

元胡止痛片 HPLC 指纹图谱研究

王云龙^{1,2}, 李延雪², 邵礼梅², 许世伟², 冯振来², 杨立志², 姜雪敏²

1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016
2. 鸡西市药品检验所, 黑龙江 鸡西 158100

摘要: 目的 建立元胡止痛片 HPLC 指纹图谱。方法 采用 Extent C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 6.5, A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱程序为: 0~45 min, 88%~40% A; 45~70 min, 40%~20% A; 70~75 min, 20%~10% A; 75~80 min, 10%~5% A; 80~85 min, 5% A; 检测波长 280 nm, 柱温 35 °C, 体积流量 1.0 mL/min。结果 在 HPLC 色谱指纹图谱中, 确定了 16 个共有峰, 建立了元胡止痛片的共有模式, 在 14 批元胡止痛片样品中有 10 批样品的指纹图谱相似度在 0.9 以上。结论 本法结果准确、重现性好, 为元胡止痛片 HPLC 指纹图谱质量控制提供了参考。

关键词: 元胡止痛片; 相似度; 指纹图谱; 共有模式; 质量控制; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)03-0495-03

HPLC fingerprint of Yuanhu Zhitong Tablets

WANG Yun-long^{1,2}, LI Yan-xue², SHAO Li-mei², XU Shi-wei², FENG Zhen-lai², YANG Li-zhi², JIANG Xue-min²

1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China
2. Jixi Institute for Drug Control, Jixi 158100, China

Key words: Yuanhu Zhitong Tablets; similarity; fingerprint; common model; quality control; HPLC

元胡止痛片为《中国药典》2010 版^[1]一部品种, 由延胡索(醋制)与白芷两味中药组成, 具有理气、活血、止痛的功效; 现版药典仅对其中的延胡索乙素进行了质量控制, 文献报道^[2-6]的多是对其 1 种或少数几种成分进行测定, 而能够从整体上表征其内在特征的指纹图谱研究^[7-8]则鲜见报道。本实验采用 HPLC 法研究了元胡止痛片指纹图谱, 为其质量控制提供了参考。

1 仪器与试剂

岛津 2010A 高效液相色谱仪, 配置四元泵、紫外检测器、自动进样器、柱温箱、LC Soluion 色谱工作站; AG285 电子分析天平。延胡索乙素(批号 110726-200409)、欧前胡素(批号 110826-200410)与异欧前胡素(批号 110827-200407)对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 水为重蒸馏水; 甲醇为色谱纯。共收集 14 批元胡止痛片, 其来源见表 1。

2 方法与结果

表 1 元胡止痛片来源

Table 1 Sources of Yuanhu Zhitong Tablets

样品	来源	样品	来源
1	广西天天乐药业 1	8	广西九连山药业 1
2	吉林六福堂药业	9	广西九连山药业 2
3	山东鲁抗大禹制药厂	10	广西世彪药业 1
4	山西旺龙药业	11	广西世彪药业 2
5	广西天天乐药业 2	12	四川大千药业
6	天津同仁堂药业 1	13	四川蜀中制药厂
7	天津同仁堂药业 2	14	四川省尚善制药厂

2.1 色谱条件

采用 Extent C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 6.5, A) - 甲醇 (B) 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~45 min, 88%~40% A; 45~70 min, 40%~20% A; 70~75 min, 20%~10% A; 75~80 min, 10%~5% A; 80~85 min, 5% A; 检测波长 280 nm, 柱温 35 °C, 体积流量 1.0 mL/min。

收稿日期: 2010-06-15

作者简介: 王云龙 (1978—), 男, 黑龙江省鸡西市人, 主管药师, 沈阳药科大学在职硕士研究生, 现工作单位为黑龙江省鸡西市药品检验所, 从事中药质量检验。Tel: 13836528326 E-mail: wangyunlong090@sina.com

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取欧前胡素、延胡索乙素、异欧前胡素对照品适量，精密称定，置 50 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，制成质量浓度分别为 160.0、74.0、86.4 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 20 片元胡止痛片，糖衣片除去糖衣，研细，取约 2.0 g 片粉，精密称定，置具塞三角瓶中，精密加甲醇-氨水(20:1) 50 mL，称定质量，超声提取 30 min，放冷，重复操作 1 次，并用甲醇-氨水(20:1) 补足减失的质量，提取液滤过后，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度试验 取广西九连山药业 1 样品，按“2.2.2”项下方法操作，在上述色谱条件下，重复进样 6 次，记录色谱指纹图谱。结果各色谱峰对内参比峰(13 号峰，欧前胡素)的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%，符合指纹图谱要求。

