

· 论 著 ·

双波长高效液相色谱法同时测定复方首乌藤合剂中 7 种有效成分

杨丽娜, 曾棋平, 曹毅祥, 蔡小辉, 陈锦珊 (解放军 175 医院/厦门大学附属东南医院 制剂科, 福建 漳州 363000)

[摘要] **目的** 建立双波长同时测定复方首乌藤合剂中盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷 VI、五味子醇甲的方法。**方法** 采用高效液相色谱法, Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱, 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 210 nm(盐酸川芎嗪、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷 VI、五味子醇甲)、320 nm(绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷), 柱温: 25 °C。**结果** 盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷 VI、五味子醇甲的线性关系良好($r \geq 0.9998$), 平均加样回收率分别为 102.33%、100.29%、100.18%、99.95%、99.23%、101.61%、99.28%, RSD 均小于 3%。**结论** 该法准确可靠, 结果稳定, 重复性好, 可用于复方首乌藤合剂的质量控制。

[关键词] 复方首乌藤合剂; 高效液相色谱法; 二苯乙烯苷; 合欢皮木脂素苷; 川续断皂苷 VI

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0334-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.010

Simultaneous determination of seven active components in compound caulis polygoni multiflori mixture by HPLC of double wavelength

YANG Lina, ZENG Qiping, CAO Yixiang, CAI Xiaohui, CHEN Jinshan (The Pharmacy Department, the 175th Hospital of PLA/the Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Fujian Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a double wavelength method for the simultaneous determination of ligustrazine hydrochloride, chlorogenic acid, ferulic acid, stibene glucoside, Lignin glycosides, asperosaponin VI and schizandrol A in compound caulis polygoni multiflori mixture. **Methods** The HPLC separation was performed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), gradient eluted with the mixture of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid as mobile phase, the flow rate was 1 ml/min, the detection wavelength was 210 nm and 320 nm, and the column temperature was 25 °C. **Results** There were good linear relationships in the determination of ligustrazine hydrochloride, chlorogenic acid, ferulic acid, stibene glucoside, Lignin glycosides, asperosaponin VI and schizandrol A ($r \geq 0.9997$), with the average recovery rate of 102.33%, 100.29%, 100.18%, 99.95%, 99.23%, 101.61%, 99.28%, and the RSD were less than 3%. **Conclusion** The method was accurate, stable and reproducible and could be used for quality control of compound caulis polygoni multiflori mixture.

[Key words] compound caulis polygoni multiflori mixture; HPLC; stibene glucoside; Lignin glycosides; asperosaponin VI

复方首乌藤合剂是我院特色制剂,由首乌藤、合欢皮、菟丝子、五味子、续断、蔓荆子、川芎、煅牡蛎等八味药材配制而成的中药复方制剂。方中首乌藤为君药,合欢皮为臣药,菟丝子、五味子、续断为佐药,川芎、蔓荆子、煅牡蛎为使药,诸药合用,具有五脏安和、心志欢悦、养心安神解郁之功效,临床用于神经衰弱性失眠、眩晕及脑外伤引起的头痛、头晕等

症^[1,2]。目前,主要采用君药首乌藤中二苯乙烯苷单一指标性成分的含量测定进行质量控制。为了更全面的控制制剂质量,笔者建立了双波长同时测定复方首乌藤合剂中 7 种有效成分的 HPLC 法,全面涉及君、臣、佐、使中多味药材。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱系统(DAD 检测器,美国 Agilent 公司); AUX220 型电子分析天平(精度:0.1 mg,日本岛津);甲醇、乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

对照品五味子醇甲(批号 110857-201513,纯度 99.9%),绿原酸(批号 110753-200413,纯度

[基金项目] 医院青年苗圃课题(16Y024);福建中医药大学临床专项校管课题(XB2017080)

[作者简介] 杨丽娜,硕士,药师,研究方向:中药制剂剂型与质量控制研究, Tel: (0596)2975793, Email: zylina_1225@163.com

[通讯作者] 陈锦珊,副主任药师,研究方向:医院药学, Email: cjs1223@souhu.com

99.9%), 盐酸川芎嗪(批号 817-200104, 纯度 99.9%), 均购自中国食品药品检定研究院; 二苯乙烯苷(批号 GZDD-0506, 纯度 98%), 合欢皮木脂素苷(批号 GZDD-0817, 纯度 98%), 阿魏酸(批号 GZDD-0022, 纯度 99%), 川续断皂苷 VI(批号 GZDD-0006, 纯度 98%) 均购自贵州迪大生物科技有限责任公司。复方首乌藤合剂由本院制剂科配制(批号: 1706202、1706211、1706261、1706262、1706271、1706272、1706273、1706274、1706281、1706282)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性

