

★论著★

HPLC法同时测定越鞠丸提取物 YJ- XCC1Z3中
藁本内酯、 α - 香附酮、苍术素的含量^{*}翟卫峰^{1,2}, 尉小慧^{1,2*}, 张淑霞³, 王峰涛^{1,2}

(1 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 2 上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203;

3 齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 目的: 研究 HPLC法同时测定越鞠丸提取物 YJ- XCC1Z3中藁本内酯、 α - 香附酮、苍术素的含量。方法: 采用 Agilent XDB C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱, 以甲醇-水(77: 23)作为流动相, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 二极管阵列检测器, 检测波长 252 nm。结果: 藁本内酯、 α - 香附酮、苍术素进样浓度分别在 21.3 ~ 850 μ g · mL⁻¹, 4.92 ~ 328 μ g · mL⁻¹, 11.82 ~ 985 μ g · mL⁻¹内有良好的线性关系; 平均加样回收率($n=9$)分别为 98.7%, 99.0%, 98.9%。结论: 本法操作简便, 结果可靠, 重复性好, 可作为越鞠提取物 YJ- XCC1Z3的质量控制方法。

关键词: 越鞠丸; YJ- XCC1Z3 藁本内酯; α - 香附酮; 苍术素; HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254- 1793(2009)05- 0693- 04

HPLC determination of ligustilide, α - cyperone and
atractylodin in YJ- XCC1Z3 extract of Yueju pills^{*}DI Wei-feng^{1,2}, WEI Xiao-hui^{1,2*}, ZHANG Shu-xia³, WANG Zheng-tao^{1,2}

(1 Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicine Ministry of Education, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2 Shanghai R&D Center for Standardization of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3 Chemistry and Chemical Engineering Institute, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of ligustilide, α - cyperone and atractylodin in YJ- XCC1Z3 extract, the antileprepresent active part of Yueju pills. **Method** An Agilent XDB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) was used. The mobile phase was methanol-water (77: 23) at a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹. Ligustilide, α - cyperone and atractylodin were determined at 252 nm. **Results** The linear ranges of ligustilide, α - cyperone and atractylodin were 21.3 ~ 850 μ g · mL⁻¹, 4.92 ~ 328 μ g · mL⁻¹ and 11.82 ~ 985 μ g · mL⁻¹ respectively. The average recoveries ($n=9$) were 98.7%, 99.0% and 98.9% respectively. **Conclusion** This method is convenient, rapid and accurate. It can be used for quality control of YJ- XCC1Z3 extract.

Key words Yueju pills; YJ- XCC1Z3; ligustilide; α - cyperone; atractylodin; HPLC

越鞠丸源自《丹溪心法》“越鞠丸, 解诸郁”。方由香附、川芎、栀子、苍术、神曲 5味药组成。方中香附行气解郁, 以治气郁; 川芎活血祛瘀, 以治血郁; 栀子清热泻火, 以治火郁; 苍术燥湿运脾, 以治湿郁; 神曲消食导滞, 以治食郁。临床上常用于抑郁、心肌梗死后抑郁、中风后抑郁、更年期抑郁, 以及与抑郁相关的失眠、精神失调、神经性头痛、神经官能征等症状^[1~4]。本研究在前期试验筛选出越鞠丸抗抑郁

有效提取物 YJ- XCC1Z3的研究结果^[5~7]基础上, 采用 HPLC法对该提取物中的主要活性成分藁本内酯、 α - 香附酮、苍术素进行同时测定, 为 YJ- XCC1Z3的质量控制奠定了基础。

1 仪器与试药

Agilent 1100 HPLC 仪 (美国安捷伦公司), KQ-250DB 数控超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司), Sartorius BT 124S/BT 25S 电子天平 (北京赛

* 国家自然科学基金青年基金项目 (30400578); 上海市科委 2007 启明星 B 类资助项目 (30400578); 上海市重点学科建设项目资助 (Y0301)

** 通讯作者 Tel: (021) 51322513 E-mail: xhw_eid@163.com

多利斯仪器系统有限公司), EYELA SB-2000 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

实验所用香附、川芎、栀子、苍术药材均购自上海养和堂中药饮片有限公司, 经上海中药标准化研究中心吴立宏副研究员鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的根茎, 伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort 的根茎, 茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的成熟果实, 菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的根茎。并遵照越鞠丸处方, 香附为醋制, 川芎为生品, 栀子、苍术为炒制。