2.3.2 重现性试验 取广西九连山药业 1 元胡止痛片样品 6 份，每份 20 片，按“2.2.2”项下方法操作，在上述色谱条件下进样分析，计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，其 RSD 值均小于 5.0%，符合指纹图谱要求。

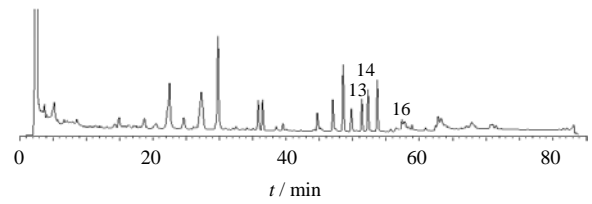
2.3.3 稳定性试验 取广西九连山药业 1 样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于室温下放置，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，其 RSD 值均小于 5.0%，结果表明，元胡止痛片样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 样品测定 按“2.2.2”项下方法制备 14 批供试品溶液，进样测定，记录色谱图。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 参照峰的选择 欧前胡素为元胡止痛片中主要药理活性成分之一，且其量较大易于辨认，峰面积稳定，出峰时间居中，分离度较好，故选定欧前胡素为 HPLC 指纹图谱的参照峰。

2.4.2 特征峰的确定 以 14 批 10 个厂家不同批号的元胡止痛片为对象进行指纹图谱研究。获得包括欧前胡素(13 号峰)在内的 16 个色谱峰。通过比对保留时间和对照品加入法，指认了其中 3 个色谱峰，分别为欧前胡素(13 号峰)、延胡索乙素(14 号峰)、异欧前胡素(16 号峰)。色谱图见图 1。



13-欧前胡素 14-延胡索乙素 16-异欧前胡素
13-imperatorin 14-tetrahydropalmatine 16-isoperimatin

图 1 元胡止痛片对照色谱图

Fig. 1 HPLC reference chromatogram of Yuanhu Zhitong Tablets

2.4.3 元胡止痛片样品聚类分析 将各色谱峰面积相对于称样量与平均片重量化，得到 14×16 矩阵，应用“SPSS”软件对其进行系统聚类分析，采用组间均联法(between-groups linkage)，以余弦(cosine)作为样品相似性的测度。聚类分析将 14 批元胡止痛片样品分为 2 类，结合色谱峰面积相对于称样量与平均片重量化，可判定第 I 类为较好的，第 II 类为一般品。聚类结果见图 2。

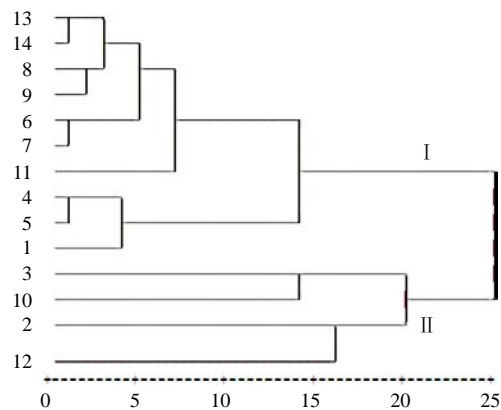


图 2 元胡止痛片聚类谱系图

Fig. 2 Hierarchical cluster analysis of Yuanhu Zhitong Tablets

2.4.4 指纹图谱共有模式确立与相似度评价 结合聚类分析和峰面积量化结果，选取第 I 类 10 批样品建立共有模式。将此 10 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统·研究版(2004 A)”，选取“时间窗”宽度为 0.5 min，经校准后，软件即生成“对照谱图”。参与共有模式建立的样品色谱图和生成的对照谱图以及共有模式图谱见图 3。

再将对照谱图和 14 批样品色谱图全部导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统·检验版(2004 B)”，软件即可计算出样品与对照谱图的相似度数据。试