色谱柱: Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 2%~3% 乙腈; 10~35 min, 3%~9% 乙腈; 35~50 min, 9%~13% 乙腈; 50~65 min, 13%~18% 乙腈; 65~85 min, 18%~25% 乙腈; 85~100 min, 25%~35% 乙腈; 100~107 min, 35%~65% 乙腈; 107~118 min, 65%~90% 乙腈; 118~120 min, 90%~2% 乙腈; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 210 nm, 320 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μl。按

上述色谱条件, 各指标成分的分离度均大于 1.5, 理论板数按二苯乙烯苷峰计算不低于 5 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

分别取各对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含盐酸川芎嗪 228 μg/ml、绿原酸 422 μg/ml、阿魏酸 104 μg/ml、二苯乙烯苷 416 μg/ml、合欢皮木脂素苷 408 μg/ml、川续断皂苷 VI 3 100.5 μg/ml 和五味子醇甲 404 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

精密量取复方首乌藤合剂 5 ml, 置 10 ml 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备

依照处方比例制备不含川芎、续断、合欢皮、首乌藤和五味子的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果阴性对照在盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷 VI、五味子醇甲相应的保留时间处无其他色谱峰干扰(图 1)。

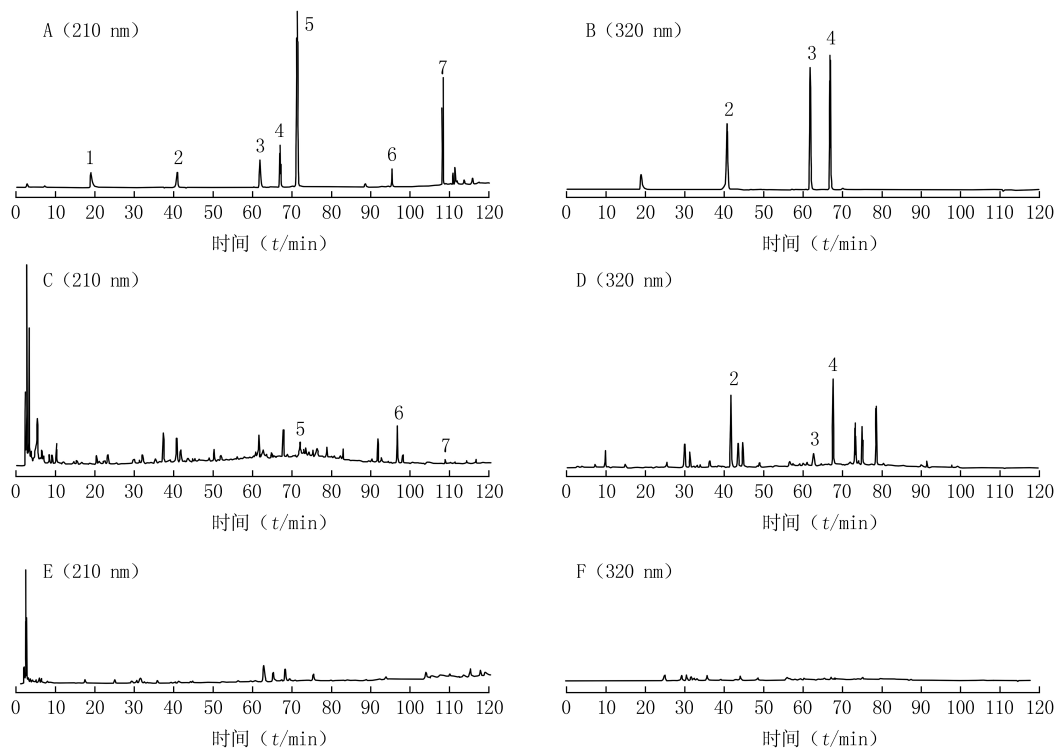


图 1 复方首乌藤合剂高效液相色谱图

A. 混合对照品(210 nm); B. 混合对照品(320 nm); C. 供试品(210 nm);

D. 供试品(320 nm); E. 阴性对照品(210 nm); F. 阴性对照品(320 nm);

1. 盐酸川芎嗪; 2. 绿原酸; 3. 阿魏酸; 4. 二苯乙烯苷; 5. 合欢皮木脂素苷; 6. 川续断皂苷 VI; 7. 五味子醇甲

2.4 线性关系考察

分别精密吸取各对照品溶液,按比例稀释,注入高效液相色谱仪,测定。以对照品质量浓度为横坐标(X),以对照品的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得线性回归方程(表1)。

