

HPLC-CAD 法测定元胡止痛胶囊中生物碱和香豆素

高攀, 王津燕, 吴环宇, 瞿晶田

天津中医药大学第一附属医院 药学部, 天津 300193

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法联合二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 法同时测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素。 **方法** 采用 HPLC-CAD 法, Thermo Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-10 mmol/L 甲酸铵 (甲酸调 pH 4.0), 梯度洗脱; 体积流量 0.8 mL/min; CAD 雾化器温度为 35 ℃; 柱温 35 ℃; 进样量为 20 μL。 **结果** 延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素分别在 0.041~1.020、0.013~0.320、0.068~1.700、0.041~1.020、0.101~2.520、0.039~0.980 μg 与峰面积线性关系良好; 平均回收率分别为 98.41%、98.89%、98.32%、99.35%、98.05%、98.67%, RSD 值分别为 0.9%、1.4%、0.7%、1.1%、0.7%、0.9%。 **结论** 该方法准确、简便、灵敏度高, 可用于元胡止痛胶囊中生物碱和香豆素类多成分的质量控制研究。

关键词: 元胡止痛胶囊; 延胡索乙素; 盐酸黄连碱; 去氢延胡索甲素; 延胡索甲素; 欧前胡素; 异欧前胡素; 高效液相色谱法联合二极管阵列检测器

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)02-0299-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.02.006

Determination of alkaloids and coumarins in Yuanhu Zhitong Capsules by HPLC-DAD

GAO Pan, WANG Jin-yan, WU Huan-yu, QU Jing-tian

Department of Pharmacy, First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-DAD method for simultaneous determination of tetrahydropalmatine, coptisine hydrochloride, dehydrocorydaline, corydaline, imperatorin, and isoimperatorin in Yuanhu Zhitong Capsules. **Methods** HPLC-CAD method was adopted on Thermo Hypersil BDS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 10 mmol/L ammonium formate (formic acid tone pH 4.0) with gradient elution. The flow rate was 0.8 mL/min, CAD atomizer temperature was 35℃, temperature of column was set at 35℃, and volume of injection was 20 μL. **Results** The linear ranges of tetrahydropalmatine, coptisine hydrochloride, dehydrocorydaline, corydaline, imperatorin, and isoimperatorin were 0.041 — 1.020, 0.013 — 0.320, 0.068 — 1.700, 0.041 — 1.020, 0.101 — 2.520, and 0.039 — 0.980 μg, respectively. The average recoveries were 98.41%, 98.89%, 98.32%, 99.35%, 98.05%, and 98.67%, with RSD of 0.9%, 1.4%, 0.7%, 1.1%, 0.7%, and 0.9%, respectively. **Conclusion** The method is accurate, simple and sensitive, can be used for the quality control of alkaloids and coumarins in Yuanhu Zhitong Capsules.

Key words: Yuanhu Zhitong Capsules; tetrahydropalmatine; coptisine hydrochloride; dehydrocorydaline; corydaline; imperatorin; isoimperatorin; HPLC-DAD

元胡止痛胶囊是由醋制延胡索、白芷制成的中药复方制剂, 具有理气、活血、止痛的功效, 临床上常用于气滞血瘀引起的胃痛、头痛、胁痛、痛经等症^[1]。其中延胡索辛散、苦泄, 善于活血行气止痛, 主要活性成分为生物碱类; 白芷辛散, 善于通窍止痛、散寒解表, 主要活性成分为香豆素类^[2]。

元胡止痛方具有镇痛^[3-5]、抗炎^[6]、抗焦虑^[7]等作用。元胡止痛胶囊现行质量标准收载于《中国药典》2015年版一部, 其中规定元胡止痛胶囊的含量测定仅以延胡索乙素为指标性成分^[1]。现有文献报道多为测定元胡止痛胶囊中欧前胡素、异欧前胡素、延胡索乙素中一种或两种成分^[8-12]。对于化学成分复杂的

收稿日期: 2018-09-14

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81603648)

作者简介: 高攀 (1979—), 女, 河北人, 主管药师, 本科, 研究方向为中药学、中药鉴定学、中成药。E-mail: lntnbhz@sina.com

中药复方制剂,多指标成分控制才能更好地确保产品的质量。电雾式检测器(CAD)为一种新型检测器,与传统的紫外、蒸发光检测器比较具有灵敏度高和重复性好等优点^[13]。因此本研究建立了以HPLC-CAD同时测定元胡止痛胶囊中4种生物碱类成分延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素和2种香豆素类成分欧前胡素、异欧前胡素的方法,实现了该品种的多成分质量控制,该方法准确、高效,重复性好,为元胡止痛胶囊的质量标准规范化研究提供依据。

