

HPLC-DVD 变波长法同时测定跌打止痛散中 6 种指标成分

高森¹, 白雪², 文柳静³, 李正翔¹, 房志仲^{4*}

1. 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052

2. 天士力控股集团研究院 中药开发中心, 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300402

3. 天津医科大学肿瘤医院药学部, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060

4. 天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

摘要: 目的 建立 HPLC-DVD 波长切换联合梯度洗脱法同时测定跌打止痛散 (DZS) 中 6 种指标成分羟基红花黄色素 A、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的量。方法 采用 HPLC-DVD 法, Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 乙腈-0.4% 甲酸水溶液为流动相, 体积流量 0.9 mL/min, 梯度洗脱; 羟基红花黄色素 A 的检测波长为 403 nm, 薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的检测波长为 203 nm; 进样量为 20 μL。结果 6 种指标成分羟基红花黄色素 A 在 3.46~69.20 μg/mL ($r=0.999\ 4$)、薯蓣皂苷在 9.52~190.40 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、原薯蓣皂苷在 8.74~174.80 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、甲基原薯蓣皂苷在 4.45~89.00 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、伪原薯蓣皂苷在 2.64~52.80 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、纤细薯蓣皂苷在 3.28~65.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$) 质量浓度与峰面积具有较好的线性关系; 精密度、重复性良好, RSD 均小于 2.0%; 供试品溶液在室温条件下 12 h 内稳定; 平均加样回收率和相应的 RSD 分别为 98.57%、1.59%; 97.64%、1.28%; 99.43%、1.07%; 97.98%、1.64%; 98.57%、1.16%; 97.17%、1.37%。结论 建立的 HPLC 波长切换联合梯度洗脱法同时测定 DZS 中的 6 种成分, 方法操作简便、快速、准确, 可作为 DZS 全面可靠的质量控制方法。

关键词: HPLC-DVD 变波长法; 跌打止痛散; 羟基红花黄色素 A; 薯蓣皂苷; 原薯蓣皂苷; 甲基原薯蓣皂苷; 伪原薯蓣皂苷; 纤细薯蓣皂苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2863-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.014

Determination of six kinds of index components in Dieda Zhitong San by HPLC-DVD variable wavelength method

GAO Sen¹, BAI Xue², WEN Liu-jing³, LI Zheng-xiang¹, FANG Zhi-zhong⁴

1. Department of Pharmacy, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. State Key Laboratory of Chinese Medicine Key Technology Innovation, Traditional Chinese Medicine Development Center, Tasly Holding Group Academy, Tianjin 300402, China

3. Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment, Cancer Hospital, State Cancer Clinical Medical Research Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

4. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-DVD wavelength switching combined with gradient elution method for the determination of the contents of hydroxysafflor yellow A, protodioscin, dioscin, methylprotodioscin, pseudoprotodioscin, and gracillin in Dieda Zhitong San (DZS) simultaneously. **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile (A)-0.4% formic acid solution (B) as mobile phase at the flow rate of 0.9 mL/min for gradient elution; Hydroxysafflor yellow A was detected at 403 nm; Protodioscin, dioscin, methylprotodioscin, pseudoprotodioscin, and gracillin were

收稿日期: 2016-03-13

作者简介: 高森 (1980—), 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事医院药学、药物质量控制和药物评价研究。

*通信作者 房志仲 (1959—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事药物制剂与质量控制研究。

Tel: 15822574995 E-mail: fangzhizhong4995@163.com

detected at 203 nm; Sample quantity was 20 μL . **Results** The six active components were well separated and showed good linearity, such as hydroxysafflor yellow A 3.46—69.20 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 4$), protodioscin 9.52—190.40 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 7$), dioscin 8.74—174.80 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 6$), methylprotodioscin 4.45—89.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 9$), pseudoprotodioscin 2.64—52.80 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 5$), and gracillin 3.28—65.60 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 8$). The precision and repeatability were good, and RSD values were less than 2.0%. The stability was good in 12 h. The average recoveries and the corresponding RSD values were 98.57% (1.59%), 97.64% (1.28%), 99.43% (1.07%), 97.98% (1.64%), 98.57% (1.16%), and 97.17% (1.37%), respectively. **Conclusion** An HPLC wavelength switching combined with gradient elution method has been successfully established for simultaneous determination of six components in DZS. The method is simple, quick, accurate, and helpful for the quality control of DZS.

