

HPLC 法同时测定天麻醒脑胶囊中 9 种成分

石效荣¹, 刘义升^{1*}, 邢树礼¹, 卢立明¹, 李艳江¹, 刘焕¹, 王越¹, 贾善学²

(1. 滨州医学院附属医院药学部, 山东滨州 256603; 2. 滨州市食品药品检验检测中心, 山东滨州 256600)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定天麻醒脑胶囊(天麻、熟地黄、肉苁蓉等)中天麻素、巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、 β -细辛醚、 α -细辛醚的含有量。方法 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相[乙腈-甲醇(1:1)]-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测波长 220、257、330 nm。结果 9 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999 1$), 平均加样回收率 96.88%~100.00%, RSD 0.81%~1.52%。结论 该方法简便可靠, 重复性好, 可用于天麻醒脑胶囊的质量控制。

关键词: 天麻醒脑胶囊; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0033-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.008

Simultaneous determination of nine constituents in Tianma Xingnao Capsules by HPLC

SHI Xiao-rong¹, LIU Yi-sheng^{1*}, XING Shu-li¹, LU Li-ming¹, LI Yan-jiang¹, LIU Huan¹, WANG Yue¹, JIA Shan-xue²

(1. Department of Pharmacy, The Hospital Affiliated to Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China; 2. Binzhou Municipal Center for Food and Drug Inspection and Testing, Binzhou 256600, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of gastrodin, parishin E, parishin B, parishin C, parishin A, echinacoside, verbascoside, β -asarone and α -asarone in Tianma Xingnao Capsules (*Gastrodiae Rhizoma*, *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Cistanches Herba*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 35 $^{\circ}$ C thermostatic Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), with the mobile phase comprising of [acetonitrile-methanol (1:1)]-0.1% formic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 220, 257, 330 nm. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999 1$), whose average recoveries were 96.88%–100.00% with the RSDs of 0.81%–1.52%. **CONCLUSION** This simple, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Tianma Xingnao Capsules.

KEY WORDS: Tianma Xingnao Capsules; chemical constituents; HPLC

天麻醒脑胶囊是由天麻、熟地黄、肉苁蓉、石菖蒲、地龙、远志 6 味药材加工而成的中药制剂, 具有滋补肝肾、平肝息风、通络止痛的功效, 临床上主要用于记忆力减退、反应迟钝、失眠、头痛、头晕、耳鸣、腰酸等病症的治疗^[1], 可明显增加大鼠脑血液流量, 改善小鼠脑血液循环, 具有抗脑

缺血缺氧作用^[2], 通过降低脑组织乙酰胆碱水平、减少自由基产生来改善血管性痴呆大鼠学习记忆功能障碍^[3], 通过多种途径改善记忆损伤模型动物的学习记忆功能^[4], 对后循环缺血性眩晕^[5]、颈性眩晕^[6]、慢性紧张型头痛^[7]、椎基底动脉供血不足眩晕^[8]、改善血管性认知功能障碍^[9]等疾病

收稿日期: 2019-08-05

作者简介: 石效荣(1969—), 女, 主管药师, 从事中药质量控制、传承与创新、药物合理应用等医院药学研究。Tel: 15954357709

* 通信作者: 刘义升(1963—), 男, 副主任药师, 从事中药质量控制、药理与临床等医院药学研究。Tel: 13963099288, E-mail: lys9288@sina.com

临床效果显著。

2015年版《中国药典》一部^[1]仅以天麻素含有量为指标,对天麻醒脑胶囊进行质量控制,前期文献报道也仅涉及到该成分^[10-11],而该制剂成分复杂,具有多靶点、协同作用的特点,单一成分难以全面评价其内在质量。因此,本实验首次建立HPLC法同时测定天麻醒脑胶囊中天麻素、巴利森苷E、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、β-细辛醚、α-细辛醚的含有量,以期全面评价其质量。