1 仪器与材料

Thermo Ultimate 3000 高效液相色谱仪联合 Corona Veo 电雾式检测器-L9838 二极管阵列检测器(美国 Thermo Fisher 公司); Thermo Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Dikma 公司); DS-350L 型超声仪(福州德森精工有限公司); MSE 型百万分之一天平,CPA225D 型十万分之一天平, SQP 型千分之一天平(德国 Sartorius 公司)。

元胡止痛胶囊(四川锡成药业有限公司,批号 20170509、20170522、20170805; 云南龙发制药有限公司,批号 20170323、20170727、20171109; 济南利蒙制药有限公司,批号 17100601、16120603); 延胡索乙素(批号 110301-201708)、盐酸黄连碱(批号 120325-201803)、去氢延胡索甲素(批号 110732-201702)、欧前胡素(批号 111026-201609)、异欧前胡素(批号 110726-201611)对照品质量分数均≥98%,均购自中国食品药品检定研究院; 延胡索甲素对照品质量分数≥98%,购自成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-17020105; 乙腈(HPLC 级,美国 Fisher 公司); 甲醇(分析纯,天津康科德科技有限公司); 甲酸铵(LCMS 级,美国 Sigma 公司); 甲酸(LCMS 级,美国 Fisher 公司); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Thermo Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-10 mmol/L 甲酸铵(甲酸调 pH 4.0)(B), 梯度洗脱(0~10 min, 15% A; 10~25 min, 15%~30% A; 25~40 min, 30%~40% A; 40~50 min, 40%~70% A); 体积流量 0.8 mL/min; 电雾式检测器(CAD)串联二极管阵列检测器(DAD), CAD 雾化器温度为 35 ℃;

柱温 35 ℃; 进样量为 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取去氢延胡索甲素、欧前胡素对照品适量,置于 5 mL 量瓶中,加 60%乙醇溶解并稀释至刻度,分别制成含去氢延胡索甲素、欧前胡素 1.70、2.52 mg/mL 的对照品储备液; 分别精密称取延胡索乙素、盐酸黄连碱、延胡索甲素、异欧前胡素适量,置 10 mL 量瓶中,加 60%乙醇溶解并稀释至刻度,分别制成含延胡索乙素、盐酸黄连碱、延胡索甲素、异欧前胡素 1.01、0.32、1.02、0.98 mg/mL 的对照品储备液; 分别精密移取上述各对照品储备液 1.0 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,加 60%乙醇稀释至刻度,摇匀,制成含延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素 101、32、170、102、252、98 μg/mL 的混合对照品母液; 精密移取混合对照品母液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加 60%乙醇稀释至刻度,摇匀,制成含延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素 10.1、3.2、17.0、10.2、25.2、9.8 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品和阴性样品溶液的制备

取元胡止痛胶囊 20 粒,将内容物倾出,混匀,研细,取约 1.0 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加 60%乙醇 40 mL,超声处理(功率 150 W,频率 40 kHz)45 min,放冷,加 60%乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

按元胡止痛胶囊处方比例和制法分别制备不含延胡索、白芷的粉末,按供试品溶液的制备方法操作,分别得缺延胡索、白芷的阴性样品溶液。

2.4 系统适用性试验

取混合对照品溶液,供试品溶液和阴性样品溶液各 20 μL,进样测定,记录各色谱图,见图 1。结果显示延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素与相邻各色谱峰的分离度均大于 1.5,理论塔板数均不低于 7 000,且阴性样品结果显示无测定干扰。

2.5 线性关系考察

取混合对照品母液分别稀释 2、4、10、20、50 倍,分别进样测定,记录各成分相应峰面积。以延胡索乙素; 盐酸黄连碱; 去氢延胡索甲素; 延胡索甲素; 欧前胡素; 异欧前胡素峰面积值为纵坐标,进样质量为横坐标,绘制标准曲线,进行线性回归,得线性回归方程,结果见表 1。

