

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.12.1564

梯度洗脱联合波长切换 HPLC 法同时测定豨莶风湿丸中的豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱

韦坤璇¹, 罗俊^{1*}, 刘国萍¹, 徐佳佳²

1. 广西医科大学第一附属医院药学部, 南宁 530021

2. 广西医科大学药学院, 南宁 530021

[摘要] **目的** 建立梯度洗脱联合波长切换 HPLC 法同时测定豨莶风湿丸中豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱。**方法** 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以流动相 A:乙腈-甲醇(2:1)、流动相 B:0.05%冰醋酸溶液进行梯度洗脱;流速为 1.0 mL/min;进样量为 20 μL;豨莶苷、奇壬醇和豨莶精醇检测波长为 215 nm, 防己诺林碱和粉防己碱检测波长为 280 nm。**结果** 豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱在给定浓度范围内的线性范围分别为 6.45~129.00 μg/mL($r=0.9995$)、5.61~112.20 μg/mL($r=0.9999$)、4.25~85.00 μg/mL($r=0.9993$)、9.19~183.80 μg/mL($r=0.9998$)和 11.05~221.00 μg/mL($r=0.9997$), 线性关系良好;平均加样回收率和相对标准偏差(RSD)值分别为 98.73%(1.43%)、97.63%(1.28%)、99.44%(1.29%)、98.33%(1.38%)、97.36%(1.37%)。**结论** 建立的梯度洗脱联合波长切换 HPLC 法能同时测定豨莶风湿丸中豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱含量, 方法简便、准确、重现性好, 为豨莶风湿丸质量控制提供了可靠方法。

[关键词] 高效液相色谱法;梯度洗脱联合波长切换;豨莶风湿丸;豨莶苷;奇壬醇;豨莶精醇;防己诺林碱;粉防己碱

[中图分类号] R 917.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)12-1564-04

Simultaneous determination of darutoside, kirenol, darutigenol, fangchinoline and d-tetraandrine in Xixian Fengshi Wan by joint wavelength switching HPLC gradient elution method

WEI Kun-xuan¹, LUO Jun^{1*}, LIU Guo-ping¹, XU Jia-jia²

1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

2. School of Pharmaceutical Science, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

[Abstract] **Objective** To establish a joint wavelength switching HPLC gradient elution method for simultaneous determination of darutoside, kirenol, darutigenol, fangchinoline and d-tetraandrine in *Xixian Fengshi Wan*. **Methods** A Kromasil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase A: acetonitrile-methano (2:1) and mobile phase B: 0.05% acetic acid solution with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min; the injection volume was 20 μL; darutoside, kirenol and darutigenol were detected at 215 nm, and fangchinoline and d-tetraandrine were detected at 280 nm. **Results** In the given concentration range, the linearity ranges of darutoside, kirenol, darutigenol, fangchinoline and d-tetraandrine were 6.45-129.00 μg/mL ($r=0.9995$), 5.61-112.20 μg/mL ($r=0.9999$), 4.25-85.00 μg/mL ($r=0.9993$), 9.19-183.80 μg/mL ($r=0.9998$), and 11.05-221.00 μg/mL ($r=0.9997$), respectively; and their average recoveries and RSD were 98.73% (1.43%), 97.63% (1.28%), 99.44% (1.29%), 98.33% (1.38%), and 97.36% (1.37%), respectively. **Conclusion** The established joint wavelength switching HPLC gradient elution method is simple, accurate and reproducible; it can simultaneously determine the contents of darutoside, kirenol, darutigenol, fangchinoline and d-tetraandrine in *Xixian Fengshi Wan* and can be used for quality control of *Xixian Fengshi Wan*.

[Key words] high performance liquid chromatography; gradient elution joint wavelength switching; *Xixian Fengshi Wan*; darutoside; kirenol; darutigenol; fangchinoline; tetrandrine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(12): 1564-1567]

[收稿日期] 2016-05-25 **[接受日期]** 2016-07-12

[作者简介] 韦坤璇, 硕士, 主管药师. E-mail: 54322613@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0771-5356914, E-mail: luojun6083982@163.com