越鞠丸提取物 YJ-XCC1Z3(上海中药标准化研究中心, 批号 060622, 070712, 070824), 为越鞠丸的抗抑郁有效部位, 由原处方去除神曲而得(研究内容待发表), 其制备工艺是经过工艺优选并结合药效学实验而确定, 已申请专利(申请号: 200710093956.0)。具体方法如下: 按越鞠丸处方比例称取苍术、川芎、香附, 粉碎, 95% 乙醇回流提取 2 次(控制提取温度在 85℃ 以下), 每次 2 h, 乙醇量分别为药材重量的 6 倍量、4 倍量。合并 2 次提取液, 回收乙醇(控制浓缩温度在 45℃ 以下)至无醇味, 浓缩液分别用 5 倍量、2 倍量的石油醚萃取 2 次, 合并萃取液, 回收石油醚, 得油状浸膏(I)。按处方比例称取栀子, 粉碎, 水回流提取 2 次, 每次 1 h, 水量分别为药材重量的 6 倍量、4 倍量。合并 2 次提取液, 减压浓缩至含京尼平苷约 8 mg·mL⁻¹ 的溶液, 上 XDA-1 大孔树脂(比表面积 800~1000 m²·g⁻¹, 孔径 26.0~32.0 nm, 极性, 西安蓝晓科技有限公司), 先以 10 倍柱体积水冲洗, 流速 10 BV(柱体积)·h⁻¹, 洗脱液弃去, 继以 30 倍柱体积 20% 乙醇洗脱, 流速 5 BV·h⁻¹, 收集此部分洗脱液, 减压浓缩至干, 得粉末(II)。合并 I 和 II, 加入总量的 43% 微粉硅胶, 即得 YJ-XCC1Z3(每 1 g 相当于原药材 22.2 g)。避光, 冷藏(-25℃)保存。

对照品藁本内酯(纯度 97.5%)、苍术素(纯度 98.7%)由上海中药标准化研究中心提供, α-香附酮(纯度 97.1%)购自天津太平洋科技公司, 上述对照品均需避光, 冷藏(-25℃)保存。HPLC 用甲醇和乙腈为色谱纯, 双蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱: Agilent XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(77:23); 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 检测波长: 252 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL。

3 溶液的配制

3.1 对照品储备液 精密称取对照品藁本内酯 21.25 mg, α-香附酮 8.20 mg, 苍术素 9.85 mg, 分

别加甲醇制成每 1 mL 含藁本内酯 0.85 mg, α-香附酮 0.328 mg, 苍术素 0.985 mg 的单一对照品储备液, 避光, 冷藏(-25℃)保存。

3.2 样品溶液 精密称取 YJ-XCC1Z3 0.2 g 加入甲醇 25 mL, 称重, 超声(80W, 20 kHz) 10 min, 以甲醇补足重量, 静置, 取上清液即得。避光, 冷藏(-25℃)保存。

4 干扰性试验

按处方比例及样品制备方法, 制备分别不含苍术、川芎、香附的阴性样品, 按“3.2”项下的方法制备阴性样品溶液。精密吸取对照品溶液、样品溶液及阴性样品溶液各 10 μL 进样。结果见图 1, 表明

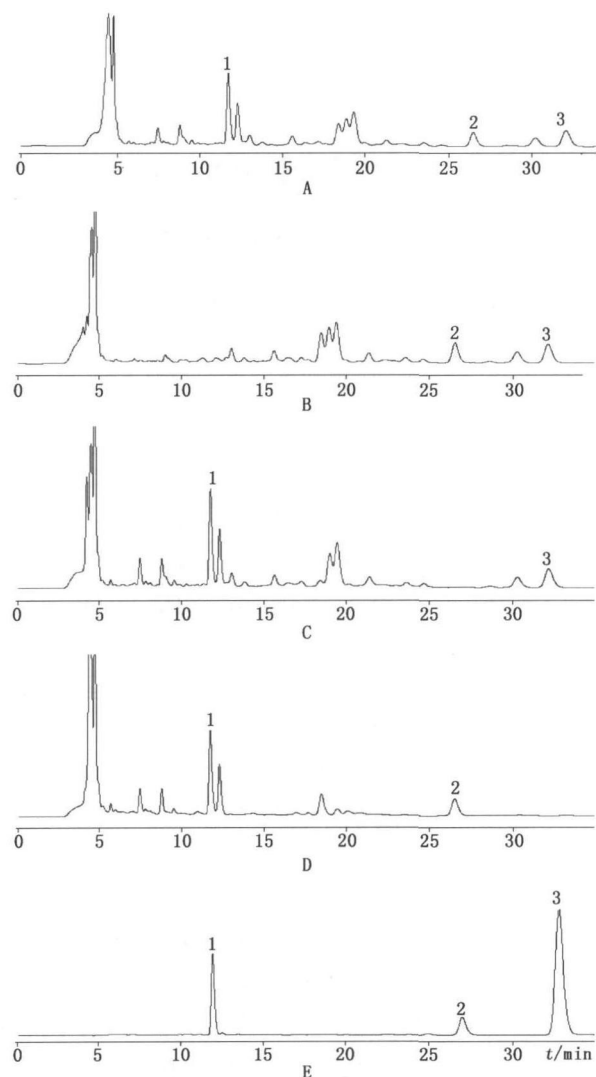


图 1 样品(A)、缺川芎阴性样品(B)、缺香附阴性样品(C)、缺苍术阴性样品(D)及对照品(E)HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of sample(A), negative sample without Rhizoma Chuanxiong(B), negative sample without Rhizoma Cyperi(C), negative sample without Rhizoma Atractylodis(D), and reference substances(E)

