

HPLC 同时测定川芎清脑颗粒中 8 种成分

吴芸, 叶慧, 陈骁鹏(泰州市药品检验院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 目的 建立同时测定川芎清脑颗粒中绿原酸、阿魏酸、升麻素苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、蛇床子素的 HPLC 方法。方法 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为甲醇-0.05%的磷酸溶液, 梯度洗脱, 检测波长分别为 330 nm(绿原酸、阿魏酸、蛇床子素), 280 nm(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素), 254 nm(升麻素苷)。结果 绿原酸、阿魏酸、升麻素苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、蛇床子素的线性范围分别为 4.97~37.29, 5.29~39.68, 2.54~19.08, 35.46~265.94, 25.65~192.37, 2.40~18.02, 1.66~12.47, 2.64~19.80 μg·mL⁻¹; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2%; 平均回收率(n=6)均>90%。结论 该方法精确可信、操作简便快捷, 可用于川芎清脑颗粒中各成分同时测定。

关键词: 川芎清脑颗粒; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)06-0721-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.015

引用本文: 吴芸, 叶慧, 陈骁鹏. HPLC 同时测定川芎清脑颗粒中 8 种成分[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 721-725.

Simultaneous Determination of 8 Components in Chuanxiong Qingnao Granules by HPLC

WU Yun, YE Hui, CHEN Xiaopeng(Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 225300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, ferulic acid, prim-*O*-glucosylcimifugin, baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and osthole in Chuanxiong Qingnao granules. **METHODS** The column was Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) with mobile phase of methanol-0.05% phosphoric acid(gradient elution), the detection wavelength was 330 nm(for chlorogenic acid, ferulic acid, osthole), 280 nm(for baicali, wogonoside, baicalein, wogonin) and 254 nm(for prim-*O*-glucosylcimifugin). **RESULTS** The linear range was 4.97–37.29 μg·mL⁻¹ for chlorogenic acid, 5.29–39.68 μg·mL⁻¹ for ferulic acid, 2.54–19.08 μg·mL⁻¹ for prim-*O*-glucosylcimifugin, 35.46–265.94 μg·mL⁻¹ for baicalin, 25.65–192.37 μg·mL⁻¹ for wogonoside, 2.40–18.02 μg·mL⁻¹ for baicalein, 1.66–12.47 μg·mL⁻¹ for wogonin, 2.64–19.80 μg·mL⁻¹ for osthole, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were < 2.0%; The average recovery in sample(n=6) was > 90%. **CONCLUSION** The method is accurate, reliable, simple and fast, and can be used for simultaneous determination of multiple components in Chuanxiong Qingnao granules.

KEYWORDS: Chuanxiong Qingnao granules; determination of content; HPLC

川芎清脑颗粒是在中医理论指导下研制的中成药, 具有祛风胜湿、活血止痛的功效^[1], 对因风湿蒙蔽、瘀血阻滞引起的偏头痛有良好的治疗效果^[2]。本品主要由川芎、当归、防风、菊花、黄芩等药材组成, 其中川芎为君药, 可活血行气、祛风止痛, 防风、当归、白芷可协同川芎加强活血止痛的疗效^[3], 羌活、细辛、菊花也可祛风通络, 此外配伍使用麦冬滋阴生津, 防止温燥之邪伤阴^[4]。根据现代药理学研究, 川芎清脑颗粒还能够降低血液黏稠度, 抑制血管收缩, 减少血小板黏附率, 同时可以改善脑部血液障碍循环和缺血缺氧状态, 保护脑组织细胞不受到氧化损伤, 从而达到治疗偏头痛的作用^[5-7]。当前国家药品监督管理局颁布的国家药品标准对川芎清脑颗粒的含量

测定仅限于川芎、羌活、当归中阿魏酸的含量及黄芩中黄芩苷的含量, 未能对药品质量进行全方面检测^[8]。本研究从处方中含量测定方面对川芎清脑颗粒质量控制进行探究, 从而建立 HPLC 测定川芎清脑颗粒中多种有效成分的方法, 控制药品质量, 保证药品疗效。

1 仪器与试剂

Waters Acquity Arc 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, 配有 Empower[®]3 工作站, 四元梯度泵, 在线脱气系统, 2998 PDA 检测器); 8200 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水处理系统(美国 MILLIPORE 公司); 十万分之一 XS105DU 型电子天平(Mettler 公司)。