表1 回归方程及线性范围

有效成分	回归方程	r	线性范围(μg/ml)
盐酸川芎嗪	$Y=19.946X-43.077$	0.999 9	11.40~114
绿原酸	$Y=17.974X+96.712$	0.999 9	54.86~211
阿魏酸	$Y=38.87X-29.501$	0.999 9	5.20~52
二苯乙烯苷	$Y=27.796X-200.030$	0.999 8	54.08~208
合欢皮木脂素苷	$Y=41.890X+358.440$	0.999 9	53.04~204
川续断皂苷VI	$Y=2.0371X+84.565$	0.999 8	206.70~2067
五味子醇甲	$Y=6.2712X+78.332$	0.999 8	15.15~151.50

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样6次,计算峰面积。盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷VI、五味子醇甲峰面积的RSD分别为2.21%、1.25%、1.87%、0.55%、2.07%、1.10%、2.25%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一批号(170620)的复方首乌藤合剂,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12、24 h进行测定,计算峰面积。盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷VI、五味子醇甲峰面积的RSD分别为1.57%、0.88%、2.06%、1.36%、2.76%、1.17%、2.03%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批号(170620)的复方首乌藤合剂,按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液6份,进样分析,计算峰面积。盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷VI、五味子醇甲峰面积的RSD分别为2.72%、1.53%、2.60%、1.20%、2.71%、0.93%、0.79%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的复方首乌藤合剂2.5 ml,共6份,置10 ml量瓶中,再分别精密加入对照品适量,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙烯苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷VI、五味子醇甲的平均加样回收率分别为

102.33%、100.29%、100.18%、99.95%、99.23%、101.61%、99.28%,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

指标成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
盐酸川芎嗪	138.66	138.66	277.23	99.64	102.33	2.06
	138.66	138.66	279.19	101.04		
	138.66	138.66	279.00	100.91		
	138.66	138.66	284.68	104.99		
	138.66	138.66	283.54	104.17		
绿原酸	262.36	261.64	525.08	100.41	100.29	2.27
	262.36	261.64	517.61	97.56		
	262.36	261.64	520.92	98.82		
	262.36	261.64	525.49	100.57		
	262.36	261.64	524.13	100.05		
阿魏酸	38.46	38.48	75.48	96.21	100.18	2.33
	38.46	38.48	77.59	101.68		
	38.46	38.48	76.52	98.92		
	38.46	38.48	77.85	102.36		
	38.46	38.48	76.94	99.99		
二苯乙烯苷	236.82	237.12	472.72	99.49	99.95	2.38
	236.82	237.12	478.36	101.87		
	236.82	237.12	465.92	96.62		
	236.82	237.12	474.96	100.43		
	236.82	237.12	469.67	98.20		
合欢皮木脂素苷	161.05	163.20	322.47	98.91	99.23	2.29
	161.05	163.20	322.75	99.08		
	161.05	163.20	325.00	100.46		
	161.05	163.20	325.36	100.68		
	161.05	163.20	326.30	101.26		
川续断皂苷VI	2539.89	2542.41	5091.96	100.38	101.61	2.09
	2539.89	2542.41	5156.02	102.90		
	2539.89	2542.41	5056.99	99.00		
	2539.89	2542.41	5189.28	104.21		
	2539.89	2542.41	5166.58	103.31		
五味子醇甲	66.44	68.68	134.41	98.97	99.28	2.71
	66.44	68.68	132.70	96.47		
	66.44	68.68	133.22	97.23		
	66.44	68.68	136.36	101.81		
	66.44	68.68	133.69	97.92		
	66.44	68.68	137.36	103.26		

2.9 样品含量测定

取10批样品,分别按“2.3”项下方法制备供试

品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙炔苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷Ⅵ、五味子醇甲的含量,结果见表3。

表3 复方首乌藤合剂样品含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

有效成分	含量($\mu\text{g/ml}$)
盐酸川芎嗪	113.26 \pm 3.688
绿原酸	209.88 \pm 5.515
阿魏酸	30.76 \pm 0.892
二苯乙炔苷	189.46 \pm 4.735
合欢皮木脂素苷	128.84 \pm 4.998
川续断皂苷Ⅵ	2 031.90 \pm 50.922
五味子醇甲	53.14 \pm 1.983

