

头风痛丸中8种成分的HPLC法测定及其化学计量学综合评价

焦媛媛¹, 田广林²

1. 郑州颐和医院 药学部, 河南 郑州 450000

2. 遂成药业股份有限公司 新药研发部, 河南 郑州 451100

摘要: **目的** 建立头风痛丸中氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯的 HPLC 法测定方法及其化学计量学综合质量评价方法。**方法** 使用 Waters Symmetryshield C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%冰醋酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长分别为 310 nm (0~22 min 检测氧化前胡素、欧前胡素和异欧前胡素)、280 nm (22~60 min 检测川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯), 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。采用统计软件对头风痛丸中 8 种成分的含量数据进行主成分分析与聚类分析。**结果** 8 种成分的线性范围分别为 14.27~356.75、10.85~271.25、4.09~102.25、0.58~14.50、0.96~24.00、2.54~63.50、1.22~30.50、4.89~122.25 μg/mL ($r \geq 0.9992$); 平均加样回收率分别为 100.05%、99.50%、99.38%、97.32%、96.98%、97.78%、96.93%、98.91%, RSD 值分别为 0.66%、0.59%、1.13%、0.99%、1.22%、1.07%、1.41% 和 0.78% ($n=9$)。15 批样品提取出 3 个主成分, 聚类分析分成 2 类。**结论** 以氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯同步测定的 HPLC 法可用于头风痛丸多指标质量评价。

关键词: 头风痛丸; 氧化前胡素; 欧前胡素; 异欧前胡素; 聚类分析; 主成分分析; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)09-1807-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.09.005

Determination of eight components in Toufengtong Pills by HPLC and comprehensive evaluation of chemometrics

JIAO Yuan-yuan¹, TIAN Guang-lin²

1. Department of Pharmacy, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou 450000, China

2. Department of New Drug Development, Suicheng Pharmaceutical Co., Ltd, Zhengzhou 451100, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of oxypeucedanin, imperatorin, isoimperatorin, senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, sedanolide, and ligustilide in Toufengtong Pills by HPLC and its chemometrics quality evaluation. **Methods** The separation and detection was performed on a Waters Symmetryshield C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with linear gradient elution of methanol-0.1% aqueous acetic acid. The detection wavelengths were set at 310 nm (0—22 min for oxypeucedanin, imperatorin, and isoimperatorin) and 280 nm (22—60 min for senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, sedanolide, and ligustilide). The column temperature was 30 ℃, the flow rate was set at 1.0 mL/min, and the injection volume was 10 μL. The principal component analysis and cluster analysis were conducted for the content results of eight constituents in Toufengtong Pills by statistical software. **Results** The linear ranges of eight components were 14.27—356.75, 10.85—271.25, 4.09—102.25, 0.58—14.50, 0.96—24.00, 2.54—63.50, 1.22—30.50, 4.89—122.25 μg/mL ($r \geq 0.9992$), whose average recoveries were 100.05%, 99.50%, 99.38%, 97.32%, 96.98%, 97.78%, 96.93%, and 98.91% with the RSD values of 0.66%, 0.59%, 1.13%, 0.99%, 1.22%, 1.07%, 1.41%, and 0.78% ($n=9$), respectively. Three main components belonged to the samples of the 15 batches of samples, and the samples of 15 batches of Toufengtong Pills could be divided into 2 categories. **Conclusion** Simultaneous determination of oxypeucedanin, imperatorin, isoimperatorin, senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, sedanolide, and ligustilide by HPLC can be used to evaluate the quality of Toufengtong Pills.

Key words: Toufengtong Pills; oxypeucedanin; imperatorin; isoimperatorin; cluster analysis; main component analysis; HPLC

收稿日期: 2021-06-11

基金项目: 河南省重大科技专项(创新示范专项)项目(191110311100)

