of 10 batches of Jingu tongxiao pill

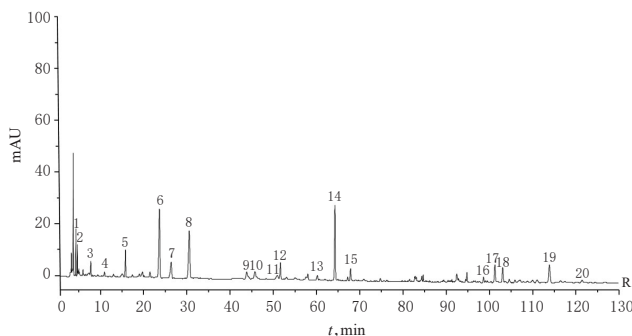


图 2 筋骨痛消丸的 HPLC 对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprint of Jingu tongxiao pill

**2.1.8 相似度评价** 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对 10 批筋骨痛消丸样品进行相似度分析。结果, 10 批样品图谱与对照指纹图谱间的相似度均不低于 0.980, 提示不同批次样品的相似度较高, 生产工艺相对稳定, 详见表 1。

表 1 10 批筋骨痛消丸的相似度评价结果

Tab 1 Similarity evaluation results of 10 batches of Jingu tongxiao pill

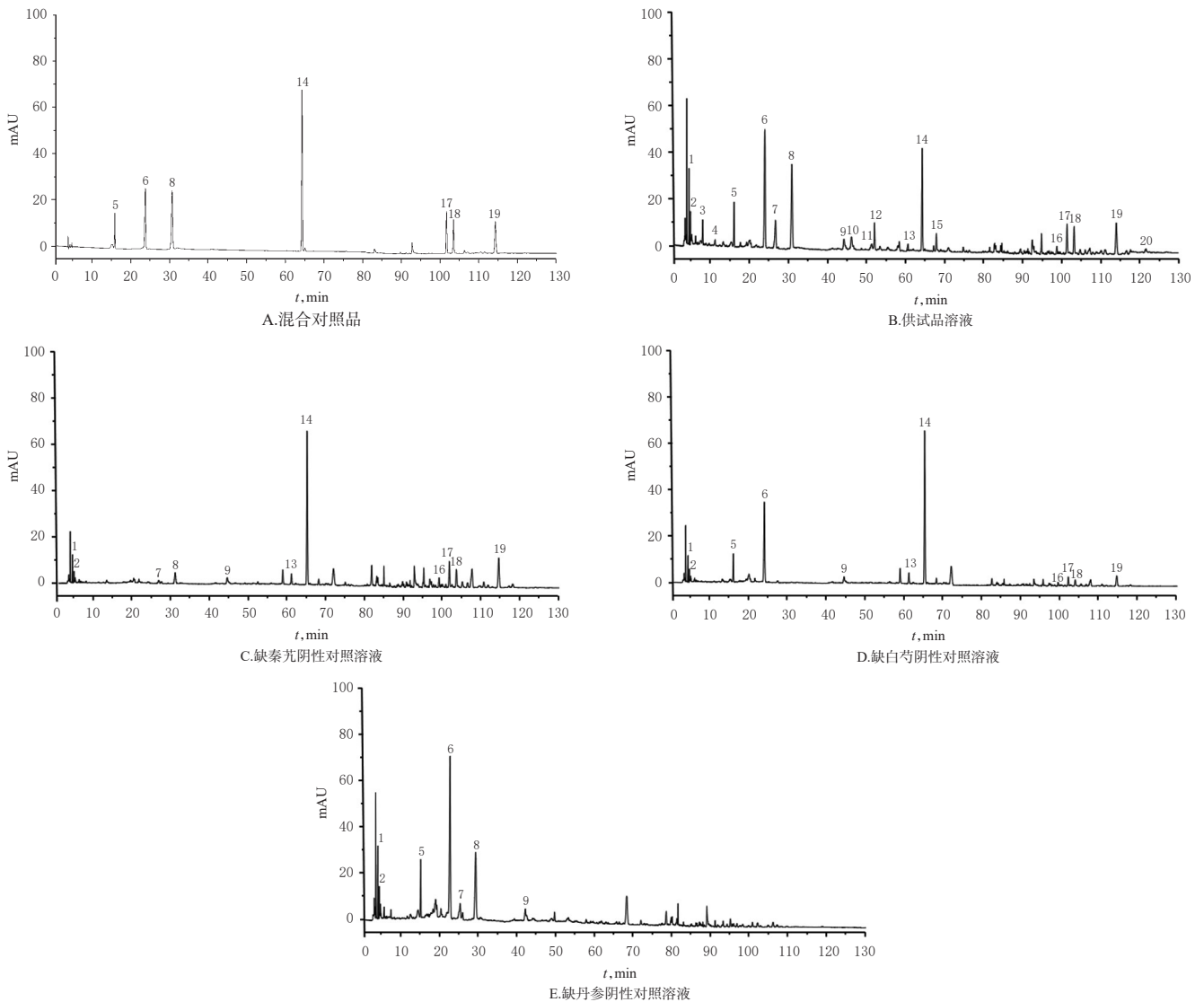
编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.994	0.983	0.981	0.978	0.988	0.990	0.992	0.979	0.971	0.994
S2	0.994	1.000	0.994	0.992	0.989	0.989	0.992	0.989	0.979	0.972	0.998
S3	0.983	0.994	1.000	0.996	0.994	0.984	0.990	0.982	0.973	0.966	0.995
S4	0.981	0.992	0.996	1.000	0.990	0.981	0.985	0.975	0.968	0.959	0.992
S5	0.978	0.989	0.994	0.990	1.000	0.979	0.977	0.976	0.974	0.970	0.992
S6	0.988	0.989	0.984	0.981	0.979	1.000	0.986	0.991	0.980	0.969	0.993
S7	0.990	0.992	0.990	0.985	0.977	0.986	1.000	0.988	0.973	0.961	0.993
S8	0.992	0.989	0.982	0.975	0.976	0.991	0.988	1.000	0.981	0.970	0.992
S9	0.979	0.979	0.973	0.968	0.974	0.980	0.973	0.981	1.000	0.993	0.987
S10	0.971	0.972	0.966	0.959	0.970	0.969	0.961	0.970	0.993	1.000	0.980
R	0.994	0.998	0.995	0.992	0.992	0.993	0.993	0.992	0.987	0.980	1.000