1. 藁本内酯(ligustilide 11.7 min) 2. α-香附酮(α-cyperone 26.4 min) 3. 苍术素(atractylodin 32.0 min)

样品中苍术、香附对藁本内酯的测定无干扰, 苍术、川芎对 α -香附酮的测定无干扰, 川芎、香附对苍术素的测定无干扰。

5 线性关系考察

5.1 藁本内酯 精密吸取不同体积的藁本内酯对照品储备液, 分别制成如下浓度: 21.3 127.5 425 637.5 850 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按“2”项下色谱条件进样分析, 以峰面积 Y 为纵坐标, 浓度 X 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为:

$$Y = 2.48 \times 10^4 X - 19.06 \quad r = 0.9999$$

线性范围为 21.3~850 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.2 α -香附酮 精密吸取不同体积的 α -香附酮对照品储备液, 分别制成如下浓度: 4.92 32.8 49.2 114.8 229.6 328 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按“2”项下色谱条件进样分析, 以峰面积 Y 为纵坐标, 浓度 X 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为:

$$Y = 4.64 \times 10^4 X + 10.83 \quad r = 0.9999$$

线性范围为 4.92~328 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.3 苍术素 精密吸取不同体积的苍术素对照品储备液, 分别制成如下浓度: 11.82 29.55 59.44 295.5 591.788 985 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按“2”项下色谱条件进样分析, 以峰面积 Y 为纵坐标, 浓度 X 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为:

$$Y = 6.26 \times 10^4 X + 101.7 \quad r = 0.9997$$

线性范围为 11.82~985 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

6 方法学考察

6.1 精密度试验 分别取藁本内酯对照品溶液 (21.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、 α -香附酮对照品溶液 (32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、苍术素对照品溶液 (29.55 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 连续重复进样 6 次, 考察其精密度。所得藁本内酯、 α -香附酮、苍术素峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.15%, 0.19%, 0.14%。证明所用仪器精密度良好。

6.2 稳定性试验 精密称取批号为 060622 的样品 0.2 g 按“3.2”项下方法制备样品溶液, 按“2”项下色谱条件, 分别于 0 2 8 24 36 h 进样 1 次。结果藁本内酯、 α -香附酮、苍术素峰面积的 RSD 值分别为 0.85%, 1.7%, 1.1%。结果表明样品溶液在 36 h 内稳定。

6.3 重复性试验 取批号为 060622 的样品 6 份, 精密称定, 按“3.2”项下方法制备样品溶液, 按“2”项下色谱条件进行分析。结果藁本内酯、 α -香附酮、苍术素平均含量及其 RSD ($n=6$) 分别为 14.39 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD = 2.9%), 3.99 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD = 2.8%), 2.03 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD = 4.2%)。说明方法可

靠, 重复性良好。

6.4 加样回收率试验 取批号为 060622 的样品 (藁本内酯 14.39 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, α -香附酮 3.99 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 苍术素 2.03 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 0.1 g 共 9 份, 平均分为 3 组, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中。按 80%, 100%, 120% 的 3 个目标浓度, 每组分别精密加入 151 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藁本内酯对照品溶液 8 10 12 mL; 38 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -香附酮对照品溶液 8 10 12 mL; 21 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苍术素对照品溶液 8 10 12 mL。最后用甲醇定容。在“2”项色谱条件下进行测定, 结果见表 1。

表 1 加样回收率

Tab 1 Recovery test

组分 (component)	加入量 (added) /mg	回收率 (recovery) /% (n=3)	RSD /%	平均回收率 (average recovery) /% (n=9)
藁本内酯 (ligustilide)	1.208	101.2	1.4	98.7
	1.510	98.4	1.2	
	1.812	96.5	1.9	
α -香附酮 (α -cyperone)	0.304	97.2	1.0	99.0
	0.380	99.6	2.1	
	0.456	100.3	0.53	
苍术素 (atreyolide)	0.168	97.3	0.77	98.9
	0.210	100.9	2.3	
	0.252	98.7	1.6	

