

HPLC 法同时测定元胡止痛滴丸中 6 种成分

李思思¹, 许浚^{1,2}, 张铁军^{2*}, 张晓燕¹, 张喜民³, 任一杰³, 邓月婷³

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 甘肃陇神戎发药业股份有限公司, 甘肃 兰州 730101

摘要: 目的 建立同时测定元胡止痛滴丸中 6 种成分的 HPLC 分析方法。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.04% 乙酸铵溶液 (冰醋酸调 pH 值至 4.0), 梯度洗脱: 0~10 min, 20% 乙腈; 10~25 min, 20%~25% 乙腈; 25~70 min, 25%~75% 乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 280 nm; 进样量 10 μL, 测定元胡止痛滴丸中延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素的量。结果 延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素分离度良好, 阴性无干扰, 分别在 14.94~149.40、1.97~19.72、15.94~159.36、9.72~97.20、2.82~28.17、0.61~6.06 μg/mL 线性关系良好, *r* 均大于 0.999 0, 平均加样回收率为 95%~105% (RSD 1.82%~2.99%)。4 批样品中延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素的量分别在 0.368~0.483、0.058~0.082、0.532~0.766、0.315~0.459、0.145~0.212、0.030~0.053 mg/g。结论 方法简便、准确, 重复性好, 适用于元胡止痛滴丸中 6 种成分的定量测定, 可为元胡止痛滴丸的质量控制提供依据。

关键词: 元胡止痛滴丸; 延胡索乙素; 黄藤素; 去氢延胡索甲素; 延胡索甲素; 欧前胡素; 异欧前胡素; HPLC

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)21-3198-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.013

Simultaneous determination of six ingredients in Yuanhu Zhitong Dripping Pills by HPLC

LI Si-si¹, XU Jun^{1,2}, ZHANG Tie-jun², ZHANG Xiao-yan¹, ZHANG Xi-min³, REN Yi-jie³, DENG Yue-ting³

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Gansu Long-Shen-Rong-Fa Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730101, China

Abstract: Objective To establish a method of HPLC for simultaneous determination of six ingredients in Yuanhu Zhitong Dripping Pills. **Methods** Separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Mobile phase was acetonitrile (A)-0.04% ammonium acetate (acetic acid tone pH 4.0) (B), gradient elution: 0—10 min, 20% A, 10—25 min, 20%—25% A, 25—70 min, 25%—75% A; flow rate was 1 mL/min; column temperature was 35 °C; detection wavelength was 280 nm; and injection volume was 10 μL. The contents of *dl*-tetrahydropalmatine, palmatine, dehydrocorydaline, *d*-corydaline, imperatorin, and isoimperatorin were determined. **Results** The linear ranges were 14.94—149.40 μg/mL for *dl*-tetrahydropalmatine, 1.97—19.72 μg/mL for palmatine, 15.94—159.36 μg/mL for dehydrocorydaline, 9.72—97.20 μg/mL for *d*-corydaline, 2.82—28.17 μg/mL for imperatorin, and 0.61—6.06 μg/mL for isoimperatorin, respectively, with the correlation *r* > 0.999 0. The extraction recoveries varied from 95% to 105% (RSD varied from 1.82% to 2.99%). The contents of *dl*-tetrahydropalmatine, palmatine, dehydrocorydaline, *d*-corydaline, imperatorin, and isoimperatorin was 0.368—0.483, 0.058—0.082, 0.532—0.766, 0.315—0.459, 0.145—0.212, and 0.030—0.053 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is accurate and reliable, which can be used for the quality control of Yuanhu Zhitong Dripping Pills.