作者简介: 吴芸, 女, 硕士, 副主任中药师 Tel: 18168555287

E-mail: 502220641@qq.com

对照品绿原酸(批号: 110753-201817; 纯度: 96.8%)、阿魏酸(批号: 110773-201614; 纯度: 99.0%)、升麻素苷(批号: 111522-200406; 纯度: 100%)、黄芩苷(批号: 110715-201821; 纯度: 95.4%)、汉黄芩苷(批号: 112002-201702; 纯度: 98.5%)、黄芩素(批号: 111595-201306; 纯度: 97.8%)、汉黄芩素(批号: 111514-201706; 纯度: 100%)、蛇床子素(批号: 110822-201710; 纯度: 99.5%)均购自中国食品药品检定研究院;川芎清脑颗粒(江苏济川制药有限公司, 批号: 1803104, 1804122, 1803103, 1803099, 1804112; 规格: 每袋 10 g); 甲醇(色谱纯, Merck 公司), 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 柱温 30 °C, 流速

1.0 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 以甲醇(A)和 0.05%磷酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~10 min, 5%→35%A; 10~35 min, 35%→42%A; 35~60 min, 42%→55%A; 60~70 min, 55%→70%A; 70~80 min, 70%→95%A)。检测波长为 330 nm(绿原酸、阿魏酸、蛇床子素); 280 nm(黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素); 254 nm(升麻素苷)。按上述条件进行测定, 结果显示该色谱条件下, 各组峰分离效果较好, 待测组分分离度均>1.5, 理论板数以黄芩苷计≥5 000, 对照品及样品色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品绿原酸、阿魏酸、升麻素苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、蛇床子素适量, 加甲醇定容, 配制得每 1 mL 分别含绿原酸 124.29 μg、阿魏酸 132.26 μg、升麻素苷 63.60 μg、黄芩苷 886.46 μg、汉黄芩苷 641.24 μg、黄芩素 60.05 μg、汉黄芩素 41.56 μg、蛇床子素