1 材料

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);BP-211D型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。天麻素(批号110807-201809,含纯度96.7%)、β-细辛醚(批号112018-201802,含纯度99.3%)、松果菊苷(批号111670-201706,含纯度89.7%)、毛蕊花糖苷(批号111530-201713,含纯度92.5%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;巴利森苷E(批号PRF16011523,含纯度97.1%)、巴利森苷B(批号14122013,含纯度98.5%)、巴利森苷C(批号PRF7101341,含纯度98.4%)、巴利森苷A(批号14122302,含纯度98.4%)、α-细辛醚对照品(批号PRF8051843,含纯度99.2%)均购自成都普瑞法科技开发有限公司。天麻醒脑胶囊(0.4g/粒,批号20181104、20181116、20181214)源自云南永孜堂制药有限公司。乙腈、甲醇为色谱纯(德国Merck公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6mm×250mm,5μm);流动相[乙腈-甲醇(1:1)](A)-0.1%甲酸(B),梯度洗脱(0~13.0min,11.0%A;13.0~32.0min,11.0%~28.0%A;32.0~41.0min,28.0%~45.0%A;41.0~56.0min,45.0%~72.0%A;56.0~65.0min,72.0%~11.0%A);体积流量1.0mL/min;柱温35℃;检测波长220nm^[1,10-12](0~32.0min,天麻素、巴利森苷E、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A)、330nm^[13-15](32.0~41.0min,松果菊苷、毛蕊花糖苷)、257nm^[16](41.0~65.0min,β-细辛醚、α-细辛醚);进样量10μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取天麻素、巴利森苷E、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A、松果

菊苷、毛蕊花糖苷、β-细辛醚、α-细辛醚对照品适量,50%甲醇分别制成0.426、0.538、0.132、0.298、0.914、0.576、0.212、1.478、0.652mg/mL贮备液,各精密量取2.5mL,置于同一50mL量瓶中,50%甲醇制备,即得(含21.3μg/mL天麻素、26.9μg/mL巴利森苷E、6.6μg/mL巴利森苷B、14.9μg/mL巴利森苷C、45.7μg/mL巴利森苷A、28.8μg/mL松果菊苷、10.6μg/mL毛蕊花糖苷、73.9μg/mLβ-细辛醚、32.6μg/mLα-细辛醚)。

2.2.2 供试品溶液 取胶囊适量,倾出内容物,混匀,取约0.2g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入25mL50%甲醇,密塞,称定质量,回流提取45min,放冷,50%甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按2015年版《中国药典》一部中胶囊处方工艺,分别制备缺天麻、肉苁蓉和熟地黄、石菖蒲的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.3 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图1。由此可知,各成分与相邻色谱峰均能达到有效分离(分离度均大于1.5),理论塔板数均不低于4500,阴性无干扰,表明该方法专属性良好。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下贮备液各2.0mL,置于20mL量瓶中,50%甲醇稀释至刻度,摇匀,取适量用50%甲醇依次稀释2、5、10、15、20倍,制成系列质量浓度对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果见表1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
天麻素	Y=1.108 9×10 ⁶ X+236.2	0.999 1	2.13~42.60
巴利森苷E	Y=9.671 3×10 ⁵ X-443.8	0.999 7	2.69~53.80
巴利森苷B	Y=1.234 9×10 ⁶ X+357.9	0.999 3	0.66~13.20
巴利森苷C	Y=1.329 6×10 ⁶ X+261.8	0.999 6	1.49~29.80
巴利森苷A	Y=1.176 5×10 ⁶ X+258.2	0.999 2	4.57~91.40
松果菊苷	Y=1.417 5×10 ⁶ X-186.3	0.999 5	2.88~57.60
毛蕊花糖苷	Y=1.067 2×10 ⁶ X+329.1	0.999 4	1.06~21.20
β-细辛醚	Y=1.668 2×10 ⁶ X+196.5	0.999 8	7.39~147.80
α-细辛醚	Y=1.357 1×10 ⁶ X+326.4	0.999 3	3.26~65.20