**2.1.9 共有峰指认** 由图 2 可见, 10 批筋骨痛消丸样品共有 20 个共有峰, 通过与混合对照品溶液(图 3A, 同一色谱条件下测得) 比对, 指认共有峰 7 个, 分别为马钱苷酸(峰 5)、龙胆苦苷(峰 6)、芍药苷(峰 8)、丹酚酸B(峰 14)、隐丹参酮(峰 17)、丹参酮 I(峰 18) 和丹参酮 II<sub>A</sub>(峰 19)。

## 2.2 含量测定

**2.2.1 色谱条件** 同“2.1.1”项。





注:5.马钱苷酸;6.龙胆苦苷;8.芍药苷;14.丹酚酸B;17.隐丹参酮;18.丹参酮 I ;19.丹参酮 II<sub>A</sub>

Note: 5. loganic acid; 6. gentiopicroside; 8. paeoniflorin; 14. salvianolic acid B; 17. cryptotanshinone; 18. tanshinone I ; 19. tanshinone II<sub>A</sub>

图3 筋骨痛消丸含量测定的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of contents determination of Jingu tongxiao pill

2.2.2 混合对照品溶液的制备 同“2.1.2”项。

2.2.3 供试品溶液的制备 同“2.1.3”项。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按筋骨痛消丸处方组成分别称取方中药材,按照制剂工艺分别制得缺秦艽、白芍、丹参的阴性对照样品,再按“2.1.3”项下方法分别制成缺味药材阴性对照溶液。

2.2.5 系统适用性试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液、“2.2.3”项下供试品溶液(编号S1)、“2.2.4”项下阴性对照溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各待测峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,理论板数均不低于10 000,阴性对照溶液对测定均无干扰,详见图3。

2.2.6 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液1、2、4、6、8、10 mL,分别用甲醇定容至10 mL量瓶中,得不同质量浓度的系列工作溶液。取上述系列工

作溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度为横坐标( $x, \mu\text{g/mL}$ )、峰面积为纵坐标( $y$ )进行线性回归,结果见表2。

表2 马钱苷酸等7个待测成分的回归方程与线性范围  
Tab 2 Regression equation and linear range of 7 components to be tested as loganin acid