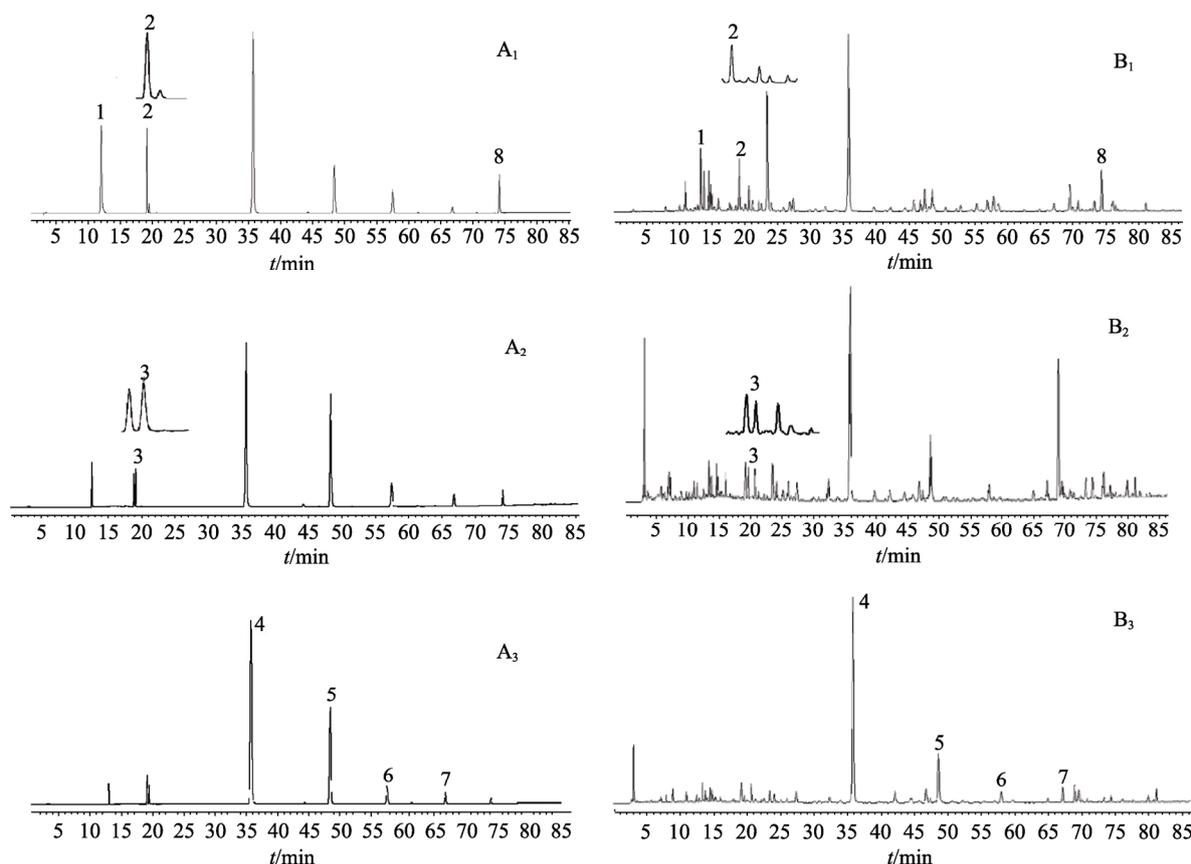


图 1 高效液相色谱图

A₁, A₂, A₃—330, 254, 280 nm 对照品图谱; B₁, B₂, B₃—330, 254, 280 nm 供试品溶液图谱; 1—绿原酸; 2—阿魏酸; 3—升麻素苷; 4—黄芩苷; 5—汉黄芩苷; 6—黄芩素; 7—汉黄芩素; 8—蛇床子素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A₁, A₂, A₃—chromatograms of reference substances at 330, 254, 280 nm; B₁, B₂, B₃—chromatograms of samples at 330, 254, 280 nm; 1—chlorogenic acid; 2—ferulic acid; 3—prim-*O*-glucosylcimifugin; 4—baicalin; 5—wogonoside; 6—baicalein; 7—wogonin; 8—osthole.

65.99 μg 的对照品混合溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品, 研细, 混匀, 取约 1 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密量取 80% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 33 kHz)30 min, 放冷, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 7.5 mL 至 25 mL 量瓶中, 稀释至刻度。按“2.1”项色谱条件下进行峰面积的测定, 进样 5 μL 以峰面积(Y)为纵坐标, 样品浓度(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 进行线性回归, 得各待测成分的回归方程, 结果见表 1。各成分在其线性范围内线性关系良好。

表 1 8 种成分线性方程、相关系数和线性范围

Tab. 1 Regression equations, coefficient correlation and linear ranges of eight components

成分	线性方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	r
绿原酸	$Y=32\ 936.20X-5\ 632.06$	4.97~37.29	0.999 9
阿魏酸	$Y=55\ 966.39X-16\ 794.16$	5.29~39.68	0.999 9
升麻素苷	$Y=6\ 142.74X-1\ 255.72$	2.54~19.08	1
黄芩苷	$Y=35\ 316.63X-3\ 359.53$	35.46~265.94	0.999 8
汉黄芩苷	$Y=38\ 814.98X-136\ 939.16$	25.65~192.37	0.999 9
黄芩素	$Y=55\ 553.05X-25\ 159.74$	2.40~18.02	1
汉黄芩素	$Y=53\ 190.80X-14\ 542.45$	1.66~12.47	0.999 9
蛇床子素	$Y=65\ 942.01X-12\ 613.09$	2.64~19.80	0.999 7

2.4.2 仪器精密度考察 精密吸取对照品混合溶液 5 μL , 连续进样 6 次, 计算各待测成分峰面积, 结果显示在“2.1”项色谱条件下, 各组分峰面积的 RSD 分别为 0.63%, 0.58%, 0.70%, 0.67%, 0.97%, 0.21%, 0.80%, 0.63%, 均 $<2\%$, 说明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 取“2.3”项下制备的供试品溶液, 分别于 0, 2, 8, 12, 24, 48 h 进样, 记录峰面积, 结果显示绿原酸、阿魏酸、升麻素苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、蛇床子素峰面积的 RSD 分别为 0.70%, 1.25%, 1.16%, 1.43%, 0.73%, 1.47%, 0.70%, 1.15%, 说明供试品溶液在 48 h 内较为稳定。

2.4.4 重复性考察 取 6 份批号为 1803104 的样品, 每份约 1 g, 分别按“2.3”项下方法制备供试

品溶液, 精密吸取 5 μL , 进样分析, 结果该样品中绿原酸、阿魏酸、升麻素苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、蛇床子素的平均含量分别为 0.22, 0.23, 0.32, 4.50, 1.10, 0.14, 0.21, 0.19 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.33%, 1.64%, 1.54%, 1.51%, 0.52%, 1.89%, 1.35%, 1.14%。说明方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率考察 取已知含量的同一批次样品, 研细, 平行 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别加入对照品混合溶液 5 mL(其中绿原酸、阿魏酸、升麻素苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、蛇床子素的浓度分别为 22.37, 23.81, 33.07, 460.97, 112.84, 360.49, 530.00, 497.40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 另加入 80% 甲醇溶液 20 mL, 按“2.3”项下方法制备加样供试品溶液。进样 5 μL , 测定峰面积, 计算平均加样回收率, 结果见表 2。