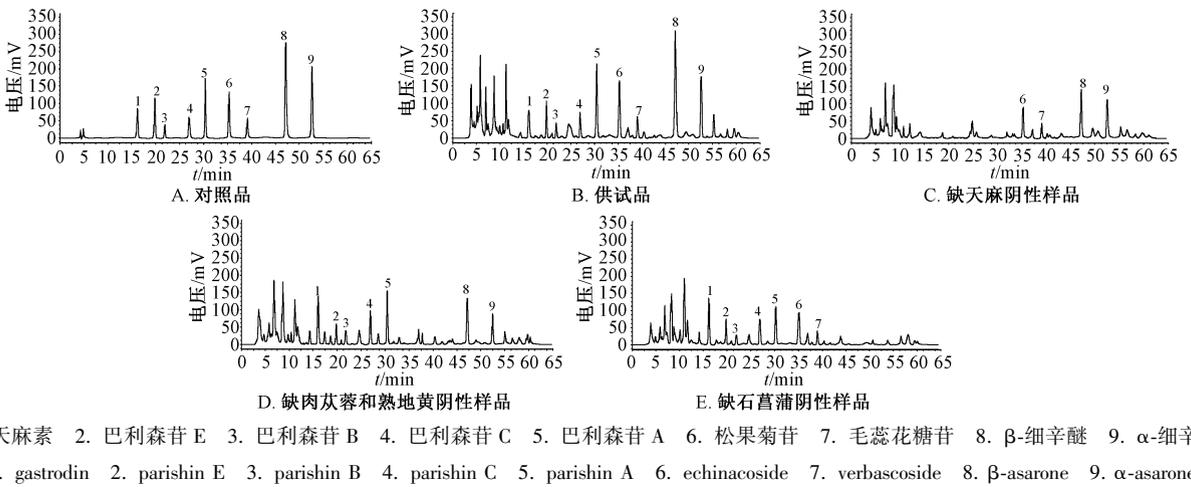


图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.5 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定6次，测得天麻素、巴利森苷E、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、β-细辛醚、α-细辛醚峰面积RSD分别为0.95%、1.03%、1.22%、0.87%、0.71%、1.16%、1.34%、0.59%、0.61%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批胶囊适量，按“2.2.2”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，测得天麻素、巴利森苷E、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、β-细辛醚、α-细辛醚含量RSD分别为1.15%、1.47%、0.82%、1.26%、1.19%、1.62%、1.35%、0.94%、1.03%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液，于0、2、4、6、12、18 h在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得天麻素、巴利森苷E、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、β-细辛醚、α-细辛醚峰面积RSD分别为0.71%、0.66%、1.18%、1.31%、0.94%、1.13%、1.29%、0.63%、0.74%，表明溶液在18 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取含有量已知的同1批胶

囊适量，倾出内容物，混匀，精密称取9份，每3份为1组，每份约0.1 g，置于具塞锥形瓶中，按照2015年版《中国药典》四部要求，使对照品加入量相当于样品量的50%、100%、150%，精密加入对照品溶液（含0.254 mg/mL天麻素、0.322 mg/mL巴利森苷E、0.094 mg/mL巴利森苷B、0.206 mg/mL巴利森苷C、0.574 mg/mL巴利森苷A、0.346 mg/mL松果菊苷、0.156 mg/mL毛蕊花糖苷、0.942 mg/mLβ-细辛醚、0.418 mg/mLα-细辛醚）0.5、1.0、1.5 mL，各3份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，天麻素、巴利森苷E、巴利森苷B、巴利森苷C、巴利森苷A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、β-细辛醚、α-细辛醚平均加样回收率分别为99.14%、98.86%、96.97%、99.40%、98.37%、97.89%、97.46%、100.00%、96.88%，RSD分别为0.94%、1.03%、1.29%、0.88%、1.52%、1.27%、1.30%、0.81%、1.16%。

2.9 样品含有量测定 取3批胶囊适量，倾出内容物，混匀，精密称取约0.2 g，按“2.2.2”项下方法平行制备3份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果 (n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (n=3)

批号	含有量/(mg·粒 ⁻¹)								
	天麻素	巴利森苷E	巴利森苷B	巴利森苷C	巴利森苷A	松果菊苷	毛蕊花糖苷	β-细辛醚	α-细辛醚
20181104	1.024	1.278	0.374	0.835	2.313	1.375	0.630	3.784	1.652
20181116	0.923	1.341	0.322	0.753	2.088	1.520	0.662	4.042	1.734
20181214	1.122	1.154	0.409	0.868	2.532	1.246	0.571	3.410	1.499

3 讨论

3.1 指标成分确定 天麻醒脑胶囊中天麻功效息风止痉、平抑肝阳、祛风通络，为君药；地龙功效清热定惊、通络平喘，熟地黄、肉苁蓉功效滋阴补肾、填精补髓，石菖蒲、远志功效化痰开窍、醒神益智，诸药合奏，共达滋补肝肾、平肝息风、通络定眩之效。研究显示，天麻素、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 等天麻素类成分为天麻主要活性成分，松果菊苷、毛蕊花糖苷等苯乙醇苷类为肉苁蓉主要活性成分，毛蕊花糖苷为熟地黄中苯乙醇苷类代表性成分， β -细辛醚、 α -细辛醚等挥发油为石菖蒲主要活性成分，故本实验选取上述 9 种成分作为指标成分。

