

RP-HPLC法同时测定九味羌活丸、片、颗粒中4种成分

刘斌¹, 曾隆勇², 周思敏³

(1. 德阳市食品药品安全检验检测中心, 四川德阳 618000; 2. 德阳市中西医结合医院, 四川德阳 618000; 3. 德阳广播电视台大学, 四川德阳 618000)

摘要: 目的 建立RP-HPLC法同时测定九味羌活丸、片、颗粒(羌活、防风、苍术等)中羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷的含有量。方法 3种药物甲醇提取液的分析采用TechMate C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1%冰醋酸, 梯度洗脱; 体积流量1.0 mL/min; 柱温35 °C; 检测波长317 nm。结果 羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷分别在2.944 2~31.768 2 μg/mL($r=0.999\ 8$)、1.995 8~19.958 4 μg/mL($r=0.999\ 8$)、2.944 2~29.441 8 μg/mL($r=0.999\ 7$)、8.215 0~82.150 1 μg/mL($r=0.999\ 7$)范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为94.9%、93.9%、91.2%、101.1%, RSD分别为0.9%、1.2%、1.4%、1.0%。结论 该方法准确可靠, 可用于九味羌活丸、片、颗粒的质量控制。

关键词: 九味羌活丸; 九味羌活片; 九味羌活颗粒; 羌活醇; 阿魏酸; 异欧前胡素; 紫花前胡苷; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)03-0588-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.03.008

Simultaneous determination of four constituents in Jiuwei Qianghuo Pills, Tablets and Granules by RP-HPLC

LIU Bin¹, ZENG Long-yong², ZHOU Si-min³

(1. Deyang Municipal Center for Food and Drug Safety Inspection, Deyang 618000, China; 2. Deyang Hospital of Intergrated Traditional Chinese & Western Medicine, Deyang 618000, China; 3. Deyang Radio and TV University, Deyang 618000, China)

ABSTRACT: AIM To establish a RP-HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Jiuwei Qianghuo Pills, Tablets and Granules (*Notopterygii Rhizoma et Radix*, *Saposhnikoviae Radix*, *Atractylodis Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extracts of these three drugs was performed on a 35 °C thermostatic TechMate C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% glacial acetic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 317 nm. **RESULTS** Notopteol, ferulic acid, isoimperatorin and nodakenin showed good linear relationships within the ranges of 2.944 2~31.768 2 μg/mL($r=0.999\ 8$), 1.995 8~19.958 4 μg/mL($r=0.999\ 8$), 2.944 2~29.441 8 μg/mL($r=0.999\ 7$) and 8.215 0~82.150 1 μg/mL($r=0.999\ 7$), whose average recoveries were 94.9%, 93.9%, 91.2% and 101.1% with the RSDs of 0.9%, 1.2%, 1.4% and 1.0%, respectively. **CONCLUSION** This accurate and reliable method can be used for the quality control of Jiuwei Qianghuo Pills, Tablets and Granules.

KEY WORDS: Jiuwei Qianghuo Pills; Jiuwei Qianghuo Tablets; Jiuwei Qianghuo Granules; notopteol; ferulic acid; isoimperatorin; nodakenin; HPLC

九味羌活方出自金代名医张元素, 后来元代医家王好古师从张元素之徒李杲, 首次将九味羌活汤录于《此事难知》中^[1], 具有疏风解表、散寒除

湿之功效, 用于外感风寒挟湿所致的感冒, 再经现代制药技术制成九味羌活丸、九味羌活颗粒^[2]、九味羌活片^[3], 三者均由羌活、防风、苍术、细

辛、川芎、白芷、黄芩、地黄、甘草9味药材组成。方中君药羌活味辛、苦，性温，功效散表寒、祛风湿、利关节、止痹痛，为治太阳风寒湿邪在表之要药，其主要活性成分为羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷等^[4-7]；臣药防风味辛、甘，性温，功效祛风除湿、散寒止痛，主要成分有异欧前胡素、紫花前胡苷等^[8]；佐药白芷功效祛风散寒、宣痹止痛，主要成分有异欧前胡素、紫花前胡苷等^[9]，而川芎功效祛风止痛，为止头痛之要药，主要成分有阿魏酸等^[10]。查阅文献发现，尚无同时测定该系列制剂中以上成分含有量的报道^[11-15]，故本实验建立RP-HPLC法同时测定九味羌活丸、片、颗粒中羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷的含有量，以期为相关质量控制提供参考依据。