2.5 样品的测定

取不同批次的川芎清脑颗粒, 按“2.3”项下方法进行供试品溶液的制备, 每批平行 3 份, 进样分析, 分别计算 5 批样品中 8 个成分的平均含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

3.1.1 检测波长的选择 川芎清脑颗粒药物组成较多, 成分多而复杂, 待测成分最大吸收波长各不相同, 本实验采用 190~400 nm 全波长扫描分析, 结果显示有机酸类最大吸收为 330 nm 附近, 黄酮类为 280 nm, 而升麻素苷最大吸收为 254 nm, 在其他 2 种波长下吸收值均较低, 因此选用 330, 280, 254 nm 作为检测波长, 以保证各成分的检测灵敏度高, 干扰小。

3.1.2 流动相的选择 本实验分别考察了甲醇-水、甲醇-0.05% 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸等流动相系统, 发现甲醇-0.05% 磷酸和乙腈-0.05% 磷酸作为流动相时样品的峰形较好, 待测成分和杂质的分离度较高, 从经济和环保的方面考虑, 本实验选用甲醇-0.05% 的磷酸作为流动相, 采用梯度洗脱, 建立了 8 种成分的含量测定方法。

3.2 样品前处理的考察

3.2.1 提取溶剂的选择 本试验分别用 80% 甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇作为提取溶剂, 样品超声

表 2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 2 Recovery test results(n=6)

成分	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	113.30	111.85	221.51	96.75	94.37	1.8
	113.72	111.85	220.48	95.45		
	111.79	111.85	216.51	93.63		
	112.86	111.85	219.44	95.29		
	113.50	111.85	216.68	92.25		
	111.37	111.85	215.25	92.87		
阿魏酸	118.94	119.05	233.29	96.05	92.96	1.9
	119.38	119.05	228.27	91.47		
	117.36	119.05	228.15	93.06		
	118.48	119.05	227.66	91.71		
	119.15	119.05	228.51	91.86		
	116.92	119.05	228.38	93.62		
升麻 素苷	166.07	165.35	323.58	95.26	92.54	1.7
	166.68	165.35	317.90	91.45		
	163.85	165.35	318.00	93.23		
	165.42	165.35	315.85	90.98		
	166.36	165.35	319.87	92.84		
	163.24	165.35	314.51	91.48		
黄芩苷	2 348.50	2 304.60	4 538.17	95.01	92.14	1.8
	2 356.88	2 304.60	4 468.25	91.61		
	2 316.89	2 304.86	4 395.09	90.17		
	2 339.16	2 304.86	4 474.80	92.66		
	2 352.34	2 304.86	4 452.86	91.13		
	2 308.25	2 304.86	4 433.72	92.22		
汉黄 芩苷	576.94	564.20	1 096.66	92.12	91.72	1.3
	579.06	564.20	1 104.12	93.06		
	569.23	564.20	1 076.35	89.88		
	574.70	564.20	1 086.14	90.65		
	577.94	564.20	1 098.33	92.24		
	567.11	564.20	1 088.10	92.34		
黄芩素	73.83	72.10	141.98	94.52	92.53	1.9
	74.10	72.10	142.13	94.36		
	72.85	72.10	139.76	92.80		
	73.55	72.10	139.31	91.21		
	73.96	72.10	138.89	90.06		
	72.57	72.10	139.14	92.33		
汉黄 芩素	107.11	106.00	205.82	93.12	92.82	1.2
	107.50	106.00	207.68	94.57		
	105.68	106.00	204.44	93.17		
	106.69	106.00	203.89	91.77		
	107.29	106.00	204.37	91.58		
	105.28	106.00	203.68	92.83		
蛇床 子素	97.14	99.48	196.20	99.58	97.25	1.4
	97.50	99.48	193.33	96.33		
	95.85	99.48	191.55	96.20		
	96.77	99.48	192.85	96.58		
	97.31	99.48	194.79	97.99		
	95.49	99.48	191.79	96.80		

30 min 后进行含量测定, 由于标准是以阿魏酸与黄芩苷为主, 其权重系数最高, 分别为 0.2 与 0.2, 其余成分为 0.1, 由权重计算公式可得, 待测成分

经 80%甲醇提取后, 测得有效成分的含量最高, 综合考虑提取效果与成本, 最后决定以 80%甲醇作为提取溶剂, 结果见表 4。

表 3 5 批样品中 8 种成分含量测定结果(n=3)