待测成分	回归方程	$r$	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
马钱苷酸	$y=5.029x+71.261$	0.999 1	4.509~45.090
龙胆苦苷	$y=9.824x+10.267$	0.999 2	15.090~150.900
芍药苷	$y=10.613x+48.426$	0.999 4	14.985~149.850
丹酚酸B	$y=19.582x+1.157$	0.999 9	14.982~149.820
隐丹参酮	$y=28.441x+229$	0.999 9	2.967~29.670
丹参酮I	$y=38.023x-4.867$	0.999 9	1.944~19.440
丹参酮II <sub>A</sub>	$y=31.746x-809$	0.999 9	3.094~30.940

2.2.7 检测限与定量限考察 将“2.2.2”项下混合对照品溶液用甲醇逐级稀释,按“2.2.1”项下色谱条件进样测

定,分别以信噪比3:1和10:1计算检测限和定量限,结果见表3。

表3 马钱苷酸等7个待测成分的检测限及定量限

Tab 3 Detection limits and quantification limits of 7 components to be tested as loganin acid

待测成分	检测限, $\mu\text{g/mL}$	定量限, $\mu\text{g/mL}$	待测成分	检测限, $\mu\text{g/mL}$	定量限, $\mu\text{g/mL}$
马钱苷酸	0.060 1	0.200 4	隐丹参酮	0.031 6	0.079 1
龙胆苦苷	0.161 0	0.503 0	丹参酮 I	0.051 8	0.259 2
芍药苷	0.399 6	0.999 0	丹参酮 II <sub>A</sub>	0.082 5	0.412 6
丹酚酸B	0.159 8	0.399 5			

2.2.8 精密度试验 精密吸取“2.2.6”项下稀释后的混合对照品溶液(马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub>)的质量浓度分别为27.054、90.540、89.910、89.892、17.802、11.664、18.564  $\mu\text{g/mL}$ 各10  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub>峰面积的RSD分别为1.99%、2.15%、1.98%、1.06%、1.17%、1.03%、1.20% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.2.9 稳定性试验 取“2.2.3”项下同一供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub>峰面积的RSD分别为0.59%、0.28%、0.65%、1.24%、1.35%、0.95%、1.38% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.10 重复性试验 精密称取同一批筋骨痛消丸样品(编号S1)6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算含量。结果,马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub>含量的RSD分别为2.71%、1.42%、1.65%、1.78%、0.82%、1.48%、1.25% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.2.11 加样回收率试验 精密称取已知含量的筋骨痛消丸样品(编号S1)0.2 g,共6份,置于具塞锥形瓶中,分别加入与待测成分近似等量的混合对照品溶液,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,7个待测成分的平均加样回收率为98.81%~100.28%,RSD为0.20%~1.21% ( $n=6$ ),详见表4。

2.2.12 样品含量测定 取10批筋骨痛消丸样品粉末各0.4 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II<sub>A</sub>的含量。每样品重复测定3次,取平均值,结果见表5。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的选择

3.1.1 检测波长的选择 本课题组前期采用二极管阵

表4 马钱苷酸等7个待测成分的加样回收率试验结果 ( $n=6$ )

Tab 4 Results of recovery tests of 7 components to be tested as loganin acid ( $n=6$ )