Key words: HPLC-DVD wavelength method; Dieda Zhitong San; hydroxysafflor yellow A; protodioscin; dioscin; methylprotodioscin; pseudoprotodioscin; gracillin

跌打止痛散 (DZS) 的功效是散瘀止痛, 主要用于跌打损伤、瘀滞肿痛, 是由红花、穿山龙、大黄 (酒炒)、儿茶等 13 味中药材加工而成的复方制剂, 收载于卫生部颁药品标准《中药成方制剂》第七册^[1], 现行标准仅规定了性状、显微鉴别及散剂通则的检查项^[1-2], 未对该制剂处方中的任何药物所含成分进行定量测定, 现文献报道^[3]中仅有该品种中大黄素的定量测定, 但关于 DZS 中多指标成分同时定量测定方法的研究尚未见报道, 不能全面地控制本品的质量。红花具有活血通经、散瘀止痛的功效, 是治疗跌打损伤、瘀滞肿痛的首选药物, 为 DZS 中的君药; 穿山龙具有祛风除湿、舒筋通络、活血止痛、止咳平喘的功效, 用于跌扑损伤、风湿痹病、关节肿胀、疼痛麻木、闪腰岔气、咳嗽气喘等, 为 DZS 中的臣药。

本实验采用 HPLC-DVD 波长切换联合梯度洗脱法, 首次建立了 HPLC-DVD 同时测定 DZS 中羟基红花黄色素 A (红花)、薯蓣皂苷 (穿山龙)、原薯蓣皂苷 (穿山龙)、甲基原薯蓣皂苷 (穿山龙)、伪原薯蓣皂苷 (穿山龙) 和纤细薯蓣皂苷 (穿山龙) 6 种指标成分的测定方法, 实现了极性和紫外吸收特性相差较大成分的同时测定, 方法简便、快速, 避免了重复制备和测定样品, 且结果准确、重现性好, 可用于羟基红花黄色素 A、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷 6 种指标成分的同时测定, 为提高 DZS 质量标准提供有效依据。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; DAD 检测器, 安捷伦科技有限公司; AL104 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; SB-25-12DT 型超声波清洗机, 宁波新芝公司。

羟基红花黄色素 A 对照品 (质量分数 96.5%,

批号 111637-201308, 具有引湿性, 打开包装后一次性使用完毕)、薯蓣皂苷对照品 (质量分数 96.2%, 批号 111707-201402, 有引湿性, 开封后一次使用完毕)、原薯蓣皂苷对照品 (质量分数 94.9%, 批号 111937-201201)、伪原薯蓣皂苷对照品 (质量分数 92.0%, 批号 111855-201403, 极具引湿性, 引湿后潮解, 打开包装后一次使用完毕), 以上 4 种对照品均购于中国食品药品检定研究院; 甲基原薯蓣皂苷对照品 (质量分数 98.0%, 批号 54522-52-0) 和纤细薯蓣皂苷对照品 (批号 19083-00-2, 质量分数 98.0%) 购于上海士锋生物科技有限公司。乙腈 (色谱纯), 甲酸、甲醇 (分析纯), 水 (重蒸馏水)。

DZS, 每袋装 3.5 g, 鞍山制药有限公司生产, 批号分别为 150807、150813、150901、150902、151007、151023、151204、160107、160115、160201。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取 DZS 适量, 研成细粉, 取 3.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 超声功率 500 W, 超声频率 400 kHz, 放冷, 再次称定质量, 用 80% 甲醇补充缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得 DZS 的供试品溶液。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取羟基红花黄色素 A、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷 6 种对照品, 用 80% 甲醇溶液分别溶解并稀释, 制成含羟基红花黄色素 A 0.692 mg/mL、薯蓣皂苷 1.904 mg/mL、原薯蓣皂苷 1.748 mg/mL、甲基原薯蓣皂苷 0.890 mg/mL、伪原薯蓣皂苷 0.528 mg/mL、纤细薯蓣皂苷 0.656 mg/mL 的 6 种对照品储备溶液。再分别依次量取 6 种对照品储备液 5.0、7.5、7.5、5.0、2.5、5.0 mL, 置同一 100 mL 量瓶

