

HPLC 法同时测定复方金思维中 3 种有效成分的含量

张晴 杜守颖 白洁 陆洋 郑梦成 李鹏跃 武慧超

【摘要】 目的 建立复方金思维中松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量测定方法。**方法** 采用高效液相色谱法对制剂中的松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖进行定量测定。**结果** 松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖分别在 2.5 ~ 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.3 ~ 25.9 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 ~ 40.7 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好,3 种成分样品回收率分别为 101.37%、99.86% 和 98.44%,RSD 均在 3.00% 以内。**结论** 所建立的方法简便,重复性良好,可用于金思维复方中松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量测定。

【关键词】 复方金思维; 高效液相色谱法; 含量测定

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.10.008

Simultaneous determination of three active components in compound JSW prescription by HPLC

ZHANG Qing, DU Shou-ying, BAI Jie, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: DU Shou-ying, E-mail: dushouying@263.net

【Abstract】 Objective To establish a method for determination of 3 effective components in Compound JSW prescription. **Methods** The contents of Echinacoside, Acteoside, 3,6'-Disinapoyl sucrose in Compound JSW prescription were determined by HPLC. **Results** Echinacoside, acteoside, 3,6'-Disinapoyl sucrose showed good linear correlation within 2.5 ~ 50.0 $\mu\text{g/mL}$, 1.3 ~ 25.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 2.0 ~ 40.7 $\mu\text{g/mL}$ ($r \geq 0.9999$), respectively. The average recoveries were within 101.37%, 99.86% and 98.44%, respectively. And RSD were less than 3.00%. **Conclusion** The quantitative method for determining the components of Compound JSW prescription is simple, feasible and repeatable.

【Key words】 Compound JSW prescription; HPLC; Content determination

复方金思维是由肉苁蓉、熟地黄、远志、茯苓等药物组合而成,具有补气益肾、化痰活血之功效,可用于老年性痴呆的治疗^[1-4]。肉苁蓉、熟地黄和远志为方中主要药物,为保证临床疗效,本实验采用高效液相色谱法对肉苁蓉和熟地黄中松果菊苷和毛蕊花糖苷、远志中 3,6'-二芥子酰基蔗糖进行定量测定,以控制本品的内在质量,此方法测定结果准

确灵敏、简便可靠。

1 材料

1.1 药品与试剂

乙腈(迈瑞达,色谱纯),磷酸(迈瑞达,色谱纯),娃哈哈纯净水,其他试剂为分析纯;松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品(均为中国食品药品检定研究院,批号分别为 111670-201505、111530-201310、111848-201303);肉苁蓉、熟地黄、远志等饮片(北京本草方源药业有限公司);金思维为实验室自制(肉苁蓉 16 g、熟地黄 16 g、远志 12 g、茯苓 6 g、人参 3 g、石菖蒲 6 g 等,加水煎煮 2 次,滤液浓缩至近干,50℃ 减压干燥,干膏粉碎,混匀)。

基金项目: 国家科技重大专项(2014ZX09301306-009);北京市科技新星计划(xx2015A048)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[张晴(硕士研究生)、杜守颖、白洁、陆洋、郑梦成、李鹏跃、武慧超]