作者简介: 焦媛媛(1988—), 女, 主管药师, 硕士, 主要从事药物质量控制及医院药学研究工作。E-mail: rz067065@163.com

头风痛丸由白芷、川芎和绿茶加工而成,有祛风止痛的功效,主要用于偏头痛、眉棱骨痛、额窦炎,对于偏头痛引起的头痛、眉棱骨痛、眩晕、心烦易怒、失眠多梦、口干口苦等症状有明显的改善作用^[1]。头风痛丸处方中白芷可以解表散寒、祛风止痛、宣通鼻窍,其主要药效成分为香豆素类成分(氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素);川芎能活血行气、祛风止痛,主要含内酯类成分(洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯和藁本内酯)。头风痛丸的标准^[2]和相关文献报道^[3-4]均仅对欧前胡素进行定量分析。中药材及中药复方制剂中化学成分复杂,单一质控指标很难全面反映产品的整体质量差异,因此为全面保障头风痛丸的质量多方位可控性,本实验采用 HPLC 法对头风痛丸中氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯 8 种成分进行了同步定量分析,同时将两个厂家 15 批头风痛丸样品的测定数据采用统计软件进行聚类分析和主成分分析,以期到头风痛丸标准的提升和质量全面监管提供方法。

1 仪器与试药

Waters Alliance 2695 型高效液相色谱仪(Waters 公司); AB265-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

欧前胡素(质量分数 99.0%,批号 110826-201918)、异欧前胡素(质量分数 99.6%,批号 110827-201812)对照品均购自中国食品药品检定研究院;氧化前胡素(质量分数 99.5%,批号 PRF20110643)、洋川芎内酯 I(质量分数 98.0%,批号 PRF15121423)、洋川芎内酯 A(质量分数 99.5%,批号 PRF8031301)、瑟丹酸内酯(质量分数 98.5%,批号 PRF20033024)、藁本内酯(质量分数 99.2%,批号 PRF8070601)对照品均购自成都普瑞法科技开发有限公司,洋川芎内酯 H 对照品(质量分数 99.6%,批号 17092822)购自上海同田生物技术有限公司。甲醇为色谱级别,乙酸为分析纯。

头风痛丸分别购自吉林吉春制药股份有限公司(规格 6 g/袋,批号 190203、190302、190801、190901、191102、200603、200801、201102,编号依次为 S1~S8)、吉林省康福药业有限公司(规格 6 g/袋,批号 20190302、20190604、20191101、20191103、20200302、20201102、20201103,编号

依次为 S9~S15)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取各对照品适量,用 70%甲醇制成氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯质量浓度分别为 2.854、2.170、0.818、0.116、0.192、0.508、0.244、0.978 mg/mL 的混合贮备液。精密吸取混合贮备液适量,用 70%甲醇稀释 20 倍,作为对照品溶液(8 种成分的质量浓度分别为 142.7、108.5、40.9、5.8、9.6、25.4、12.2、48.9 $\mu\text{g/mL}$)。

2.1.2 供试品溶液的制备 取头风痛丸适量,研细后取 2 g,精密称定于锥形瓶中,精密加 70%甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 45 min,放冷补足质量,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得。按头风痛丸标准中的处方和制法,分别制备不含白芷、川芎的阴性供试品,同法制成阴性供试品溶液。

2.2 色谱条件

Waters Symmetryshield C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.1%冰醋酸溶液为流动相,梯度洗脱(0~10.0 min, 35.0%甲醇; 10.0~22.0 min, 35.0%~58.0%甲醇; 22.0~48.0 min, 58.0%~80.0%甲醇; 48.0~60.0 min, 80.0%~35.0%甲醇),检测波长分别为 310 nm(0~22 min 检测氧化前胡素、欧前胡素和异欧前胡素)^[5-9]、280 nm(22~60 min 检测洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯)^[10-13],柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,体积流量 1.0 mL/min,进样 10 μL 。

2.3 线性关系考察

精密吸取混合贮备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别用 70%甲醇定容至 20 mL,得到 6 个混合对照品溶液,分别依法进样分析,以质量浓度对相应峰面积进行线性回归,结果见表 1。

2.4 系统适用性

对照品溶液和供试品溶液依法进样分析,结果见图 1。结果头风痛丸供试品溶液中 8 种目标成分与相邻色谱峰分离度均大于 1.5,理论板数按 8 种成分计均大于 5 500,并且阴性供试品对 8 种成分的检测无干扰。