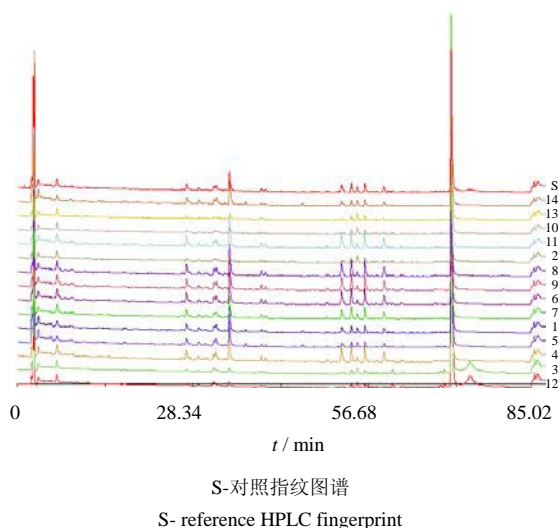


图 3 元胡止痛片对照图谱与 14 批样品图谱

Fig. 3 Reference HPLC fingerprint for 14 samples of Yuanhu Zhitong Tablets

验分析结果表明, 相似度分析结果与系统聚类结果一致, 两种方法得到了相互验证。根据相似度和聚类分析结果, 结合色谱峰面积相对于称样量与平均片重量化, 可确定相似度在 0.90 以上的样品质量较好, 0.90 以下的为质量较差, 结果见表 2。

表 2 元胡止痛片相似度结果

Table 2 Similarity of Yuanhu Zhitong Tablets

样品	相似度	样品	相似度
1	0.903	8	0.968
2	0.823	9	0.959
3	0.796	10	0.782
4	0.912	11	0.922
5	0.936	12	0.857
6	0.941	13	0.930
7	0.979	14	0.931

3 讨论

考察了 3 种不同型号色谱柱: Extent C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、SB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Eclipse-XDB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。结果表明, Extent C₁₈ 柱分离出的色谱峰分离度好、峰数多、稳定性好。故选择 Extent C₁₈ 柱为分析色谱柱。

由于元胡止痛片的化学成分复杂, 极性范围大,

故选择了梯度洗脱。在流动相筛选中, 曾尝试过甲醇-乙酸水, 甲醇-磷酸水, 乙腈-乙酸水, 乙腈-磷酸水系统。结果显示, 乙腈系统分离效果较差, 且易产生基线漂移; 而甲醇-乙酸水, 甲醇-磷酸水系统都有较好的分离度, 相比之下, 甲醇-磷酸水系统的基线更为稳定, 色谱峰个数较多, 磷酸水溶液 pH 值参照延胡索指纹图谱选择 6.5, 因此选择甲醇-0.1%磷酸水溶液 (三乙胺调 pH 6.5) 系统为 HPLC 分析的流动相系统。

采用紫外检测器对元胡止痛片样品进行不同吸收波长考察, 包括 230、254、280、310 nm。结果表明, 280 nm 处各色谱峰强度大、信息丰富、特征性强, 故选择 280 nm 为检测波长。

根据延胡索与白芷的成分及其测定普遍采用的提取方法, 采用甲醇-氨水 (20:1) 为提取溶剂。分别比较了超声振荡和加热回流两种提取方法, 结果表明两种方法得到的 HPLC 指纹图谱全貌和各个色谱峰强度无明显差别, 因超声提取法更为简便, 且不易破坏有效成分, 适合大量样品的快速提取, 因此选择超声振荡提取法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 陈洪宝, 李彩荣, 杨庆胜, 等. 高效液相色谱法测定元胡止痛片中延胡索乙素的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1701-1702.
- [3] 孙 巍, 窦志英, 高 瓊. HPLC 法同时测定元胡止痛片中 3 种有效成分的含量 [J]. 天津中医药, 2006, 23(5): 426-428.
- [4] 王洪志, 李惠芬, 周 静, 等. HPLC 法测定元胡止痛片中欧前胡素和异欧前胡素 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 1018-1019.
- [5] 申 放, 高卫东. 元胡止痛片中欧前胡素和延胡索乙素含量测定提取方法的研究 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(7): 15.
- [6] 汪 玲, 程 贝, 罗 兰, 等. 元胡止痛分散片延胡索乙素的含量测定 [J]. 医药导报, 2009, 28(1): 114.
- [7] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 994-998.
- [8] 赵洪芝, 孟宪生, 叶挺祥, 等. 六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱和模式识别研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 48-51.