作者简介: 张晴(1991-),女,2015 级在读硕士研究生。研究方向: 中药新剂型与新技术研究。E-mail: zhangqing811@163.com

通讯作者: 杜守颖(1960-),女,博士,教授,博士生导师。研究方向: 中药新剂型与制剂关键技术研究。E-mail: dushouying@263.net

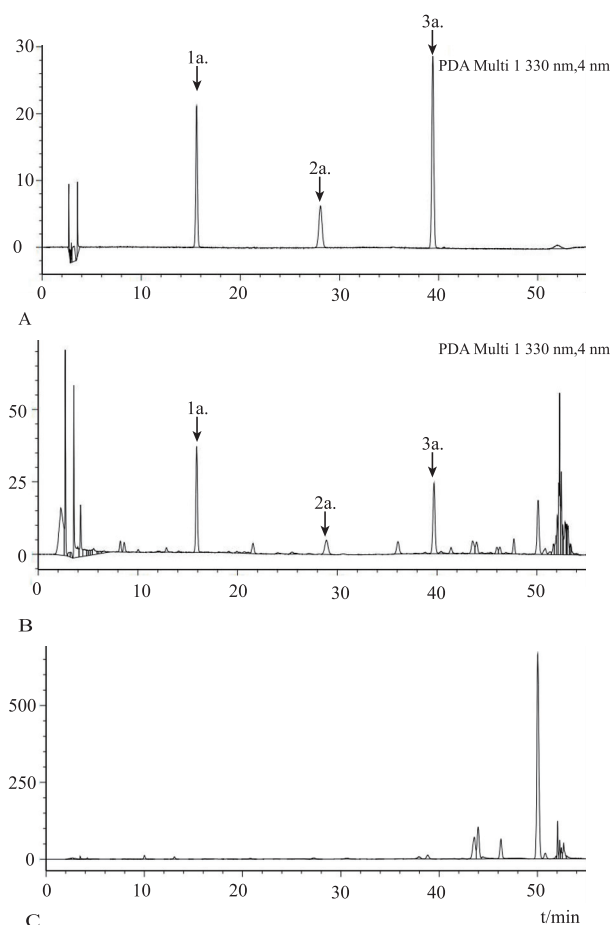
1.2 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司, SPD-M20A, PDA 检测器, LC Solution 色谱工作站); CX-100 型超声波清洗器(北京医疗设备厂); 电热恒温水浴箱(北京医疗设备厂); 赛多利斯 BT 25S 型电子分析天平(北京赛多利斯公司); 赛多利斯 BSA 224S 型电子分析天平(北京赛多利斯公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm), 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~12 分钟, 87%~83% B; 12~25 分钟, 83% B; 25~45 分钟, 83%~73% B; 45~50 分钟, 73%~10% B; 50~55 分钟, 10% B); 柱温 30℃; 检测波长 330 nm; 流速 1.0 mL/min。对照品溶液及溶出供试品溶液的色谱图见图 1。



A. 对照品溶液; B. 溶出供试品溶液; C. 空白溶出液;

1. 松果菊苷 R₁; 2. 毛蕊花糖苷; 3. 3,6'-二芥子酰基蔗糖

图 1 对照品溶液、供试品溶液及阴性样品 HPLC 图

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品松果菊苷 25 mg、毛蕊花糖苷 12.5 mg、3,6'-二芥子酰基蔗糖 20 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取样约 0.1 g 置 10 mL 容量瓶中, 加入 50% 甲醇适量, 超声 15 分钟, 放冷, 定容至刻度, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取对照品储备液, 依次稀释得到 6 个不同浓度的对照品溶液, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 松果菊苷回归方程为 $Y = 12729X - 4090.2$, $r = 0.9999$; 毛蕊花糖苷回归方程为 $Y = 13842X - 2892.8$, $r = 0.9999$; 3,6'-二芥子酰基蔗糖回归方程为 $Y = 25091X + 821.1$, $r = 0.9999$ 。松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖分别在 2.5~50.0、1.3~25.9、2.0~40.7 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.4.2 精密度实验 精密吸取上述对照品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 结果松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖 6 次进样的峰面积积分值相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 分别为 0.79%、2.63%、0.51%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性实验 精密吸取上述供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、12、24 小时进样测定, 结果松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量的 RSD 分别为 0.49%、2.70%、0.74%, 表明样品在 24 小时内稳定。

2.4.4 重复性实验 取同一批样品, 平行制备 6 份供试品溶液, 测得峰面积并计算 3 种成分含量, 结果样品中松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖平均含量分别为 3.22 mg/g、0.77 mg/g、1.27 mg/g, RSD 分别为 0.8%、2.2%、1.1%, 表明本方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率 实验精密称取已知含量的同一批样品 0.05 g, 分别精密加入一定量的松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品, 按照“2.3”项下方法制备, 平行操作 6 份, 按上述条件进行分析测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果

成分	取样量 (mg)	样品中含量 (mg)	加入对照 品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
松果菊苷	51.3	0.17	0.16	0.32	100.12	101.37	0.93
	51.4	0.17	0.16	0.33	101.90		
	52.0	0.17	0.16	0.33	102.09		
	50.0	0.16	0.16	0.32	100.23		
	50.5	0.16	0.16	0.32	101.69		
	52.1	0.17	0.16	0.33	102.21		
	51.3	0.04	0.05	0.09	102.19		
毛蕊花糖苷	51.4	0.04	0.05	0.09	99.67	99.86	2.16
	52.0	0.04	0.05	0.08	96.99		
	50.0	0.04	0.05	0.09	102.58		
	50.5	0.04	0.05	0.08	98.53		
	52.1	0.04	0.05	0.09	99.20		
	51.3	0.07	0.08	0.14	98.46		
	51.4	0.07	0.08	0.14	97.96		
3,6'-二芥子酰基蔗糖	52.0	0.07	0.08	0.14	100.18	98.44	1.16
	50.0	0.06	0.08	0.14	96.67		
	50.5	0.06	0.08	0.14	98.61		
	52.1	0.07	0.08	0.14	98.74		

3 结果

分别取三批样品,每批样品按“2.3”项下方法平行制得 3 份供试品溶液,按照上述色谱条件进样测定,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	含量 (mg/g)			总量
	松果菊苷	毛蕊花糖苷	3,6'-二芥子酰基蔗糖	
20150801	3.24	0.76	1.28	5.28
20150803	3.21	0.80	1.25	5.26
20150805	3.18	0.76	1.27	5.21