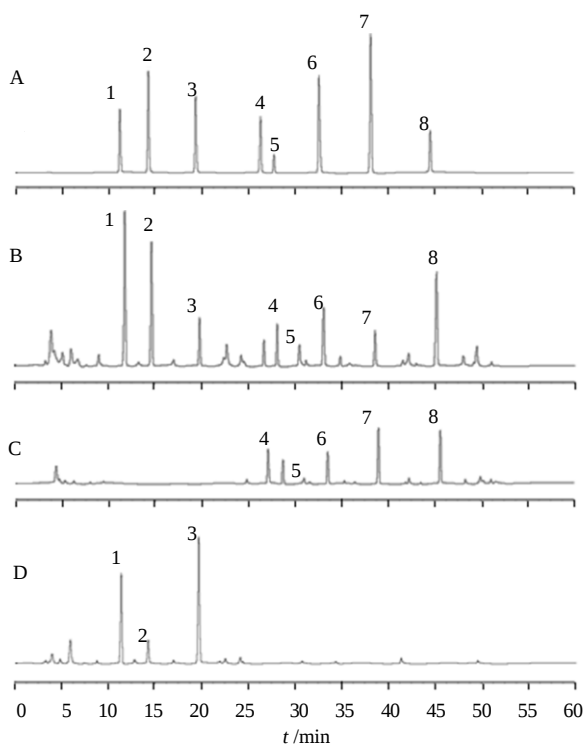
2.5 精密度试验

取对照品溶液,依法连续进样分析 6 次,测定

表 1 8 个分析物的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, and linear ranges of eight constituents

成分	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
氧化前胡素	$Y=3.203\ 8\times 10^6 X-1\ 305.9$	0.999 7	14.27~356.75
欧前胡素	$Y=2.741\ 9\times 10^6 X+961.8$	0.999 3	10.85~271.25
异欧前胡素	$Y=2.105\ 2\times 10^6 X+1\ 157.3$	0.999 9	4.09~102.25
洋川芎内酯 H	$Y=8.160\ 4\times 10^5 X-367.0$	0.999 6	0.58~14.50
洋川芎内酯 I	$Y=1.207\ 5\times 10^6 X-444.2$	0.999 8	0.96~24.00
洋川芎内酯 A	$Y=1.835\ 1\times 10^6 X+697.5$	0.999 5	2.54~63.50
瑟丹酸内酯	$Y=1.583\ 9\times 10^6 X-725.4$	0.999 5	1.22~30.50
藁本内酯	$Y=1.902\ 7\times 10^6 X-1\ 066.1$	0.999 2	4.89~122.25



1-氧化前胡素 2-欧前胡素 3-异欧前胡素 4-洋川芎内酯 H
5-洋川芎内酯 I 6-洋川芎内酯 A 7-瑟丹酸内酯 8-藁本内酯
1-oxypeucedanin 2-imperatorin 3-isoperimperatorin 4-senkyunolide H
5-senkyunolide I 6-senkyunolide A 7-sedanolidide 8-ligustilide

图 1 混合对照品 (A)、头风痛丸 (B)、缺白芷阴性样品 (C) 和缺川芎阴性样品 (D) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Toufengtong Pills (B), sample without *Angelica Dahuricae Radix* (C), and sample without *Chuanxiong Rhizoma* (D)

峰面积值, 计算得氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯峰面积的 RSD 值分别为

0.53%、0.76%、1.04%、1.29%、1.12%、0.98%、1.18%、0.88%。

2.6 重复性试验

取头风痛丸样品 (编号 S1) 6 份, 制备供试品溶液, 依法进样分析, 计算得氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯质量分数的 RSD 值分别为 1.32%、1.47%、1.66%、1.89%、1.74%、1.61%、1.80%、1.53%。

2.7 稳定性试验

取头风痛丸供试品溶液 (编号 S1) 于配制后 0、2、6、12、18、24 h 依法进样分析, 计算得氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯峰面积的 RSD 值分别为 0.64%、0.90%、1.13%、1.36%、1.25%、1.07%、1.29%、1.11%, 表明头风痛丸供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验

取头风痛丸 (编号 S1) 9 份, 研细后每份取 1 g, 精密称定, 3 份作为 1 组, 每组分别精密加入对照品溶液 (氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯的质量浓度分别为 1.792、1.397、0.576、0.089、0.134、0.351、0.167、0.708 mg/mL) 0.8、1.0、1.2 mL, 制备供试品溶液, 依法进样分析, 计算得 8 种成分的平均回收率分别为 100.05%、99.50%、99.38%、97.32%、96.98%、97.78%、96.93%、98.91%, RSD 值分别为 0.66%、0.59%、1.13%、0.99%、1.22%、1.07%、1.41%、0.78% ($n=9$)。