中,加 80% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得含羟基红花黄色素 A 34.6 μg/mL、薯蓣皂苷 142.8 μg/mL、原薯蓣皂苷 131.1 μg/mL、甲基原薯蓣皂苷 44.5 μg/mL、伪原薯蓣皂苷 13.2 μg/mL 和纤细薯蓣皂苷 32.8 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 阴性对照样品的制备

分别称取除红花和除穿山龙外的其他 12 味药材各 1 份,严格按照 DZS 质量标准项下规定的生产工艺过程,分别配制红花空白样品和穿山龙空白样品,再按照“2.1”项方法分别制得缺红花阴性对照溶液和缺穿山龙阴性对照溶液。

2.4 色谱条件

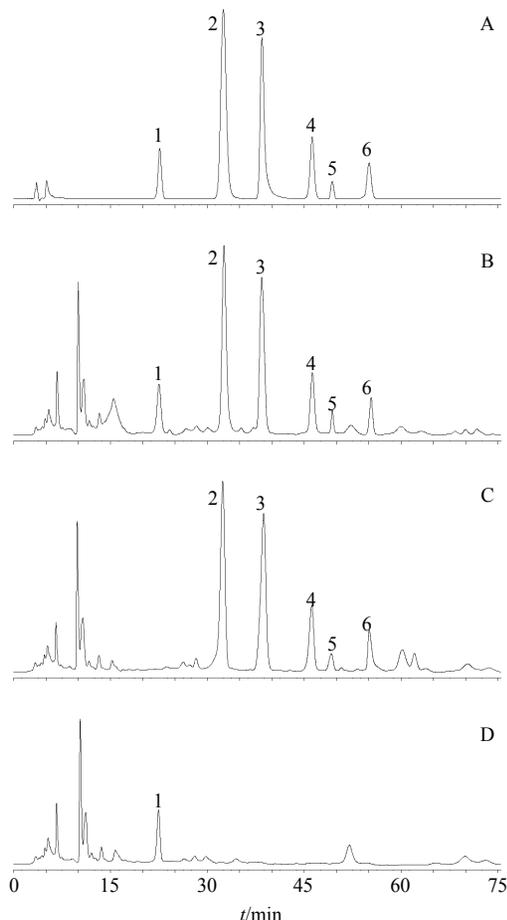
采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 体积流量 0.9 mL/min; 进样量为 20 μL; 流动相为乙腈-0.4% 甲酸水溶液, 梯度洗脱^[4-8]: 0~19 min, 22% 乙腈; 19~25 min, 22%~35% 乙腈; 25~42 min, 35% 乙腈; 42~63 min, 35%~60% 乙腈; 63~75 min, 60%~22% 乙腈; 检测波长: 0~25 min, 在 403 nm^[9-10] 波长下检测羟基红花黄色素 A; 25~75 min, 在 203 nm^[11] 波长下检测薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷。

在该色谱条件下所测各组分分离效果良好,且峰形较好,理论塔板数按所测各组分峰计均应大于 2 500,分离度均应大于 1.5。

根据该色谱条件,分别取“2.3”项下的 2 种阴性对照溶液、“2.2”项下的混合对照品溶液和“2.1”项下的供试品溶液,在“2.4”项的色谱条件下依法进行测定。结果显示,在与上述 6 种对照品色谱峰相应的保留时间处,阴性对照溶液没有对应的色谱峰,说明阴性无干扰,色谱图见图 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线的制备 分别精密吸取“2.2”项下的 6 种对照品储备液各 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,将其置于 20 mL 量瓶中并用 80% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得到 5 个质量浓度的混合对照品溶液,按照上述测定方法进行测定,以质量浓度作为横坐标 (X),测得的峰面积作为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,计算得线性回归方程、相关系数及线性范围,结果分别为羟基红花黄色素 A $Y=7.9927 \times 10^5 X-199.1$, $r=0.9994$, 线性范围 3.46~69.20 μg/mL; 薯蓣皂苷 $Y=1.2571 \times 10^6 X+456.5$, $r=0.9997$, 线性范围 9.52~190.40 μg/mL; 原薯蓣皂苷 $Y=$