1 材料

Waters e2695 高效液相色谱仪 [沃特世科技(上海)有限公司]；XS205 电子天平 [梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]；KQ-700DV 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。羌活醇(批号 111820-201705, 纯度 99.9%)、阿魏酸(批号 110773-201614, 纯度 99.0%)、异欧前胡素(批号 110827-201812, 纯度 99.6%)、紫花前胡苷(批号 111821-201604, 纯度 99.6%)对照品均购于中国食品药品检定研究院。九味羌活丸、片、颗粒均为市售，由6个厂家(A~F)生产，共8批。甲醇、乙腈为色谱纯；其余试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 TechMate C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) -0.1% 冰醋酸

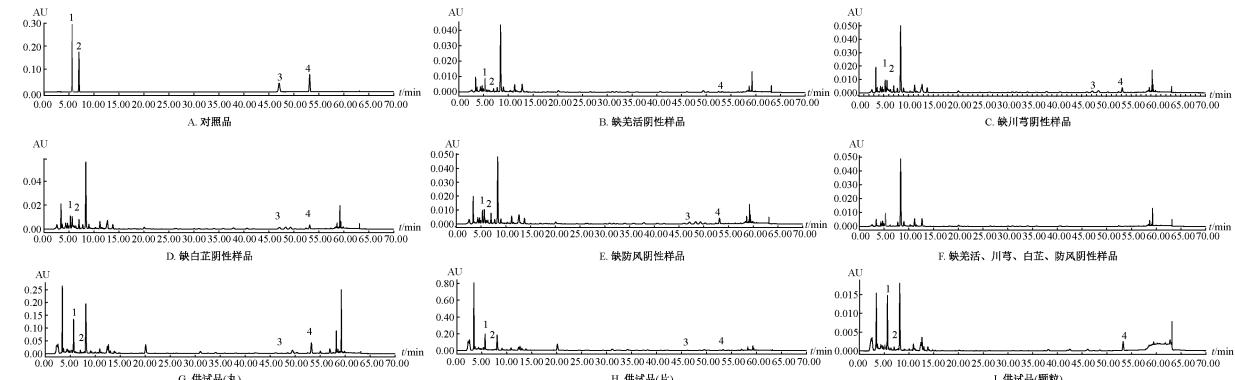


图 1 各成分 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

(B)，梯度洗脱 (0~15 min, 25%~38% A; 15~17 min, 38% A; 17~45 min, 38%~50% A; 45~55 min, 50%~75% A; 55~55.1 min, 75%~95% A; 55.1~60 min, 95% A; 60~60.1 min, 95%~25% A; 60.1~70 min, 25% A); 体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 ℃；检测波长 317 nm；进样量 10 μL；记录时间 70 min。理论塔板数按羌活醇峰计，应不低于 2 000。

2.2 对照品溶液制备 精密称取对照品羌活醇 0.015 90 g、阿魏酸 0.010 08 g、异欧前胡素 0.014 78 g，置于 100 mL 量瓶中；紫花前胡苷 0.020 62 g，置于 50 mL 量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为贮备液，各精密量取 1 mL，置于 5 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，即得 (每 1 mL 分别含羌活醇 31.768 2 μg、阿魏酸 19.958 4 μg、异欧前胡素 29.441 8 μg、紫花前胡苷 82.150 1 μg)。

2.3 供试品溶液制备 取 3 种制剂，研细混匀，各精密称取 0.5 g，置于具塞三角瓶中，精密加入 25 mL 甲醇，称定质量，超声 (350 W、40 kHz) 处理 40 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 阴性样品溶液制备 根据处方分别制备缺羌活、白芷、防风、川芎、羌活+白芷+防风+川芎的阴性样品，按“2.3”项下方法制备，即得

2.5 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL，在“2.3”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，供试品在对照品相应位置上存在相同保留时间的色谱峰，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

2.6 线性关系考察 精密量取“2.2”项下贮备液1 mL, 置于5、10、20、25、50 mL量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摆匀, 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, 得羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷方程分别为 $Y=21826.8212X+17641.3636$ (*r*=0.9998)、 $Y=51071.9350X+21624.3174$ (*r*=0.9998)、 $Y=27442.6506X+26314.9153$ (*r*=0.9997)、 $Y=17690.9996X+42036.2256$ (*r*=0.9997), 分别在2.9442~31.7682、1.9958~19.9584、2.9442~29.4418、8.2150~82.1501 μg/mL范围内线性关系良好。