2.9 样品测定

取头风痛丸样品 15 批 (编号 S1~S15), 制备

供试品溶液, 依法进样分析, 按外标法计算氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋

川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯的质量分数, 结果见表 2。

表 2 头风痛丸中氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Results of oxypeucedanin, imperatorin, isoimperatorin, senkyunolide H, senkyunolide I, senkyunolide A, sedanolide, and ligustilide in Toufengtong Pills ($n=3$)

编号	质量分数/(mg g ⁻¹)							
	氧化前胡素	欧前胡素	异欧前胡素	洋川芎内酯 H	洋川芎内酯 I	洋川芎内酯 A	瑟丹酸内酯	藁本内酯
S1	1.802	1.416	0.579	0.087	0.131	0.356	0.164	0.713
S2	1.955	1.496	0.563	0.101	0.150	0.352	0.171	0.708
S3	2.007	1.520	0.691	0.104	0.146	0.397	0.163	0.839
S4	2.162	1.318	0.660	0.096	0.149	0.415	0.189	0.795
S5	1.906	1.376	0.506	0.079	0.106	0.387	0.162	0.721
S6	1.795	1.575	0.598	0.088	0.155	0.409	0.195	0.844
S7	1.776	1.653	0.615	0.105	0.157	0.407	0.163	0.691
S8	1.936	1.666	0.622	0.096	0.148	0.380	0.182	0.810
S9	1.470	1.685	0.649	0.095	0.153	0.405	0.177	0.604
S10	1.529	1.412	0.493	0.072	0.111	0.289	0.188	0.595
S11	1.608	1.397	0.508	0.076	0.104	0.303	0.164	0.712
S12	1.442	1.634	0.515	0.083	0.109	0.316	0.161	0.577
S13	1.181	1.669	0.637	0.091	0.154	0.426	0.181	0.606
S14	1.493	1.466	0.499	0.071	0.118	0.309	0.176	0.809
S15	1.605	1.475	0.518	0.082	0.107	0.330	0.163	0.647

2.10 化学计量学分析

2.10.1 聚类分析 为考察不同厂家、不同批次头风痛丸中氧化前胡素、欧前胡素、异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯含量的差异, 使用 SPSS 26.0 统计软件, 采用组间连接聚类法, 以欧氏距离为测度, 对两个厂家的 15 批头风痛丸测定数据进行分析(图 2)。结果显示, 15 批头风痛丸样品聚为 2 类, 样品 S1~S8 和 S9~S15 各聚为一类。从分类结果可以看出, 同一厂家生产的头风痛丸聚为一类, 可能与生产厂家所用设备、生产过程控制参数有关; 但同一厂家的产品中目标化合物含量仍有一定波动, 可能与生产时所用的原药材产地、采收季节、炮制方法相关。因此在生产过程中, 需要固定原药材来源, 细化炮制参数, 确保产品均一、稳定、安全。

2.10.2 主成分分析 采用 SPSS 26.0 统计软件对两个厂家的 15 批头风痛丸测定数据进行主成分分析, 将表 2 测得的数据导入软件, 得到表 3、4。可以看出, 以特征值大于 1 为提取标准, 前 3 个主成

分的累积方差贡献率达到 87.470%。异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 A 组成了主成分 1 的信息, 是对第 1 主成分影响较大的特征向量; 氧化前胡素、欧前胡素和藁本内酯组成了主成分 2 的信息, 是对第 2 主成分影响较大的特征向量; 瑟丹酸内酯组成了主成分 3 的信息, 是对第 3 主成分影响较大的特征向量。

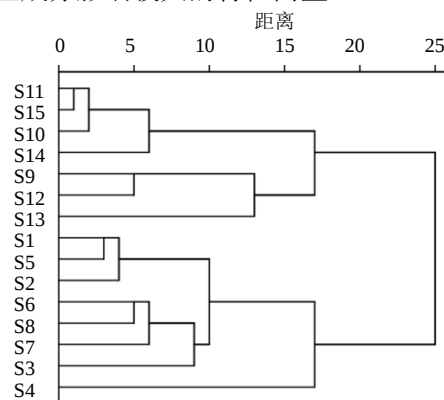


图 2 头风痛丸聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis tree diagram of Toufengtong Pills