豨莶风湿丸为小蜜丸,是一种复方制剂,由豨莶草、防己、威灵仙、桑枝、桑寄生、槐枝 6 味药材组成,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》(第十二册)^[1],具有祛风除湿、通络止痛的功效,可用于四肢麻痹、腰膝无力、骨节疼痛及风湿性关节炎等症状的治疗。豨莶草祛风湿、利关节、解毒,为方中君药;防己利水消肿、祛风止痛,为方中臣药。该制剂现行的质量标准仅对豨莶风湿丸的性状及丸剂通则项下作了规定^[2],标准相对简单,不能较全面控制药品质量。本研究采用梯度洗脱联合波长切换 HPLC 法,同时对制剂中豨莶草药材所含豨莶苷、奇壬醇和豨莶精醇以及防己药材中所含防己诺林碱和粉防己碱进行测定,为豨莶风湿丸的质量控制提供参考依据。

1 仪器和试剂

Ultimate3000 型高效液相色谱仪,配备 Empower Pro 色谱工作站以及 G1315B 可变波长检测器;AUW220D 电子分析天平(日本岛津公司生产)。

乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,冰醋酸为分析纯;豨莶苷对照品(59219-65-7,纯度:98.0%)、奇壬醇对照品(52659-56-0,纯度:98.0%;密封避光保存,2~8℃)、豨莶精醇对照品(20283-92-5,纯度:98.0%)均购于南京森贝伽生物科技有限公司;粉防己碱对照品(518-34-3,纯度:98.0%)购于上海纯优生物科技有限公司;防己诺林碱对照品(批号:110793-200605,用前置五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 h)购于中国药品生物制品检定所;豨莶风湿丸 3 批样品(规格:每 10 粒质量为 1 g,批号:1403002U、1405012U、1503003U)购于华润三九(黄石)药业有限公司。

2 方法和结果

2.1 色谱条件与系统适用性实验 色谱柱:Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);以流动相 A:乙腈-甲醇(体积比 2:1)、流动相 B:0.05%冰醋酸溶液进行梯度洗脱(0~15 min,19.0%A;15~31 min,19.0%A→35.0%A;31~47 min,35.0%A→68.0%A;47~56 min,68.0%A→19.0%A);流速为 1.0 mL/min;进样量为 20 μL;检测波长(0~31 min λ₁=215 nm^[3],31~56 min λ₂=280 nm^[4])。理论塔板数均不低于 2 500,此系

统条件下各组分分离效果良好。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱 5 个对照品,分别置 20 mL 容量瓶中,用 80%乙醇溶液溶解并稀释至刻度,制成含豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱质量浓度分别为 0.645、0.561、0.425、0.919、1.105 mg/mL 的对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液 1.0、5.0、1.0、5.0、6.0 mL,置 50 mL 容量瓶中,用 80%乙醇溶液稀释至刻度,制成这 5 个组分的质量浓度分别为 0.012 9、0.056 1、0.008 5、0.091 9、0.132 6 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取豨莶风湿丸适量,剪碎,过一号筛,取约 6.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80%乙醇溶液 50 mL,密塞,称定总质量,加热回流 1 h,冷却后用 80%乙醇溶液补足减失的质量,摇匀后滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备 按照豨莶风湿丸质量标准^[1]中规定的药味比例,以相同工艺分别制备豨莶草空白样品和防己空白样品。按照 2.3 项下的方法,制成豨莶草阴性对照溶液和防己阴性对照溶液。

2.5 专属性实验 分别精密吸取豨莶草阴性对照溶液和防己阴性对照溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录各进样溶液的色谱图。从记录的色谱图可以看出,在对照品色谱峰中豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱保留时间相对应的位置,供试品溶液相同保留时间有所测 5 个组分的对应的色谱峰,阴性对照溶液在相同保留时间则无,表明处方中其他药味对豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱同时测定无干扰。结果见图 1。

2.6 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下制备的对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,用 80%乙醇溶液稀释成对照品混合溶液。以峰面积 y 为纵坐标,各对照品质量浓度 x 为横坐标,建立线性方程,结果见表 1。

2.7 精密度实验 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,按 2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,计算豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱 5 个组分峰面积的相对标准偏差(RSD)值分别为 0.92%、1.06%、1.13%、0.87%、0.82%,表明精密度良好。