Key words: Yuanhu Zhitong Dripping Pills; *dl*-tetrahydropalmatine; palmatine; dehydrocorydaline; *d*-corydaline; imperatorin; isoimperatorin; HPLC

收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (81430096)

作者简介: 李思思 (1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂质量标准研究。Tel: (022)23006843 E-mail: alu365ser@163.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

元胡止痛滴丸是由甘肃陇神戎发药业股份有限公司独家生产的中药制剂,该方由醋制延胡索和白芷2味药组成,具有理气、活血、止痛之功效,临床上主要用于治疗气滞血瘀所致胃痛、肋痛、头痛以及痛经^[1]。现代药理研究表明,该方具有镇痛、抗炎、抗焦虑、解痉及血管舒张等多种药理作用^[2-6]。其疗效确切,现已被列入国家医保甲类药品、国家重要保护品种目录,并被2009版《国家基本药物目录(基层版)》确定为纯中药止痛药物。元胡止痛滴丸现行质量标准收载于《中国药典》2010年版第二增补本,其仅规定延胡索乙素和欧前胡素的量,现有文献报道多是测定该滴丸中延胡索乙素的量^[7-8],而本品成分复杂,单一指标质控并不能保证产品的有效性与安全性,这严重制约了本产品的市场拓展、临床应用以及国际化进程。

延胡索辛散、苦泄,能活血行气止痛,白芷辛散温通,能解表散寒、通窍止痛,生物碱类和香豆素类分别为其代表性药性成分。本实验室在前期进行了元胡止痛滴丸血清药物化学、药效学研究,确定了具有镇痛作用的主要药效成分。本实验在明确了延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素为主要药性、药效成分的基础上,采用同一色谱条件同时定量测定,建立了多种成分同时测定的方法,为元胡止痛滴丸产品的质量控制在提供了科学依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100型高效液相色谱仪,美国Agilent公司;Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,美国Dikma公司;超声波清洗仪,宁波新芝生物科技公司;AB204-N电子分析天平(十万分之一),德国Meteler公司;BT25S电子分析天平(万分之一),德国Sartorius公司。

对照品延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素,购自成都曼思特生物科技有限公司,批号MUST-1302010、MUST-1306210、MUST-13061503,质量分数≥98%;黄藤素、延胡索乙素购自上海将来试剂有限公司,批号分别为J140303、J140303,质量分数≥98%;去氢延胡索甲素购自上海融禾医药科技有限公司,批号131220,质量分数≥98%。乙腈(色谱纯)、冰乙酸(分析纯),天津市康科威德科技有限公司;乙酸铵,分析纯,天津光复精密化工研究所;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。元胡止痛滴丸及延胡索、白芷药材均由甘肃陇神戎发

制药有限公司提供,滴丸批号分别为20131215、20140241、20140510、20141013,延胡索、白芷药材经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定分别为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusu* W. T. Wang 的干燥块茎、伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hofm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根,符合《中国药典》2010年版一部的有关规定。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为74.700、9.860、79.680、48.600、14.084、3.030 μg/mL的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取元胡止痛滴丸适量,研细,取细粉约1 g,精密称定,置于10 mL量瓶中,加入适量60%乙醇,超声1 h使溶解,冷却,稀释至刻度。摇匀滤过,即得供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液的制备 按工艺方法分别制备缺少延胡索和白芷的阴性样品,按“2.1.2”项方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.04%乙酸铵水溶液(冰醋酸调pH值至4.0),梯度洗脱:0~10 min, 20%乙腈;10~25 min, 20%~25%乙腈;25~70 min, 25%~75%乙腈;体积流量1 mL/min;柱温35 ℃;检测波长280 nm;进样量10 μL。

2.3 系统适用性试验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液、缺白芷阴性样品溶液、缺延胡索阴性样品溶液,按“2.2”项条件进样测定,考察系统适用性。在“2.2”项色谱条件下,各成分色谱峰与相邻峰的分度均大于1.5,且阴性无干扰,理论塔板数按色谱峰计算不低于7 000。色谱图见图1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下制备的混合对照品溶液,制成6个不同质量浓度的对照品溶液,按“2.2”项下的色谱条件进行测定。记录相应的峰面积,以峰面积积分值为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线并进行回归计算。6种成分的线性回归方程分别为延胡索乙素: $Y=10.869 X-6.027 2$, $r=0.999 5$,线性范围14.94~