表3 主成分特征值和方差贡献率

Table 3 Characteristic value and variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.020	50.256	50.256
2	1.877	23.468	73.724
3	1.100	13.745	87.470
4	0.445	5.557	93.026
5	0.297	3.715	96.742
6	0.159	1.989	98.731
7	0.091	1.132	99.863
8	0.011	0.137	100.000

表4 成分矩阵

Table 4 Composition matrix table

成分	主成分		
	1	2	3
氧化前胡素	0.446	0.814	-0.233
欧前胡素	0.425	-0.788	-0.038
异欧前胡素	0.938	-0.072	-0.041
洋川芎内酯 H	0.894	-0.071	-0.374
洋川芎内酯 I	0.946	-0.164	0.144
洋川芎内酯 A	0.885	-0.087	0.002
瑟丹酸内酯	0.315	0.053	0.928
藁本内酯	0.430	0.739	0.141

3 讨论

3.1 流动相的选择

在选择流动相时,分别考察了甲醇-水^[5]、乙腈-水^[6]、甲醇-0.1%醋酸溶液^[7]、乙腈-0.1%醋酸溶液^[13]对8个成分进行梯度洗脱。结果显示以甲醇-0.1%醋酸溶液梯度洗脱时分离度良好,峰形对称度良好,检验用时合理。

3.2 供试品溶液制备方式的确定

在供试品溶液制备时,考虑到头痛丸在生产时仅对原药材进行了粉碎过筛,分别考察了不同提取方式:超声^[6-10,13]和回流^[11-12];不同提取溶剂:甲醇^[5-10]和70%甲醇^[11-13]及不同提取时间:30、45、60 min对头痛丸中目标成分的综合提取效率、杂质的影响,结果表明70%甲醇回流提取45 min时,8个成分可以提取完全,杂质干扰少。

本实验以头痛丸中氧化前胡素、欧前胡素、

异欧前胡素、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 A、瑟丹酸内酯、藁本内酯为目标化合物,采用 HPLC 进行了同步测定,通过方法学考察、15 批测定数据的聚类分析和主成分分析,有效地反映了头痛丸中多指标定量信息,为其质量控制和质量标准提升提供了实验方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张太君,张玲,谯志文,等. 头痛丸治疗偏头痛(风痰证)的临床观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2011, 11(4): 359-361.
- [2] 国家药品监督管理局药品标准 WS3-B-1729-94-2017[S]. 2017.
- [3] 邓超澄,冯看,何春玲,等. 头痛丸质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 140-142.
- [4] 宋莉,乔蓉霞,刘海静. 头痛丸定性定量方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2236-2239.
- [5] 张方亮,魏悦,孙燕燕,等. HPLC 法同时测定白芷香豆素提取物中7种成分在大鼠血浆内的含量[J]. 天津药学, 2019, 31(5): 1-5.
- [6] 马俊,曹赟,陈玲,等. 基于 UPLC 及一测多评法测定不同等级白芷药材中4种香豆素类成分[J]. 中药材, 2018, 41(10): 2372-2376.
- [7] 张闯,陈世雨,李葆林,等. 蛇床子配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究及6种香豆素类成分含量测定[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1530-1536.
- [8] 李敏,王晓楠,张涛,等. 正交试验优化白芷的水提取工艺研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(9): 1745-1749.
- [9] 李昌勤,彭琳娜,姚辰,等. 加热处理对白芷中欧前胡素、异欧前胡素稳定性及酪氨酸酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 845-849.
- [10] 马钰,王帅,孟宪生,等. 高效液相色谱法对大川芎片中5种成分的含量测定[J]. 药学研究, 2017, 36(3): 135-137.
- [11] 刘娟,冯芮,蒲忠慧,等. 指纹图谱结合 HPLC 定量分析在中药川芎质量评价中的应用研究[J]. 中药材, 2019, 42(2): 353-357.
- [12] 刘尹,郭伦锋,郑龙. 不同产地川芎 UPLC 指纹图谱研究[J]. 贵州医药, 2020, 44(11): 1699-1701.
- [13] 彭桐,王引权,张亚丽,等. 临洮当归与岷县当归8种有效成分比较[J]. 甘肃中医药大学学报, 2020, 37(6): 29-33.

[责任编辑 解学星]