

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 ℃; 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 ℃ 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，以期对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

(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。

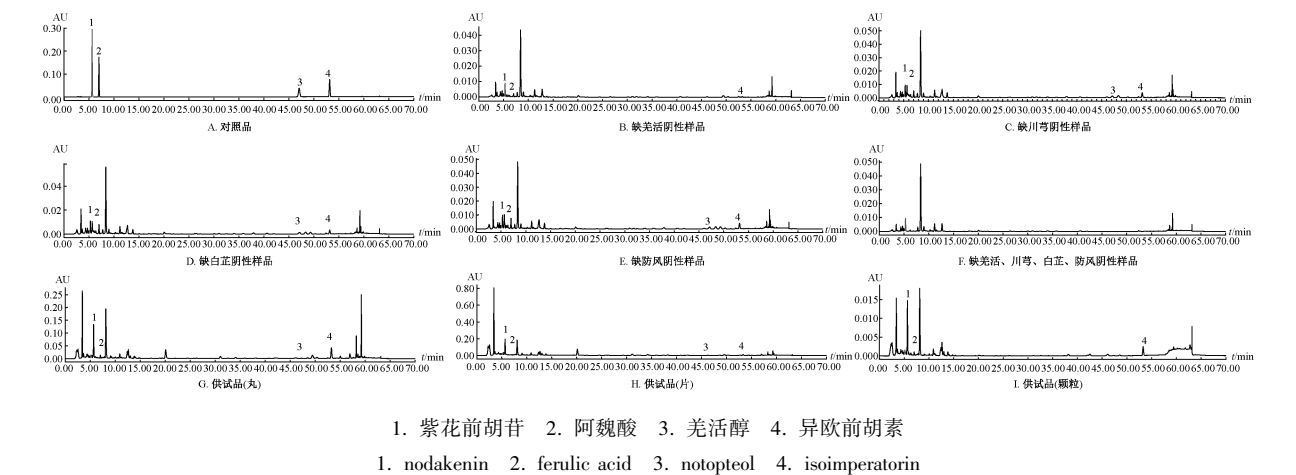


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

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,摇匀,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 $Y=21\,826.821\,2X+17\,641.363\,6$ ($r=0.999\,8$)、 $Y=51\,071.935\,0X+21\,624.317\,4$ ($r=0.999\,8$)、 $Y=27\,442.650\,6X+26\,314.915\,3$ ($r=0.999\,7$)、 $Y=17\,690.999\,6X+42\,036.225\,6$ ($r=0.999\,7$),分别在2.944 2~31.768 2、1.995 8~19.958 4、2.944 2~29.441 8、8.215 0~82.150 1 $\mu\text{g/mL}$ 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101.658 2、7.983、23.55、16.43 ng/mL ,定量限分别为181.714 1、19.160 1、82.436 9、46.004 0 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 $\mu\text{g/mL}$) 1.38 mL、阿魏酸对照品溶液(99.792 $\mu\text{g/mL}$) 0.65 mL、异欧前胡素对照品溶液(147.208 8 $\mu\text{g/mL}$) 1.39 mL、紫花前胡苷对照品溶液(410.750 4 $\mu\text{g/mL}$) 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0.438 3 mg/g 、阿魏酸0.128 8 mg/g 、异欧前胡素0.409 3 mg/g 、紫花前胡苷1.377 4 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	0.251 0	0.108 9	0.219 2	0.315 2	94.1	94.9	0.9
	0.251 5	0.108 7	0.219 2	0.315 9	94.5		
	0.251 9	0.108 8	0.219 2	0.315 8	94.4		
	0.250 7	0.107 9	0.219 2	0.315 6	94.8		
	0.251 5	0.108 8	0.219 2	0.322 5	97.5		
	0.251 8	0.109 3	0.219 2	0.315 8	94.2		
阿魏酸	0.251 0	32.052 7	64.864 8	93.640 0	94.9	93.9	1.2
	0.251 5	32.192 0	64.864 8	93.010 0	93.8		
	0.251 9	32.243 2	64.864 8	92.040 0	92.2		
	0.250 7	31.914 4	64.864 8	93.165 0	94.4		
	0.251 5	32.468 7	64.864 8	94.635 0	95.8		
	0.251 8	32.532 6	64.864 8	92.350 0	92.2		
异欧前胡素	0.251 0	0.102 1	0.204 6	0.287 1	90.4	91.2	1.4
	0.251 5	0.102 4	0.204 6	0.288 0	90.7		
	0.251 9	0.102 7	0.204 6	0.286 8	90.0		
	0.250 7	0.102 0	0.204 6	0.286 1	90.0		
	0.251 5	0.102 8	0.204 6	0.296 5	94.7		
	0.251 8	0.102 5	0.204 6	0.289 7	91.5		
紫花前胡苷	0.251 0	0.347 7	0.686 0	1.039 6	100.9	101.1	1.0
	0.251 5	0.345 3	0.686 0	1.032 4	100.2		
	0.251 9	0.342 2	0.686 0	1.033 4	100.8		
	0.250 7	0.341 6	0.686 0	1.030 9	100.5		
	0.251 5	0.358 0	0.686 0	1.071 8	104.1		
	0.251 8	0.358 9	0.686 0	1.043 9	99.9		

2.12 样品含有量测定 取 3 种制剂，按“2.3” 下进样测定，计算含有量，结果见表 2。
项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件

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.