待测成分	称样量,g	已知量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
马钱苷酸	0.201 7	0.198 6	0.195 3	0.390 2	98.11	98.81	0.42
	0.200 2	0.197 1	0.195 3	0.391 1	99.33		
	0.200 8	0.197 7	0.195 3	0.390 9	98.92		
	0.200 4	0.197 3	0.195 3	0.389 9	98.62		
	0.201 0	0.197 9	0.195 3	0.391 3	99.03		
	0.200 5	0.197 4	0.195 3	0.390 4	98.82		
龙胆苦苷	0.201 7	0.966 7	0.955 7	1.931 9	100.99	100.17	0.47
	0.200 2	0.959 6	0.955 7	1.916 9	100.17		
	0.200 8	0.962 4	0.955 7	1.914 8	99.65		
	0.200 4	0.960 5	0.955 7	1.919 4	100.33		
	0.201 0	0.963 4	0.955 7	1.920 0	100.09		
	0.200 5	0.961 0	0.955 7	1.914 8	99.80		
芍药苷	0.201 7	0.764 2	0.749 2	1.507 0	99.15	99.55	1.03
	0.200 2	0.758 5	0.749 2	1.518 2	101.40		
	0.200 8	0.760 8	0.749 2	1.504 0	99.20		
	0.200 4	0.759 3	0.749 2	1.498 9	98.72		
	0.201 0	0.761 5	0.749 2	1.511 0	100.04		
	0.200 5	0.759 7	0.749 2	1.499 9	98.80		
丹酚酸B	0.201 7	0.359 7	0.349 6	0.709 5	100.06	100.05	1.21
	0.200 2	0.357 0	0.349 6	0.699 9	98.08		
	0.200 8	0.358 0	0.349 6	0.710 3	100.77		
	0.200 4	0.357 3	0.349 6	0.704 3	99.26		
	0.201 0	0.358 4	0.349 6	0.712 8	101.37		
	0.200 5	0.357 5	0.349 6	0.709 8	100.77		
隐丹参酮	0.201 7	0.070 4	0.096 2	0.167 6	101.04	100.28	1.16
	0.200 2	0.069 8	0.096 2	0.166 5	100.52		
	0.200 8	0.070 0	0.096 2	0.164 8	98.54		
	0.200 4	0.069 9	0.096 2	0.165 3	99.17		
	0.201 0	0.070 1	0.096 2	0.167 8	101.56		
	0.200 5	0.069 9	0.096 2	0.166 9	100.83		
丹参酮 I	0.201 7	0.059 0	0.064 8	0.123 7	99.85	99.44	0.47
	0.200 2	0.058 6	0.064 8	0.122 6	98.77		
	0.200 8	0.058 8	0.064 8	0.123 0	99.07		
	0.200 4	0.058 7	0.064 8	0.123 2	99.54		
	0.201 0	0.058 8	0.064 8	0.123 6	100.00		
	0.200 5	0.058 7	0.064 8	0.123 1	99.38		
丹参酮 II <sub>A</sub>	0.201 7	0.104 8	0.103 1	0.206 4	98.55	98.82	0.20
	0.200 2	0.104 0	0.103 1	0.205 8	98.74		
	0.200 8	0.104 3	0.103 1	0.206 2	98.84		
	0.200 4	0.104 1	0.103 1	0.205 9	98.74		
	0.201 0	0.104 4	0.103 1	0.206 6	99.13		
	0.200 5	0.104 1	0.103 1	0.206 1	98.93		

列检测器在190~400 nm波长范围内对待测成分进行扫描。结果显示,在230 nm波长处色谱图中的峰容量较多、峰形较好,故本研究选择230 nm作为最终检测波长。

3.1.2 流动相的选择 由于筋骨痛消丸中化学成分众多、理化性质各异,故本研究采用梯度洗脱的模式,先后考察了甲醇-水、乙腈-水以及甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液(0.02%~0.1%)的分离效果。结果表明,当流动相为乙腈-磷酸水溶液时,所得色谱图基线平稳,各色谱峰分离效果相对更好。同时,本课题组对流动相中磷酸的浓度进行了考

察,发现不同磷酸浓度(0.02%~0.1%)对分离效果几乎没有影响,故最终选择乙腈-0.02%磷酸水溶液作为流动相。

表5 10批筋骨痛消丸样品含量测定结果( $n=3$ ,mg/g)  
Tab 5 Results of content determination of 10 batches of Jingu tongxiao pill samples( $n=3$ ,mg/g)

编号	马钱苷酸	龙胆苦苷	芍药苷	丹酚酸B	隐丹参酮	丹参酮I	丹参酮II <sub>A</sub>
S1	0.983 8	4.795 7	3.781 6	1.786 1	0.342 6	0.293 9	0.518 8
S2	0.794 2	4.136 7	3.235 7	1.805 6	0.339 9	0.218 7	0.388 0
S3	0.907 9	4.384 6	3.364 2	2.270 9	0.332 3	0.222 1	0.368 1
S4	0.969 4	4.517 1	3.674 9	2.259 3	0.293 2	0.190 2	0.358 0
S5	0.920 1	4.733 4	2.786 0	2.162 0	0.319 7	0.206 8	0.352 8
S6	0.441 0	3.283 4	2.430 5	1.386 6	0.324 3	0.229 1	0.395 8
S7	0.522 7	3.596 9	3.497 5	1.773 0	0.372 1	0.261 6	0.456 8
S8	0.587 0	3.307 3	2.485 7	1.336 6	0.348 0	0.225 2	0.457 3
S9	0.528 8	3.394 2	2.136 1	1.383 4	0.340 8	0.240 8	0.419 9
S10	0.661 4	3.474 1	1.947 7	1.495 4	0.350 7	0.241 7	0.431 3

3.1.3 柱温的选择 本课题组前期分别对25、30、35、40℃等不同柱温进行了考察。结果表明,当柱温为25℃时,各待测成分的色谱峰峰形及分离度最好,故本研究柱温选择为25℃。