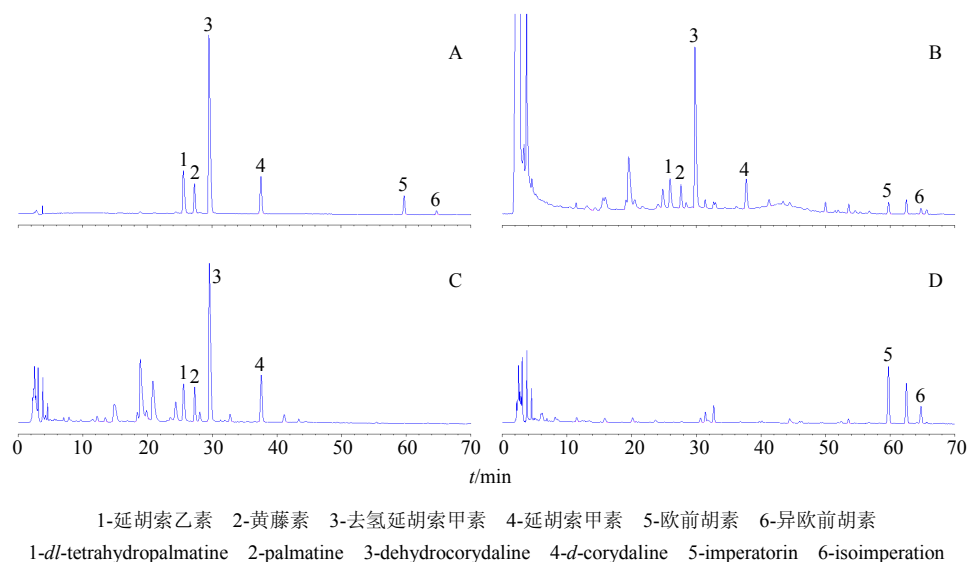


图1 混合对照品(A)、元胡止痛滴丸样品(B)、缺白芷阴性样品(C)和缺延胡索阴性样品(D)的HPLC图
Fig. 1 HPLC of reference substances (A), Yuanhu Zhitong Dripping Pills sample (B), negative sample without *Angelicae dahuricae Radix* (C), and without *Corydalis Rhizoma* (D)

149.40 $\mu\text{g/mL}$; 黄藤素: $Y=44.745X+4.2748$, $r=0.9992$, 线性范围 1.97~19.72 $\mu\text{g/mL}$; 去氢延胡索甲素: $Y=34.103X+154.15$, $r=0.9999$, 线性范围 15.94~159.36 $\mu\text{g/mL}$; 延胡索甲素: $Y=12.628X+24.723$, $r=0.9999$, 线性范围 9.72~97.20 $\mu\text{g/mL}$; 欧前胡素: $Y=19.803X+16.545$, $r=0.9999$, 线性范围 2.82~28.17 $\mu\text{g/mL}$; 异欧前胡素: $Y=21.313X+11.323$, $r=0.9995$, 线性范围 0.61~6.06 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明6种被测成分在标准曲线范围内质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取批号 20131215 样品, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下连续进样6次, 记录峰面积。结果延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的RSD值分别为1.10%、0.51%、0.62%、1.11%、2.87%、2.60%, 结果表明精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取批号 20131215 样品, 按照“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液6份, 在上述色谱条件下进样分析, 计算延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素质量分数RSD值分别为2.36%、2.38%、1.58%、1.27%、2.83%、2.90%, 结果表明重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取精密度试验下供试品溶液, 分别于0、3、6、9、12、24 h在上述色谱条件下进样分析, 延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、

延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的RSD值分别为1.10%、0.51%、0.62%、1.11%、2.87%、2.60%, 表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取批号为20131215滴丸样品9份, 每份约0.5 g, 精密称定, 分成3组, 分别按已知质量分数的80%、100%、120%3个水平加入混合对照品溶液, 按照“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液, 进样分析, 计算回收率。延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素的平均回收率分别为95.82%、96.47%、95.59%、99.63%、101.01%、97.43%, RSD值分别为2.73%、2.98%、2.99%、2.75%、1.82%、2.69%, 表明本方法准确度良好。

2.5 定量测定

取4批滴丸样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 以外标法计算各成分的质量分数, 结果见表1。

3 讨论

3.1 测定指标的选择

元胡止痛滴丸由延胡索和白芷组成, 延胡索辛散苦泄温通, 具活血行气止痛之功, 其化学成分主要为生物碱类, 延胡索乙素、延胡索甲素、黄藤素、去氢延胡索甲素属于原小檗碱类生物碱, 具有镇痛、扩张血管等作用, 属于辛苦兼味, 为延胡索中代表性成分; 白芷辛散温通, 具解表散寒、通窍止痛之功, 其化学成分主要为香豆素类和挥发油, 其中欧