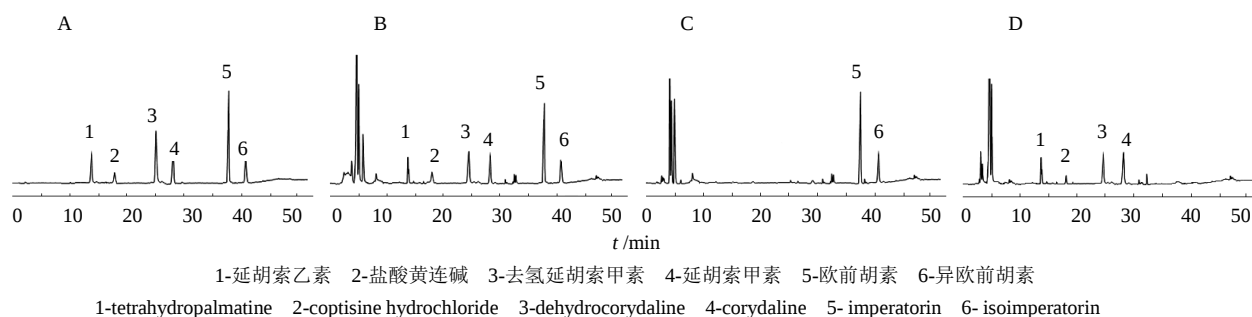


图 1 混合对照品溶液 (A)、元胡止痛胶囊 (B)、缺延胡索阴性样品溶液 (C) 和缺白芷阴性样品溶液 (D) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Yuanhu Zhitong Capsules (B), negative sample without *Corydalis Rhizoma* (C), and negative sample without *Angelicae dahuricae Radix* (D)

表 1 各成分的线性方程、相关系数和线性范围

Table 1 Linear equations, correlation coefficients, and linear range

对照品	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
延胡索乙素	$Y=2.072 X+0.013$	0.999 1	0.040 4~1.010 0
盐酸黄连碱	$Y=3.411 X-0.002$	0.999 4	0.012 8~0.320 0
去氢延胡索甲素	$Y=2.075 X+0.007$	0.999 4	0.068 0~1.700 0
延胡索甲素	$Y=2.492 X-0.021$	0.999 7	0.040 8~1.020 0
欧前胡素	$Y=1.651 X-0.026$	0.999 1	0.100 8~2.520 0
异欧前胡素	$Y=1.671 X-0.003$	0.999 3	0.039 2~0.980 0

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样 6 次,计算各成分峰面积的 RSD 值,结果显示延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素峰面积的 RSD 值分别为 0.7%、1.2%、1.2%、0.9%、1.4%、1.1%。

2.7 重复性试验

取批号 20170509 元胡止痛胶囊样品适量,平行制备 6 份供试品溶液,分别进样测定,并以外标法计算各成分质量分数。结果样品中延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素质量分数的 RSD 值分别为 1.2%、1.1%、0.9%、1.2%、0.8%、1.3%。

2.8 稳定性试验

取批号 20170509 元胡止痛胶囊样品,按照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,在室温下分别放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样测定峰面积值,结果显示延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素峰面积的 RSD 值分别为 1.4%、0.8%、1.2%、1.1%、0.9%、1.2%。结果表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内的稳定性良好。

2.9 回收率试验

取批号 20170509 元胡止痛胶囊样品(含延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素 0.11、0.02、0.13、0.10、0.26、0.10 mg/粒) 6 份,每份 1.0 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,分别加入延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素对照品储备液适量,制备供试品溶液,进样分析,计算回收率。结果显示延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素的平均回收率分别为 98.41%、98.89%、98.32%、99.35%、98.05%、98.67%,RSD 值分别为 0.9%、1.4%、0.7%、1.1%、0.7%、0.9%。

2.10 样品测定

取各批号的元胡止痛胶囊样品适量,制备供试品溶液,各吸取 10 μL 进样测定,记录各色谱峰面积,以外标法计算各批次样品中活性成分的质量分数,结果见表 2。结果表明,6 种成分为不同批次元胡止痛胶囊样品中的共有成分,延胡索乙素的质量分数均符合药典标准 (0.075 mg/粒)^[1],且不同批次样品中 6 种活性成分的质量分数差异较小,说明制剂处方工艺较稳定,从而有效地保证了药品质量。

表2 元胡止痛胶囊中活性成分的测定结果 (n=2)

Table 2 Determination of active components in Yuanhu Zhitong Capsules (n = 2)

厂家	批号	平均粒质量/g	质量分数/(mg 粒)					
			延胡索乙素	盐酸黄连碱	去氢延胡索 甲素	延胡索甲素	欧前胡素	异欧前胡素
锡成药业	20170509	0.251 2	0.11	0.02	0.13	0.10	0.26	0.10
	20170522	0.250 2	0.12	0.02	0.14	0.11	0.23	0.11
	20170805	0.250 6	0.10	0.03	0.11	0.12	0.24	0.09
龙发制药	20170323	0.249 6	0.12	0.02	0.10	0.09	0.23	0.12
	20170727	0.250 4	0.09	0.01	0.11	0.09	0.22	0.11
	20171109	0.250 5	0.11	0.02	0.13	0.12	0.24	0.08
利蒙制药	17100601	0.251 0	0.12	0.02	0.11	0.09	0.23	0.08
	16120603	0.250 2	0.10	0.02	0.14	0.11	0.22	0.11