4 讨论

4.1 测定成分的选择

肉苁蓉、熟地黄和远志为方中主要药物,肉苁蓉和熟地黄中主要成分为苯乙醇苷类化合物,其中松果菊苷、毛蕊花糖苷含量较高,具有保护脑部和神经组织、抗衰老、改善记忆力的作用^[5-6],是其药理作用的化学物质基础。3,6'-二芥子酰基蔗糖为远志中的指标性成分,具有抗抑郁、神经保护和改善记忆力等作用^[7-8]。故对复方金思维中此三个具有代表性的成分进行了含量测定方法的研究,以控制本品的内在质量,保证临床疗效。

4.2 流动相的选择

松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖

的测定曾使用 2015 版《中华人民共和国药典》(一部)肉苁蓉及熟地黄药材含量测定项下的甲醇-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%醋酸溶液作为流动相,但松果菊苷、毛蕊花糖苷结构中存在多个酚羟基,呈弱酸性,拖尾情况严重,考虑药典中流动相的酸性不够,且当流动相大比例变化时有基线漂移现象,故调整为乙腈-0.05%磷酸溶液作为流动相进行洗脱,结果所测定的三个成分分离度、对称因子均符合要求。

4.3 检测波长的选择

分别取松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品适量,加甲醇适量制成每 1 mL 含 0.10 mg 的溶液,在 200 ~ 400 nm 波长进行全波长扫描,结果三者对照品均在 330 nm 处有最大吸收,故选择 330 nm 作为检测波长^[9-12]。

4.4 供试品溶液的制备

提取方式的选择考虑到检验的便捷性,采用超声(100 kHz)提取进行试验。提取溶剂的选择参考 2015 版《中华人民共和国药典》(一部)肉苁蓉、熟地黄、远志药材含量测定,分别选用 50%、80% 和 100% 甲醇作为提取溶剂进行试验,结果表明三者没有显著性差异,故选择 50% 甲醇作为松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖的提取溶剂。提取时间分别采用 15 分钟、30 分钟和 45 分钟进行考察,结果显示 15 分钟松果菊苷、毛蕊花糖苷、3,6'-二芥子酰基

蔗糖就能完全溶出,因此最终选择加入 50% 甲醇超声(100 kHz)15 分钟作为供试品提取条件。

本研究采用超声法提取,样品处理方法简单,使用有机试剂量较小,且 HPLC 梯度洗脱可以同时分离 3 种成分,杂质峰无干扰,灵敏度高,结果可靠,该方法可以作为复方金思维的质量控制方法。

参 考 文 献

- [1] 石燕芳. 金思维提取物对 APP/PS1 转基因小鼠行为学改变及海马内 ChAT 及 AChE 表达的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2013.
- [2] 张雷明,田金洲,尹军祥,等. 金思维提取物对 APPV717I 转基因小鼠早期学习记忆和突触结构与功能的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(4):428-432.
- [3] 张雷明,田金洲,尹军祥,等. 中药复方金思维对 APPV717 I 转基因小鼠海马神经损伤的保护作用[J]. 中草药,2009,40(3):410-415.
- [4] 陈玉静,田金洲,王蓉,等. 金思维对散发性老年性痴呆模型大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(4):29-31.
- [5] 田枫,张阔,康爱君,等. 松果菊苷改善 SAM-P/8 小鼠学习记

忆能力作用机制初探[J]. 实验动物科学与管理,2006,23(2):14-15,21.

- [6] 马婧怡,张万鑫,陈虹,等. 松果菊苷对血管性痴呆大鼠氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2014,30(5):638-642.
- [7] 陈旭. 3,6'-二芥子酰基蔗糖促神经元再生和神经保护发挥抗抑郁作用的机制研究[D]. 太原:山西医科大学,2011.
- [8] 巴寅颖,姜艳艳,刘洋,等. 基于 3,6'-二芥子酰基蔗糖在记忆障碍模型大鼠体内表征的单体、远志及其经典方开心散药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):138-142.
- [9] 郭卫红. 不同产地肉苁蓉中麦角甾苷含量测定[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(5):496-497.
- [10] 庄珊珊,刘志宏,黄爱文,等. 高效液相色谱法测定甘草远志合剂中 4 种指标成分的含量[J]. 中南药学,2014,12(10):1005-1008.
- [11] 杨素德,胡军华,李家春,等. HPLC 法同时测定苁蓉总苷胶囊中松果菊苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2015,17(3):609-613.
- [12] 张岩. 高效液相色谱法测定宽肠理气汤中松果菊苷和毛蕊花糖苷[J]. 中草药,2010,41(12):1994-1995.

(收稿日期: 2016-03-01)

(本文编辑:董历华)