3.2 流动相筛选 本实验首先考察了流动相乙腈-0.1% 磷酸^[1,11-12]、甲醇-0.1% 甲酸^[13-14,16-17]、乙腈-0.1% 甲酸^[18]、乙腈-0.1% 冰醋酸^[15]，发现以乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 冰醋酸为流动相时，基线不平稳，巴利森苷 B 峰拖尾严重，巴利森苷 B、巴利森苷 C 分离度不符合要求；以乙腈-0.1% 甲酸为流动相时，基线不平稳；以甲醇-0.1% 甲酸为流动相时，天麻素达不到基线分离，故将乙腈和甲醇按 1:1 比例混合后，再与 0.1% 甲酸一起梯度洗脱，同时对两者比例不断摸索，最终确定为“2.1”项下条件。

3.3 供试品溶液提取方法筛选 本实验考察了提取溶剂（甲醇^[10,15-16]、50% 甲醇^[13-14]、乙醇、稀乙醇^[12]）、提取方式（超声提取^[10-17]、加热回流提取）对天麻醒脑胶囊中各成分综合提取率、色谱峰形、检测时间的影响，同时比较了提取时间 30、45、60 min。最终确定，供试品溶液提取方法为 50% 甲醇加热回流提取 45 min。

4 结论

本实验建立了 HPLC 法同时测定天麻醒脑胶囊中天麻素、巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A、松果菊苷、毛蕊花糖苷、 β -细辛醚、 α -细辛醚的含有量，该方法简便准确，专属性强，可为该制剂质量控制和综合评价提供参考依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部

[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 596-597.

[2] 刘睿, 云宇, 郑金丹, 等. 天麻醒脑胶囊对鼠脑血液循环的影响[J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(6): 16-18.

[3] 杨建宇, 杨扬, 张小超, 等. 天麻醒脑胶囊对血管性痴呆动物认知功能障碍的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(1): 56-59.

[4] 陈鹏, 金燕, 王殿华, 等. 天麻醒脑胶囊对学习记忆功能的影响及机理研究[J]. 昆明医学院学报, 2006, 27(5): 36-42.

[5] 周路, 胡玉英. 天麻醒脑胶囊治疗后循环缺血性眩晕 55 例[J]. 陕西中医, 2012, 33(10): 1289-1290.

[6] 李世辉, 朱虹江. 天麻醒脑胶囊治疗颈性眩晕 60 例临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(5): 11-12.

[7] 戴楠, 杜菊梅. 天麻醒脑胶囊治疗慢性紧张型头痛(肝肾不足, 肝风上扰证)的临床效果[J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(27): 1-3.

[8] 张玉红. 天麻醒脑胶囊治疗椎-基底动脉供血不足眩晕临床观察[J]. 新中医, 2012, 44(11): 42-43.

[9] 来建明, 林亚明. 天麻醒脑胶囊治疗血管性认知功能障碍临床观察[J]. 光明中医, 2016, 31(21): 3127-3130.

[10] 许威, 吴虹, 沈晨, 等. 天麻醒脑胶囊的质量控制[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(1): 54-57.

[11] 王萍, 王文龙. 天麻醒脑片中天麻素含量测定方法研究[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(1): 13-15.

[12] 王信, 王徽, 杨飞, 等. 天麻中 6 种天麻素类成分一测多评分析法的建立[J]. 中草药, 2018, 49(3): 694-699.

[13] 蔡鸿, 鲍忠, 姜勇, 等. 不同影响因素下肉苁蓉中 3 种活性成分的定量分析[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3223-3230.

[14] 任荣军. 一测多评法测定肉苁蓉中 2 种有效成分的含量[J]. 中国药师, 2015, 18(8): 1404-1406.

[15] 柴焯, 郑立颖. 不同产地生地黄和熟地黄中毛蕊花糖苷含量的比较研究[J]. 甘肃科学学报, 2015, 27(3): 37-40.

[16] 柳梦婷, 方婧, 吴宏伟, 等. 高效液相色谱法同时检测石菖蒲中 β -细辛醚、 α -细辛醚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 75-78.

[17] 陈龙梗, 杨青山, 杨烁, 等. 高效液相色谱法测定安徽产石菖蒲中 α -细辛醚、 β -细辛醚的含量[J]. 甘肃中医药大学学报, 2017, 34(5): 15-18.

[18] 虞小静, 张冬月, 李思雨, 等. 天麻水提物 HPLC 指纹图谱的建立及其真伪鉴别[J]. 中成药, 2018, 40(12): 2698-2702.