2.7 定量限、检出限 对照品溶液用甲醇逐级稀释, 分别以S/N=3、S/N=10为检出限、定量限。结果, 羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷检出限分别为101.6582、7.983、23.55、16.43 ng/mL, 定量限分别为181.7141、19.1601、82.4369、46.0040 ng/mL。

2.8 稳定性试验 取3种制剂, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 室温下于0、4、8、12、16、20、24 h在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷峰面积RSD分别为0.4%、0.6%、0.4%、0.4%, 表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.9 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定6次, 每次10 μL, 测得羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷峰面积RSD分别为0.3%、0.2%、0.2%、0.2%, 表明仪器精密度良好。

2.10 重复性试验 取同一批制剂, 平行称定6份, 每份0.5 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, 测得羌活醇、阿魏酸、异欧前胡素、紫花前胡苷峰面积RSD分别为0.4%、0.5%、0.2%、2.0%, 表明该方法重复性良好。

2.11 加样回收率试验 精密吸取羌活醇对照品溶液(158.841 μg/mL)1.38 mL、阿魏酸对照品溶液(99.792 μg/mL)0.65 mL、异欧前胡素对照品溶液(147.2088 μg/mL)1.39 mL、紫花前胡苷对照品溶液(410.7504 μg/mL)1.37 mL, 各6份, 置于150 mL具塞锥形瓶中, 温水浴挥干甲醇。精密称取含有量已知的水丸(含羌活醇0.4383 mg/g、阿魏酸0.1288 mg/g、异欧前胡素0.4093 mg/g、紫花前胡苷1.3774 mg/g)0.25 g, 各6份, 置于具塞锥形瓶中, 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, 计算回收率, 结果见表1。

表1 各成分加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
羌活醇	0.2510	0.1089	0.2192	0.3152	94.1	94.9	0.9
	0.2515	0.1087	0.2192	0.3159	94.5		
	0.2519	0.1088	0.2192	0.3158	94.4		
	0.2507	0.1079	0.2192	0.3156	94.8		
	0.2515	0.1088	0.2192	0.3225	97.5		
	0.2518	0.1093	0.2192	0.3158	94.2		
阿魏酸	0.2510	32.0527	64.8648	93.6400	94.9	93.9	1.2
	0.2515	32.1920	64.8648	93.0100	93.8		
	0.2519	32.2432	64.8648	92.0400	92.2		
	0.2507	31.9144	64.8648	93.1650	94.4		
	0.2515	32.4687	64.8648	94.6350	95.8		
	0.2518	32.5326	64.8648	92.3500	92.2		
异欧前胡素	0.2510	0.1021	0.2046	0.2871	90.4	91.2	1.4
	0.2515	0.1024	0.2046	0.2880	90.7		
	0.2519	0.1027	0.2046	0.2868	90.0		
	0.2507	0.1020	0.2046	0.2861	90.0		
	0.2515	0.1028	0.2046	0.2965	94.7		
	0.2518	0.1025	0.2046	0.2897	91.5		
紫花前胡苷	0.2510	0.3477	0.6860	1.0396	100.9	101.1	1.0
	0.2515	0.3453	0.6860	1.0324	100.2		
	0.2519	0.3422	0.6860	1.0334	100.8		
	0.2507	0.3416	0.6860	1.0309	100.5		
	0.2515	0.3580	0.6860	1.0718	104.1		
	0.2518	0.3589	0.6860	1.0439	99.9		

2.12 样品含有量测定 取3种制剂,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,计算含有量,结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g)

编号	厂家	剂型	批号	羌活醇	阿魏酸	异欧前胡素	紫花前胡苷	总量
1	A	水丸	19010001	0.070 5	0.189 6	0.688 0	1.516 0	2.464 1
2	A	片剂	18060001	0.118 3	0.040 2	0.214 0	3.109 8	3.482 3
3	B	浓缩丸	1609029	0.178 7	0.024 7	0.092 1	0.765 1	1.060 6
4	C	水丸	1901001	0.402 5	0.119 7	0.383 3	1.252 9	2.158 4
5	D	水丸	181101	0.044 1	0.071 9	0.867 2	2.158 2	3.141 4
6	E	颗粒剂	1804013	0.004 3	0.005 1	0.048 0	0.235 0	0.292 4
7	E	颗粒剂	1804010	0.002 3	0.005 1	0.023 4	0.216 3	0.247 1
8	F	水丸	181103	0.092 8	0.077 9	1.344 7	3.026 3	4.541 7