### 3.2 参照峰的选择

由于丹酚酸B的峰面积较大、保留时间适中,同时与其他色谱峰的分离度较好,故选择丹酚酸B作为指纹图谱的参照峰。

### 3.3 指标性成分的确认

通过与对照品比对,本研究共指认了马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>共7个成分,分别来自于丹参、白芍和秦艽。这3种药材是筋骨痛消丸处方中用量较大的组分。同时,指认的7个成分也是2020年版《中国药典》中上述3种药材“含量测定”项规定的定量检测指标,可以说是各药材的代表性成分<sup>[13]</sup>。除此之外,有研究表明,这7个成分均有良好的抗炎、镇痛活性,与筋骨痛消丸发挥其抗骨关节炎作用直接相关<sup>[14-16]</sup>。因此,选择这7个成分作为本研究的定量分析指标对筋骨痛消丸的质量控制具有一定的意义。

### 3.4 指纹图谱与含量测定结果分析

本研究建立的筋骨痛消丸HPLC指纹图谱共获取20个共有峰,通过与混合对照品比对,共指认出其中7个化合物,分别为马钱苷酸、龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II<sub>A</sub>。另外,在未指认的色谱峰中,通过与阴性样品比对,可以得出峰7、8可能来源于白芍,峰13、16可能来源于丹参,具体归属有待进一步确认。与此同时,10批筋骨痛消丸样品图谱与对照指纹图谱间的相似度均不低于0.980,说明这10批样品的

成分相似。为进一步考察筋骨痛消丸的质量,本研究建立了这7个成分的含量测定方法,并对10批筋骨痛消丸进行了定量测定。结果发现,虽然图谱间相似度很高,但不同批次间各成分的含量依然存在较大差异,因此可以考虑将多成分含量测定加入至筋骨痛消丸的质量控制中,以更全面地提高该制剂的质量。

综上所述,本研究成功建立了筋骨痛消丸的HPLC指纹图谱和含量测定方法,可用于其质量控制。

### 参考文献

- [1] 武爱玲.筋骨痛消丸抗炎作用及其机制的研究[J].世界中西医结合杂志,2014,9(10):1046-1048.
- [2] 梁锋.“护腋松筋”推拿手法联合筋骨痛消丸治疗膝关节关节炎疗效观察[J].中医学报,2018,33(3):503-506.
- [3] 谭旭仪,刘立云,高书图,等.筋骨痛消丸对膝骨性关节炎患者WOMAC评分及PGE<sub>2</sub>、MMP-3的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(2):18-20.
- [4] 胡沛.筋骨痛消丸联合七珠展筋散治疗肩关节周围炎30例[J].风湿病与关节炎,2014,3(3):21-23.
- [5] 张云彬.筋骨痛消丸内服与二草二皮汤外用配合西药治疗髌骨软化症疗效观察[J].陕西中医,2012,33(4):436-437.
- [6] 陈保红.筋骨痛消丸治疗类风湿性关节炎50例[J].中医研究,2007,20(7):31-32.
- [7] 李小华,周立志,彭力.针刺配合筋骨痛消丸治疗腰椎间盘突出症60例疗效观察[J].湖南中医杂志,2015,31(1):90-91.
- [8] 郝军,高文香,邹春雨,等.中西医结合治疗膝关节骨坏死21例[J].中医药导报,2014,20(3):97-99.
- [9] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准(修订)颁布件:筋骨痛消丸[S].2010-01-10.
- [10] 胡静,杨媛媛,崔小敏,等.冯了性风湿跌打药酒的HPLC指纹图谱建立及其中10种有效成分的含量测定[J].中国药房,2020,31(8):932-938.
- [11] 熊莉,张梦婷,熊登科,等.小儿宣肺止咳糖浆HPLC指纹图谱的建立[J].中国药师,2020,23(11):2278-2281.
- [12] 肖何芳.抗炎退热片高效液相色谱指纹图谱的建立及其7种成分含量测定[J].中国药业,2020,29(21):62-66.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:77-79、108-109、282.
- [14] 聂安政,林志健,王雨,等.秦艽化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(3):597-608.
- [15] 张育贵,张淑娟,边甜甜,等.芍药苷药理作用研究新进展[J].中草药,2019,50(15):3735-3740.
- [16] 万新焕,王瑜亮,周长征,等.丹参化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2020,51(3):788-798.

(收稿日期:2021-02-05 修回日期:2021-04-01)

(编辑:邹丽娟)