将延胡索乙素、欧前胡素和异欧前胡素的 CAD 检测结果与文献报道^[5-8]的紫外检测器检测结果相比,质量分数结果基本一致,说明 CAD 法检测准确、可靠。

3 讨论

3.1 检测指标的选择

延胡索药性辛散、苦泄,具有显著的活血行气止痛之功效,其代表性成分主要为延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素等生物碱类成分,有镇痛、扩张血管等多种活性作用,属于辛兼苦味^[14]。白芷性温辛散,能祛风止痛、散寒解表,其代表性成分主要为欧前胡素、异欧前胡素等香豆素类成分,具有抗炎、镇痛等药理作用,属于辛味^[15]。选取延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素、异欧前胡素 6 种活性成分作为本品的质量控制指标可全面反映元胡止痛胶囊的质量。

3.2 检测器的选择

取各成分对照品溶液进样分析,采用 DAD 检测器进行全波长扫描发现延胡索生物碱类成分的最大吸收波长均为 280 nm,而欧前胡素和异欧前胡素在 248、301 nm 处有最大吸收,并将以上各波长下样品的 DAD 图谱与 CAD 检测图谱进行比较,发现 CAD 检测器获得的色谱峰个数显著多于 DAD 图谱,且灵敏度高,基线更平稳,故选择 CAD 检测器进行各成分的含量测定研究。

3.3 流动相的选择

本实验中比较了乙腈-10 mmol/L 甲酸铵、甲醇-10 mmol/L 甲酸铵、乙腈-10 mmol/L 乙酸铵、

甲醇-10 mmol/L 乙酸铵等几种不同流动相体系,结果显示乙腈-10 mmol/L 甲酸铵系统下各成分分离度较佳,并考察采用甲酸分别调节 pH 3.0、4.0、5.0,结果发现甲酸调节 pH 4.0 条件下基线平稳,各色谱峰对称度、理论塔板数均为最佳。

3.4 供试品溶液制备方法的选择

元胡止痛胶囊的制剂工艺显示,药材的提取溶剂为 60%乙醇^[1],因此本实验中供试品溶液的制备采用 60%乙醇超声,使样品粉末溶解;其次对超声提取时间(30、45、60 min)进行考察,结果表明超声 45 min 即可提取完全。

本实验建立了 HPLC-CAD 法同时测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素、盐酸黄连碱、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素 6 种有效成分的分析方法,且方法准确、简便、灵敏度高,为元胡止痛胶囊的质量控制提供了更全面的方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 603-604.
- [2] Zhang H B, Zhang T J, Xu J, et al. Rapid analysis and identification of absorbed components and their metabolites of Yuanhu Zhitong Dropping Pill in rat plasma and brain tissue using UPLC-Q-TOF/MS with multivariate statistical analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 154-163.
- [3] Yuan C S, Mehendale S R, Wang C Z, et al. Effects of *Corydalis yanhusuo* and *Angelicae dahuricae* on cold pressor-induced pain in humans: A controlled trial [J]. *J Clin Pharmacol*, 2004, 44(11): 1323-1327.
- [4] 韩彦琪, 孟凡翠, 许 浚, 等. 基于网络药理学方法的元胡止痛滴丸治疗原发性痛经的配伍合理性研究 [J].

- 中草药, 2017, 48(3): 526-532.
- [5] 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.
- [6] 冯 玥, 朱振娜, 胡金芳, 等. 元胡止痛滴丸对痛经模型镇痛作用的配伍合理性和比较优势研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(7): 917-921.
- [7] Leung W C, Zheng H, Huen M, et al. Anxiolytic-like action of orally administered dl-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(5): 775-779.
- [8] 张军荣, 李建利. HPLC 测定元胡止痛胶囊欧前胡素的研究 [J]. 四川中医, 2015, 33(1): 93-95.
- [9] 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.
- [10] 何 丹, 杨 林, 张景勃. UPLC 法测定元胡止痛胶囊中欧前胡素和异欧前胡素的含量 [J]. 分析实验室, 2013, 32(10): 87-90.
- [11] 吴雪松, 许 浚, 张喜民, 等. 元胡止痛方的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1081-1095
- [12] 杨 芳, 万 丽, 杨荣平, 等. 一测多评法测定元胡止痛胶囊中欧前胡素、异欧前胡素和延胡索乙素的含量 [J]. 中国药房, 2012, 23(32): 3046-3049.
- [13] 刘 路, 高 旋, 杨永健. HPLC-电雾式检测器的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(3): 227-231.
- [14] 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.
- [15] 于定荣, 麻印莲, 顾雪竹, 等. 不同提取方法对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素的影响及镇痛作用的比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2405-2407.