3 讨论

3.1 检测波长选择 本实验采用二极管阵列检测器进行全波长扫描,发现紫花前胡苷在334.3 nm、阿魏酸在217.8、235.5、322.3 nm,羌活醇在249.7、310.4 nm,异欧前胡素在249.7、310.4 nm处有最大吸收。由于九味羌活中羌活醇含有量很低,而紫花前胡苷相对较高,故最终确定317 nm作为检测波长。

3.2 色谱条件选择 本实验考察了流动相甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸、乙腈-磷酸、乙腈-冰醋酸,发现乙腈-水分离效果最好,优选比例后,最终确定乙腈-0.1%冰醋酸作为流动相。另外,由于中成药组成复杂,等度洗脱无法进行有效分离,故选择梯度洗脱。

3.3 提取方法选择 前期查阅文献发现,羌活醇、异欧前胡素转移程度分别在45、55℃下最大^[16],而阿魏酸对光、热敏感,尤其见光易分解^[17],故选择避光超声提取。然后,考察了提取溶剂25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇、甲醇、乙醇,以及提取时间30、40、50 min对提取效率的影响。最终确定甲醇避光超声提取40 min作为提取方法。

3.4 含有量分析 不同生产企业生产的九味羌活制剂中各成分总含有量差异明显,均以羌活醇最低(尤其是颗粒剂),表明需进一步加强对羌活原药材及相关制剂的质量控制。另外,羌活为九味羌活制剂君药,而羌活醇为该药材特征性、活性成分^[4-7],其含有量是否会明显影响制剂疗效尚不明确^[18],有待继续研究。

参考文献:

- [1] 俞长荣. 试论张元素的学术成就[J]. 中医杂志, 1962 (5): 38-41.
[2] 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: 478-479.
[3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第五册) [S]. 1992: 6.
[4] 杨秀伟, 严仲铠, 顾哲明, 等. 羌活化学成分的研究[J]. 中草药, 1993, 24(10): 507-511; 557.
[5] 李云霞, 高春华, 沙明. 中药羌活化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药学院学报, 2004, 6(1): 22-23.
[6] 吴亦琴, 陈明明, 赵宗惠, 等. 中药羌活的研究进展[J]. 检验医学教育, 2005, 12(1): 33-35.
[7] 刘卫根, 周国英, 郑金顺, 等. 栽培宽叶羌活中有机酸和香豆素含量的季节动态变化研究[J]. 化学研究与应用, 2018, 30(1): 28-33.
[8] 赵博, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. 防风化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1569-1572.
[9] 王梦月, 贾敏如. 白芷的化学成分研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(6): 446-449.
[10] 蒲忠慧, 蒙春旺, 周彦希, 等. 川芎化学成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(11): 2529-2531.
[11] 包小红, 何筱毅, 刘繁红, 等. UPLC同时测定九味羌活颗粒中4种成分的含量[J]. 中药与临床, 2017, 8(1): 29-31.
[12] 李巧玲, 王冬梅, 苗秋艳, 等. RP-HPLC法同时测定九味羌活丸中升麻素苷等5种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(2): 114-119; 126.
[13] 张幸福, 范莹莹, 王菲, 等. RP-HPLC法测定5种剂型的九味羌活制剂中紫花前胡苷、异欧前胡素[J]. 中成药, 2014, 36(7): 1458-1461.
[14] 宋九华, 王刚, 刘素君. HPLC测定九味羌活丸中黄芩苷、甘草酸和异甘草素含量[J]. 中成药, 2010, 32(11): 1914-1916.
[15] 史雪霞, 李运. RP-HPLC法测定九味羌活丸中阿魏酸和欧前胡素的含量[J]. 甘肃医药, 2017, 36(7): 516-518; 527.
[16] 孙振阳, 王英姿, 聂瑞杰, 等. 羌活饮片生产加工工艺规范化研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4510-4513.
[17] 郑东浪. HPLC法测定羌活中阿魏酸的含量[J]. 海峡药学, 2017, 29(4): 74-76.
[18] 周毅, 白筱璐, 孙洪兵, 等. 家种羌活的品质评价研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 95-99.