6.5 样品的含量测定 取 YJ-XCC1Z3 (批号为 060622 070712 070824), 约 0.2 g 各 3 份, 精密称定, 按“3.2”项下方法制备溶液, 在“2”项色谱条件下进行测定, 外标法计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品测定的含量结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab 2 Results of sample determination

批号 (Lot No.)	藁本内酯 (ligustilide)	α -香附酮 (α -cyperone)	苍术素 (atreyolide)
060622	14.39	3.99	2.03
070712	13.01	4.35	1.99
070824	12.80	4.03	1.89

7 讨论

7.1 选择乙酸乙酯、丙酮、氯仿、70% 甲醇、甲醇等 作为样品前处理溶剂, 结果表明样品在甲醇中与其他溶剂中检测到的峰高、峰的个数基本一致, 因使用甲醇操作步骤少, 操作简单, 故选择甲醇作为样品的前处理溶剂。

7.2 色谱条件 是在对流动相体系、色谱柱类型、流动相比、柱温、流速、检测波长类型等条件进行了系统的优化筛选基础上确定的。考察了甲醇-水与

乙腈-水体系对样品的分离情况,以甲醇-水体系对样品中主要色谱峰的分离较佳,并进一步优化了流动相的比例和流速,确定为甲醇-水(77:23),流速: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。考察了 Agilent Extend- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)等不同色谱柱对峰的影响,以 Agilent Eclipse XDB- C_{18} 对主要色谱峰的分离度较好。不同柱温(25-30 $^{\circ}\text{C}$)对色谱峰的分离度无明显影响,30 $^{\circ}\text{C}$ 出峰较快,可节省分析时间。 α -香附酮的最大吸收波长为 252 nm,且只在 252 nm 附近有吸收;藁本内酯、苍术素在此波长下也有吸收,且峰形较好,故采用 252 nm 为检测波长。

7.2 藁本内酯、 α -香附酮、苍术素均为热不稳定物质,且对光敏感、易氧化,实验过程中藁本内酯、 α -香附酮、苍术素对照品及样品均需避光冷藏(-25 $^{\circ}\text{C}$)保存,同时控制药材回流提取时温度在 85 $^{\circ}\text{C}$ 以下,药液浓缩温度在 45 $^{\circ}\text{C}$ 以下。

7.3 苍术、川芎、香附乙醇提取石油醚萃取部分为小极性油状物,栀子有效部分为大极性粉末,两部分难以混合均匀,加入浸膏总量 43% 的微粉硅胶,可使两部分混匀,易于取样和储存。

7.4 本实验同时测定了藁本内酯、 α -香附酮、苍术素 3 种成分,为越鞠抗抑郁有效部位质量标准的建立,提供了可靠的客观指标。

参考文献

- 1 JIANG Lin(蒋麟). Discuss on the Yueju pills in treating depression (越鞠丸用于治疗抑郁症的探讨). *Forum Tradit Chin Med* (国医论坛), 2004, 19(3): 15
- 2 ZHAO Yu-hao(赵宇昊), WANG Xiu-juan(王秀娟), XIE Ming(谢鸣). The source and clinical use of Yueju pills(越鞠丸方名渊源与临床加减运用). *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2004, 27(6): 13
- 3 CAO Jian-hua(曹建华). Using Yueju pills in treating depressant after stroke(越鞠丸加减治疗中风后抑郁症 36 例). *Henan Tradit Chin Med* (河南中医), 2004, 24(2): 65
- 4 ZHU Ting-yi(朱庭仪), WU Geng-yu(吴耕玉). Using Yueju pills as a prescription to treat 32 examples of climacteric melancholia(越鞠丸为主方治疗更年期忧郁症 32 例). *Chin J Convalescent Med* (中国疗养医学), 1997, 6(1): 335
- 5 WEI Xiao-hui(尉小慧), CHEN Yue(陈玥), XIA Guang-xin(夏广新), et al. Antidepressant effect of Yueju pills ethanol extract and water extract in mice models of despair(越鞠丸醇提物与水提物对抑郁模型小鼠的抗抑郁作用比较). *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2006, 40(8): 70
- 6 WEI Xiao-hui(尉小慧), CHANG Hong-sheng(畅洪昇), DI Wei-feng(翟卫峰), et al. Experimental studies on treatment of depression with YJ-XCC1Z3 in mice models (越鞠丸提取物 YJ-XCC1Z3 抗抑郁作用研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(24): 2628
- 7 WEI Xiao-hui, CHENG Xue-mei, SHEN Jing-shan, et al. Antidepressant effect of Yueju-Wan ethanol extract and its fractions in mice models of despair. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 339

(本文于 2008 年 1 月 2 日收到)