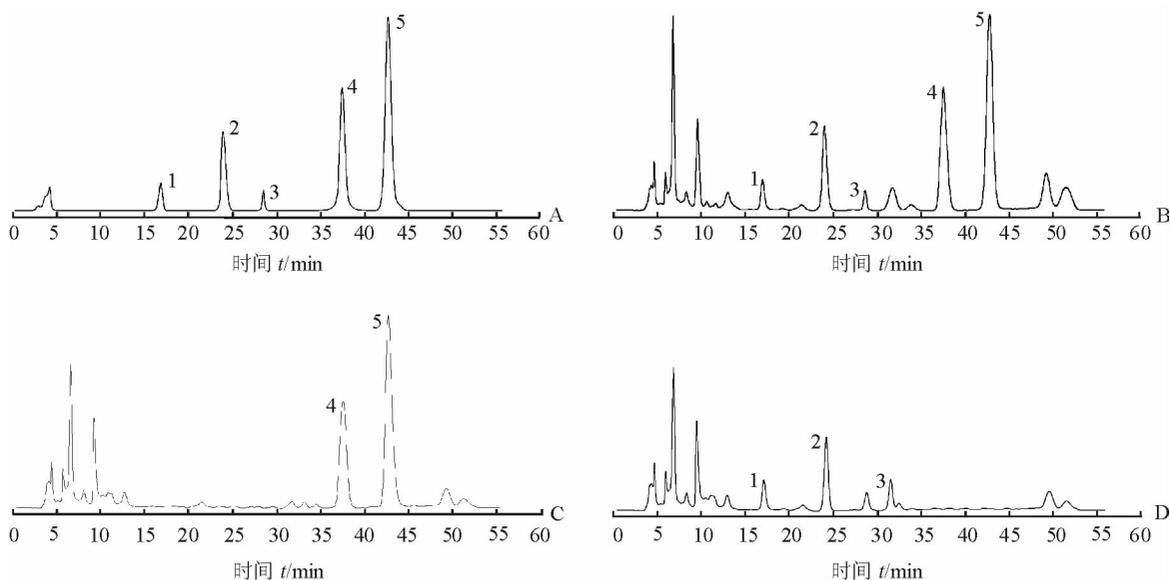


图1 对照品(A)、样品(B)、稀莪草阴性对照(C)、防己阴性对照(D)色谱图

1: 稀莪苷; 2: 奇壬醇; 3: 稀莪精醇; 4: 防己诺林碱; 5: 粉防己碱

表1 线性关系实验结果

所测组分	回归方程	线性范围 $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	r 值
稀莪苷	$y=6.3472 \times 10^3 x - 309.5$	6.45~129.00	0.9995
奇壬醇	$y=8.6174 \times 10^5 x - 254.9$	5.61~112.20	0.9999
稀莪精醇	$y=7.4359 \times 10^3 x + 360.1$	4.25~85.00	0.9993
防己诺林碱	$y=1.1053 \times 10^6 x - 186.6$	9.19~183.80	0.9998
粉防己碱	$y=1.5247 \times 10^6 x + 253.3$	11.05~221.00	0.9997

2.8 稳定性实验 取批号为 1403002U 稀莪风湿丸的供试品溶液各 20 μL , 分别于 0、4、8、12、24 h 进样依法测定, 稀莪苷、奇壬醇、稀莪精醇、防己诺林碱和粉防己碱含量的 RSD 值分别为 1.05%、1.14%、1.37%、0.96%、0.94%, 结果显示本品供试品溶液在 24 h 内是稳定的。

2.9 重复性实验 取批号为 1403002U 的稀莪风湿丸, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份, 依法测定并记录稀莪苷、奇壬醇、稀莪精醇、防己诺林碱和粉防己碱 5 个组分的峰面积, 计算 RSD 值分别为 1.01%、0.99%、1.14%、0.95%、0.84%。

2.10 加样回收率实验 取批号为 1403002U 的稀莪风湿丸 6 份, 剪碎, 过一号筛, 取约 3.0 g, 精密称定,

置于具塞锥形瓶中, 精密加入混合对照品溶液 25 mL、80%乙醇溶液 25 mL, 按 2.3 项下操作补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 制得加样供试品溶液。按上述色谱条件进行测定, 记录色谱图, 计算各组分回收率。5 个组分的平均加样回收率和 RSD 值 ($n=6$) 分别为 98.73% (1.43%)、97.63% (1.28%)、99.44% (1.29%)、98.33% (1.38%)、97.36% (1.37%)。

2.11 样品测定 取批号为 1403002U、1405012U、1503003U 的稀莪风湿丸, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 依法进样测定, 并计算样品中稀莪苷、奇壬醇、稀莪精醇、防己诺林碱和粉防己碱的含量。结果见表 2。