3 讨论

复方首乌藤合剂由八味中药组成的中药复方制剂,成分复杂、有效成分种类较多,目前,仅采用君药首乌藤中二苯乙炔苷单一成分的含量测定来进行质量控制,不能全面反映其质量。课题组前期对二苯乙炔苷、合欢皮木脂素苷、金丝桃苷的含量测定进行了研究,本实验根据文献和各成分的药理活性,结合2015版《中国药典》中对各单味药材的质量控制标准,确定盐酸川芎嗪、绿原酸、阿魏酸、二苯乙炔苷、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷Ⅵ和五味子醇甲作为质量控制的指标性成分^[3-7],上述7种成分来源于川芎、续断、合欢皮、首乌藤和五味子,全面涉及君、臣、佐、使中多味药材。

实验采用DAD检测器在190~400 nm范围内进行全波长扫描,分析三维信息谱图,发现盐酸川芎嗪、合欢皮木脂素苷、川续断皂苷Ⅵ、五味子醇甲在210 nm左右具有最大吸收,绿原酸、阿魏酸、二苯乙炔苷的最大吸收波长为320 nm。其中,盐酸川芎嗪和五味子醇甲分别在250 nm、300 nm处各自有一个小的吸收峰,比较盐酸川芎嗪和五味子醇甲在210 nm、250 nm和300 nm波长下的响应及含量,结果在210 nm处检测对结果无影响且响应值较大;而绿原酸、阿魏酸和二苯乙炔苷在210 nm处几乎无吸收峰。综合考虑,最终将210 nm、320 nm作为本试验的检测波长,使7个组分均有最高的检测灵敏度。

实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、

乙腈-0.4%磷酸、甲醇-1%冰醋酸等流动相系统在不同梯度洗脱程序下的色谱图^[8-11],结果显示,乙腈为流动相时的分离效果优于甲醇,乙腈-0.1%磷酸系统所得指纹图谱,样品图谱基线平稳,多数色谱峰峰形和分离情况较好。因此本实验采用乙腈-0.1%磷酸作为流动相系统梯度洗脱。

实验还比较了柱温分别为25℃、30℃、35℃时所得图谱,结果柱温为25℃时各色谱峰分离较好。因此,确定本试验的柱温为25℃。

综上所述,实验首次建立了双波长HPLC法同时测定复方首乌藤合剂中7种指标成分的方法,该方法分离效果理想,重现性好,可以用于全面衡量该制剂的质量。

【参考文献】

- [1] 曾棋平,杨丽娜,曹毅祥,等.层次分析联合Box-Behnken效应面法优选复方首乌藤合剂提取工艺[J].中南药学,2017,15(1):48-52.
- [2] 杨丽娜,曾棋平,蔡小辉,等.复方首乌藤合剂高效液相指纹图谱研究[J].中南药学,2018,16(1):27-30.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015版(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [4] 江雪欣,王佳茜.波长变换HPLC法同时测定急支糖浆中6种活性成分[J].中国药师,2017,20(3):556-558.
- [5] 陈博年,孙立伟,张毅,等.HPLC-MS/MS法同时测定心通口服液中的10种活性成分[J].中草药,2017,48(12):2455-2460.
- [6] 陈冰冰,姜爱玲,张岩.何首乌有效成分二苯乙炔苷的药理活性研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(6):710-715.
- [7] 许丹丹.五味子醇甲促觉醒及增强学习记忆功能作用[D].黑龙江中医药大学,2017.
- [8] 罗益远,刘娟秀,王锋,等.超高效液相色谱-串联质谱同时测定首乌藤中13种成分[J].中国中药杂志,2016,41(8):1474-1479.
- [9] 陈雪梅,周慧.变波长RP-HPLC法同时测定调经丸中12种成分[J].中草药,2016,47(8):1332-1336.
- [10] 谢意,郑礼胜,雷勇胜.HPLC法同时测定拨云退翳丸中10种指标成分[J].中草药,2016,47(17):3039-3043.
- [11] 于国平,朱红,师磊,等.不同产地山合欢皮中(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-葡萄糖苷含量的比较[J].药物分析杂志,2009,29(4):606-608.

【收稿日期】 2017-11-24 【修回日期】 2018-05-24

【本文编辑】 陈盛新