Tab. 3 Determination results of contents of eight components in five samples(n=3)

批号	绿原酸	阿魏酸	升麻 素苷	黄芩苷	汉黄 芩苷	黄芩素	汉黄 芩素	蛇床 子素
1803104	0.23	0.23	0.32	4.54	1.12	0.14	0.21	0.19
1804122	0.22	0.23	0.34	4.48	1.15	0.13	0.23	0.20
1803103	0.19	0.20	0.31	4.48	1.20	0.14	0.22	0.19
1803099	0.21	0.21	0.32	4.44	1.09	0.15	0.23	0.17
1804112	0.18	0.19	0.33	4.36	1.10	0.11	0.19	0.18

表 4 不同提取溶剂中各成分含量

Tab. 4 Determination results of eight components in different solvent extractions

甲醇 含量	绿原酸	阿魏酸	升麻 素苷	黄芩苷	汉黄 芩苷	黄芩素	汉黄 芩素	蛇床 子素	加权后 含量
80%	0.23	0.23	0.32	4.54	1.12	0.14	0.21	0.19	1.20
80%	0.20	0.23	0.33	4.51	1.21	0.11	0.19	0.20	1.19
80%	0.19	0.22	0.31	4.49	1.22	0.14	0.23	0.19	1.19
70%	0.26	0.21	0.42	4.02	1.19	0.12	0.17	0.15	1.09
70%	0.25	0.19	0.43	4.12	1.11	0.11	0.19	0.13	1.10
70%	0.22	0.20	0.40	4.18	1.09	0.09	0.16	0.13	1.10
50%	0.38	0.14	0.35	3.72	0.95	0.10	0.12	0.09	0.98
50%	0.35	0.12	0.32	3.81	0.87	0.09	0.15	0.11	0.99
50%	0.36	0.15	0.38	3.82	0.88	0.12	0.16	0.09	1.01

3.2.2 提取方法的选择 本实验分别考察了超声提取、水浴回流法对样品含量的影响, 结果发现经过水浴回流, 所测得的绿原酸含量较低, 考虑绿原酸的不稳定性, 本实验采用超声处理, 提高了提取效率, 且具有较好的重现性。

3.2.3 提取时间的选择 通过考察超声 10, 20, 30, 40 min 等不同时间下各成分的含量, 发现 30 min 提取效率明显高于 10, 20 min, 但与 40 min 无明显差异, 因此采用 80%甲醇超声 30 min 能经济有效地提取其有效成分。

4 小结

在中成药的质量控制方面, 近年来国内已经取得了较大的进展, 然而单一指标不足以全面评价药物质量^[9]。因此, 需要制定多成分、多指标的含量标准, 从各方面控制产品质量, 使其治疗效果可靠、稳定。本实验采用 HPLC 同时测定川芎清脑颗粒中 8 种指标性成分的含量, 提供了可靠

准确的定量分析方法，可用于川芎清脑颗粒的质量控制。

REFERENCES

- [1] 邹春盛, 刘慧英. 川芎清脑颗粒治疗偏头痛的临床疗效观察[J]. 中国疼痛医学杂志, 2014, 20(5): 365-366, 368.
- [2] LI M Q, AI C L, ZHANG J W, et al. Clinical observation of Chuanxiong Qingnao granules in treatment of migraine[J]. World Chin Med(世界中医药), 2017, 12(1): 71-75.
- [3] 王萍. 川芎清脑颗粒治疗偏头痛(风湿蒙蔽, 瘀血阻滞证)多中心临床观察及疗效分析[D]. 长春: 长春中医药大学, 2016.
- [4] 周鸿, 黄含含, 张静泽, 等. 川芎-当归药对研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(1): 184-188.
- [5] 黄检平, 赵淑珍. 川芎在治疗头痛中成药中的组方应用分析[J]. 当代医学, 2018, 24(7): 93-95.
- [6] 高建春. 川芎清脑颗粒联合盐酸氟桂利嗪治疗偏头痛的疗效及对血液流变学的影响[J]. 中国医药指南, 2013, 11(19): 668-668, 669.
- [7] 高云涛. 川芎清脑颗粒对偏头痛患者血液流变学及疗效的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2015, 18(5): 117-118.
- [8] 国家药品监督管理局. 国家药品标准 YBZ07602004-2009Z, 川芎清脑颗粒[S]. 2010.
- [9] LIN J Y, YI Y K, C A, et al. Study and analysis on multitude index quality control system of traditional Chinese medicine [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2013, 40(8): 1674-1676.

收稿日期: 2020-03-11
(本文责编: 李艳芳)