1-羟基红花黄色素 A 2-原薯蓣皂苷 3-薯蓣皂苷 4-甲基原薯蓣皂苷 5-伪原薯蓣皂苷 6-纤细薯蓣皂苷
1-hydroxysafflor yellow A 2-protodioscin 3-dioscin
4-methylprotodioscin 5-pseudoprotodioscin 6-gracillin

图 1 混合对照品 (A)、DZS 样品 (B)、缺红花 (C) 及缺穿山龙 (D) 阴性样品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), DZS samples (B), blank sample without *Carthami Flos* (C), and blank sample without *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* (D)

$1.1389 \times 10^6 X+282.9$, $r=0.9996$, 线性范围 8.74~174.80 μg/mL; 甲基原薯蓣皂苷 $Y=8.5914 \times 10^5 X-375.7$, $r=0.9999$, 线性范围 4.45~89.00 μg/mL; 伪原薯蓣皂苷 $Y=6.9587 \times 10^5 X+281.6$, $r=0.9995$, 线性范围 2.64~52.80 μg/mL; 纤细薯蓣皂苷 $Y=7.1673 \times 10^5 X-408.8$, $r=0.9998$, 线性范围 3.28~65.60 μg/mL。

2.5.2 精密度试验 取“2.2”项下的混合对照品溶液,按“2.4”项下色谱条件重复进样 6 次,记录羟基红花黄色素 A、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的峰面积,分别计算这 6 个组分峰面积的 RSD 值,结果这 6

个组分峰面积的 RSD 依次为 1.23%、0.76%、0.92%、1.06%、1.18%、1.09%，结果显示仪器精密度高。

2.5.3 重复性试验 取批号为 150807 的 DZS 适量，按“2.1”项制备方法制备 6 份供试品溶液，按“2.4”项的色谱条件进行测定，分别计算 DZS 中的羟基红花黄色素 A、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的量，并计算这 6 个组分质量分数的 RSD 依次为 1.23%、1.09%、0.92%、1.12%、1.14%、1.07%。结果表明本方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取批号为 150807 的 DZS 同一份供试品溶液，在室温下放置 0、1、2、4、8、12 h，按“2.4”项色谱条件测定羟基红花黄色素 A、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的峰面积值，求得这 6 种组分的峰面积的 RSD 依次为 1.15%、0.96%、0.88%、1.02%、1.17%、1.03%，表明供试品溶液在制备后 12 h 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验 取批号为 150807 的 DZS

适量，称取 6 份，每份 1.5 g，分别置 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入混合对照品溶液 25 mL、80% 甲醇溶液 25 mL，密塞，称定质量，超声处理 30 min，超声功率 500 W，超声频率 400 kHz，放冷，再次称定质量，用 80% 甲醇补充减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，作为加样回收样品试液。按照“2.4”项色谱条件测定，计算这 6 个组分羟基红花黄色素 A、薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷的回收率分别为 98.57%、97.64%、99.43%、97.98%、98.57%、97.17%，RSD 分别为 1.59%、1.28%、1.07%、1.64%、1.16%、1.37%。

2.6 供试品的测定

取 10 个批次的 DZS，按“2.1”项制备方法制备供试品溶液，按“2.4”项的色谱条件进样测定，结果见表 1。从所测得的实验结果可以看出，本实验首次建立的 HPLC 法同时测定 DZS 中 6 种成分定量测定方法，结果准确、重复性好，为 DZS 的质量控制提供了更全面的方法。