表2 样品含量测定结果

$w_B/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}), n=3, \bar{x} \pm s$

批号	稀莪苷	奇壬醇	稀莪精醇	防己诺林碱	粉防己碱
1403002U	0.116±0.002	0.477±0.005	0.065±0.001	0.751±0.009	1.034±0.009
1405012U	0.109±0.001	0.465±0.006	0.072±0.001	0.763±0.012	1.046±0.007
1503003U	0.122±0.001	0.481±0.002	0.062±0.001	0.745±0.007	1.028±0.004

3 讨论

3.1 提取溶剂及时间的考察 本研究分别对提取溶剂(甲醇、50%乙醇溶液、80%乙醇溶液)、超声提取时间(30、60、90 min)和加热回流提取时间(30、60、90 min)进行考察比较,以所测各成分豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱的提取率为指标,结果显示加热回流提取优于超声提取,同时80%乙醇溶液加热回流 60 min 时各成分的提取率最高,故最终选取 80%乙醇溶液加热回流 60 min 作为供试品溶液的制备方法。

3.2 流动相的选择 分别对不同的流动相体系(乙腈-0.5%甲酸溶液体系^[5]、乙腈-0.2%二乙胺溶液体系^[6]、乙腈-0.3%甲酸溶液体系^[7]、甲醇-0.1%二乙胺溶液体系^[8]、乙腈-甲醇与 0.05%冰醋酸溶液体系)进行了考察,以所测各成分的分​​离效果为指标来确定优化最佳的流动相体系。结果以乙腈-0.2%二乙胺溶液、甲醇-0.1%二乙胺溶液体系为流动相时,防己诺林碱和粉防己碱能达到有效分离,但豨莶精醇拖尾现象严重,达不到基线分离;以乙腈-0.5%甲酸溶液、乙腈-0.3%甲酸溶液体系为流动相时,豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇分离效果较好,但防己诺林碱和粉防己碱达不到分离效果;以乙腈-甲醇与 0.05%冰醋酸溶液为流动相按照 2.1 项下梯度洗脱比例进行分析时,所测 5 个成分不但有较好的峰形而且能完全分离,故选取乙腈-甲醇与 0.05%冰醋酸溶液流动相体系。

3.3 检测波长的选择 考察豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱在不同波长下的紫外吸收,豨莶苷、奇壬醇和豨莶精醇在 215 nm 处按文中流动相体系有较大吸收,防己诺林碱和粉防己碱在 280 nm 处按文中流动相体系有较大吸收,为提高

对 5 个成分检测的灵敏度和准确度,故将豨莶苷、奇壬醇和豨莶精醇的检测波长定为 215 nm,防己诺林碱和粉防己碱的检测波长定为 280 nm,按 2.1 项下时间进行波长切换处理,对豨莶苷、奇壬醇、豨莶精醇、防己诺林碱和粉防己碱进行同时测定,达到较好的效果。本研究为进一步完善豨莶风湿丸质量标准并确保该制剂产品质量提供了理论和数据支持。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第十二册. 北京:人民卫生出版社, 1997:201.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典四部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:11-13.
- [3] 闫东旭,王运君,段 琼,张晓梅,赵怀清. RP-HPLC 同时测定豨莶草中奇壬醇与豨莶精醇的含量[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45:945-948.
- [4] 黄泽春,王益群. 高效液相色谱法测定防己药材中粉防己碱与防己诺林碱的含量[J]. 中南药学, 2008, 6:541-543.
- [5] 叶小霞,宋佳新,季 彬,姜 珍,郭兴杰. HPLC-RID 法测定腺梗豨莶药材中奇壬醇等 5 种化合物的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31:36-40.
- [6] 巩 伟,赵庆华. 高效液相色谱法测定十味风消胶囊中粉防己碱和防己诺林碱的含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2013, 13:631-632.
- [7] 季 彬,宋佳新,赵允凤,姜 珍,叶小霞,郭兴杰. HPLC-RID 法测定腺梗豨莶药材中豨莶精醇等 4 种化合物的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31:379-382.
- [8] 江 俊,乔 明,刘超英. 中药防己中汉防己甲素的高效液相色谱法定量分析[J]. 中国医院药学杂志, 1995, 15:406-407.

[本文编辑] 尹 茶