表 1 4 批元胡止痛滴丸中 6 种成分定量测定结果

Table 1 Contents of six components in four batches of Yuanhu Zhitong Dripping Pills

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	延胡索乙素	黄藤素	去氢延胡索甲素	延胡索甲素	欧前胡素	异欧前胡素
20131215	0.483	0.071	0.766	0.384	0.145	0.030
20140241	0.429	0.082	0.698	0.404	0.212	0.053
20140510	0.368	0.058	0.532	0.315	0.169	0.039
20141013	0.475	0.059	0.592	0.459	0.181	0.046

前胡素、异欧前胡素为主要成分，具有解热、抗炎、镇痛的药理作用，属于辛味，为白芷中代表性成分^[9-11]。本实验室在前期进行了滴丸血清药物化学、药效物质筛选研究，确定了该 6 种成分为主要的镇痛药效成分。综上所述，延胡索乙素、黄藤素、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素作为与全方性效相关的主要成分，将其作为指标进行控制能够全面控制滴丸的质量。

3.2 供试品制备方法的确定

考虑到元胡止痛滴丸的制备工艺是药材经 60% 乙醇提取后浓缩成稠膏加辅料制成，因此最终确定供试品制备方法是采用 60% 乙醇超声，使滴丸溶解，然后进样测定。

3.3 检测波长的选择

使用 DAD 进行 200~400 nm 全波长扫描后发现，延胡索生物碱类成分在 280 nm 处为最大吸收，虽然欧前胡素及异欧前胡素在 280 nm 处吸收接近峰谷，但是吸收较稳定，满足定量测定的要求，故选择 280 nm 作为滴丸测定波长。

4 结论

本实验选择了与元胡止痛滴丸药性药效相关的 6 种成分作为质控指标，首次建立了 HPLC 法同时测定元胡止痛滴丸中 6 种成分的定量测定方法。方法学考察表明，方法重复性好，结果准确，可用于元胡止痛滴丸中有效成分的定量分析，为元胡止痛滴丸的质量控制提供了更全面的方法。由于本法采用了乙酸铵-冰醋酸体系，因此对实验操作要求较高。另外，本实验仅仅测定了 4 批滴丸，还需要通过所建立的方法对大量样品数据进行监测分析，才能形成更完善准确的元胡止痛滴丸质量标准。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Yuan C S, Mehendale S R, Wang C Z, *et al.* Effects of *Corydalis yanhusuo* and *Angelica dahuricae* on cold pressor-induced pain in Humans: A controlled trial [J]. *J Clinic Pharmacol*, 2004, 44(11): 1323-1327.
- [3] Chen Y F, Tsai H Y, Wu T S. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(1): 2-8.
- [4] Zhang Y C, Xu H Y, Chen X M, *et al.* Study on the application of intestinal absorption in vitro coupled with bioactivity assessment in Yuanhu Zhitong preparation [J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6(10): 1941-1947.
- [5] Leung W C, Zheng H, Huen M S Y, *et al.* Anxiolytic-like action of orally administered dl-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze [J]. *Prog Neuro-Psychoph*, 2003, 27(5): 775-779.
- [6] Hiller K O, Ghorbani M, Schilcher H. Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and chelidonium majus extracts on isolated guinea-pig ileum (letter) [J]. *Planta Med*, 1998, 64(8): 758-760.
- [7] 杨帆. 改良高效液相色谱法测定元胡止痛滴丸和胶囊中延胡索乙素含量 [J]. 中国药业, 2014, 23(13): 24-25.
- [8] 顾秀琰. RP-HPLC 测定元胡止痛滴丸中延胡索乙素的含量 [J]. 中成药, 2006, 28(4): 606-608.
- [9] 张铁军, 刘昌孝. 中药五味药性理论辨识及其化学生物学实质表征路径 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 1-6.
- [10] 刘昌孝, 张铁军, 何新, 等. 活血化瘀中药五味药性功效的化学及生物学基础研究的思考 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 615-624.
- [11] 孙玉平, 张铁军, 曹煌, 等. 中药辛味药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 785-790.