表 1 10 批 DZS 定量测定结果

Table 1 Quantitative determination of 10 batches of DZS

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	羟基红花黄色素 A	薯蓣皂苷	原薯蓣皂苷	甲基原薯蓣皂苷	伪原薯蓣皂苷	纤细薯蓣皂苷
150807	0.632	2.394	2.039	0.746	0.207	0.512
150813	0.659	2.203	1.989	0.725	0.197	0.486
150901	0.635	2.405	2.031	0.744	0.205	0.518
150902	0.628	2.388	2.046	0.752	0.203	0.515
151007	0.607	2.415	2.137	0.719	0.215	0.504
151023	0.634	2.396	2.094	0.734	0.199	0.497
151204	0.599	2.421	1.991	0.727	0.207	0.481
160107	0.621	2.274	2.105	0.743	0.211	0.506
160115	0.593	2.336	2.097	0.756	0.219	0.511
160201	0.647	2.417	2.135	0.721	0.198	0.479

3 讨论

3.1 检测波长的选择

DZS 由 13 味中药组成，且每味又含有多种组分，本实验综合考虑，利用 DAD 检测器，确定了羟基红花黄色素 A 的检测波长为 403 nm，薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的检测波长为 203 nm，有效地分离并定量了 DZS 中的 6 个有效成分，为 DZS 更全面的质量评价和控制提供了参考。

3.2 样品溶液超声时间的选择

为能兼顾 DZS 中这 6 个组分对提取溶剂要求，参考文献资料，选取 80% 甲醇溶液为提取溶剂，同时考察了超声提取时间对 DZS 中 6 个组分提取率的影响，分别选取超声提取 20、30、40 min 进行考察，考察不同提取和回流时间下样品中 6 个成分的提取率，结果超声提取 30 min 和超声提取 40 min 时 6 个成分的提取率相差不大，但明显高于超声提取 20 min 时的各成分提取率，故选取超声处理 30 min 作

为 DZS 中 6 个成分同时测定的样品处理方法, 该方法操作简便, 快速。因此, DZS 样品溶液制备的提取方法和提取时间优选为 80% 甲醇溶液超声提取 30 min。

3.3 流动相的选择

对于 DZS 中的多指标成分的同时测定, 流动相体系的筛选十分关键, 在参考文献的基础上, 根据指标性成分的理化性质和色谱行为, 曾采用甲醇-0.5% 磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.4% 甲酸水溶液不同比例为流动相构成的洗脱系统, 优选最佳的梯度洗脱流动相。结果表明, 乙腈-0.4% 甲酸水溶液系统进行梯度洗脱的分析效果较好, DZS 中薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷各成分的分

参考文献

[1] 卫生部颁药品标准 (中药成方制剂第七册) [S]. 1993.
[2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[3] 谭娇连, 田其学. 跌打止痛散质量标准的研究 [J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(13): 26-27.

[4] 赵明波, 邓秀兰, 屠鹏飞, 等. 高效液相色谱法测定红花中的羟基红花黄色素 A [J]. 色谱, 2003, 21(6): 593-595.
[5] 刘中博, 王铁杰, 卢忠强, 等. HPLC 法同时测定穿龙薯蓣中薯蓣皂苷和原薯蓣皂苷 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 774-776.
[6] 于冬梅, 杨国辉, 孙 晖, 等. 不同性别及去花对穿龙薯蓣中薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷和总皂苷含量的影响 [J]. 中药研究, 2010, 12(2): 250-253.
[7] 张新新, 梁晋如, 苏 琪, 等. HPLC-ELSD 法同时测定盾叶薯蓣根茎中 5 个皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1235-1238.
[8] 秦兰艳, 贾凌云, 孙启时, 等. RP-HPLC 法同时测定穿山龙中薯蓣皂苷和纤细皂苷的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(10): 627-630.
[9] 陈雪英, 李页瑞, 陈 勇, 等. 近红外光谱快速测定红花逆流提取过程中羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 分析化学研究报告, 2009, 37(10): 1451-1456.
[10] 何 昱, 周惠芬, 黄丽娜, 等. HPLC-DAD 法同时测定谷红注射液中 7 个组分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 954-959.
[11] 于书仪, 刘 颖, 刘树民. RP-HPLC 同时测定穿山龙药材中原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 96-98.