

[质 量]

HPLC 法同时测定复方元胡止痛片中 6 种成分

窦增花¹, 杜连平^{2*}

(1. 青海省第四人民医院药械科, 青海 西宁 810000; 2. 青海省藏医药研究所, 青海 西宁 810003)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定复方元胡止痛片(延胡索、香附、川楝子、徐长卿)中 6 种成分的含有量。方法 该药物 70% 乙醇提取液的分析采用依利特 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以 [甲醇-乙腈(1:1)] -0.1% 冰醋酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.2 mL/min; 检测波长 280 nm (原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檗碱) 和 242 nm (α-香附酮)。结果 原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檗碱、α-香附酮分别在 2.15 ~ 41.00 μg/mL ($r = 0.999\ 9$)、2.74 ~ 54.80 μg/mL ($r = 0.999\ 8$)、3.36 ~ 67.20 μg/mL ($r = 0.999\ 6$)、2.67 ~ 53.40 μg/mL ($r = 0.999\ 5$)、1.99 ~ 39.80 μg/mL ($r = 0.999\ 7$)、5.13 ~ 102.60 μg/mL ($r = 0.999\ 8$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率 (RSD) 分别为 97.98% (1.13%)、99.12% (1.58%)、98.33% (0.83%)、99.05% (1.72%)、97.83% (1.42%)、98.64% (0.70%)。结论 该方法准确可靠, 专属性强, 可用于复方元胡止痛片的质量控制。

关键词: 复方元胡止痛片; 原阿片碱; 延胡索乙素; 去氢紫堇碱; 紫堇碱; 四氢小檗碱; α-香附酮; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)02-0312-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.016

Simultaneous determination of six constituents in Compound Yuanhu Zhitong Tablets by HPLC

DOU Zeng-hua¹, DU Lian-ping^{2*}

(1. Department of Drug and Equipment, The Fourth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810000, China; 2. Qinghai Provincial Institute for Tibetan Medicine, Xining 810003, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of six constituents in Compound Yuanhu Zhitong Tablets (an analgesic containing *Corydalis Rhizoma*, *Cyperus Rhizoma*, *Toosendan Fructus* and *Cynanchi paniculati Radix et Rhizoma*). **METHODS** The analysis of 70% ethanol extract of this drug was performed on a Hypersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-acetonitrile (1:1) -0.1% glacial acetic acid flowing at 1.2 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 280 nm for protopine, tetrahydropalmatine, dehydrocorydaline, corydaline and canadine, and 242 nm for α-cyperone. **RESULTS** Protopine, tetrahydropalmatine, dehydrocorydaline, corydaline, canadine and α-cyperone showed good linear relationships within the ranges of 2.15 - 41.00 μg/mL ($r = 0.999\ 9$), 2.74 - 54.80 μg/mL ($r = 0.999\ 8$), 3.36 - 67.20 μg/mL ($r = 0.999\ 6$), 2.67 - 53.40 μg/mL ($r = 0.999\ 5$), 1.99 - 39.80 μg/mL ($r = 0.999\ 7$) and 5.13 - 102.60 μg/mL ($r = 0.999\ 8$), whose average recoveries (RSDs) were 97.98% (1.13%), 99.12% (1.58%), 98.33% (0.83%), 99.05% (1.72%), 97.83% (1.42%) and 98.64% (0.70%), respectively. **CONCLUSION** With good specificity, this accurate and reliable method can be used for the quality control of Compound Yuanhu Zhitong Tablets.

KEY WORDS: Compound Yuanhu Zhitong Tablets; protopine; tetrahydropalmatine; dehydrocorydaline; coryda-

收稿日期: 2016-09-10

作者简介: 窦增花 (1978—), 女, 主管药师, 从事药物质量标准和药理作用研究工作。Tel: 15110959613, E-mail: douzenghuaqinghai@163.com

* 通信作者: 杜连平 (1980—), 男, 助理研究员, 从事藏药新药开发及质量标准研究工作。Tel: 13519781240, E-mail: dulianpingqinghai@163.com

line; canadine; α -cyperone; HPLC

复方元胡止痛片具有疏气止痛功效,临床上主要用于肝胃气痛、胃脘胀痛、胸肋痛、月经痛等症的治疗,该制剂由延胡索(醋制)、香附(醋制)、川楝子、徐长卿4味药材组成。方中延胡索辛、苦、温,归肝、脾经,具有活血、利气、止痛的作用,为君药,并且醋制可发挥其最佳药效,主要有效成分为生物碱,包括原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檗碱等;香附具有理气解郁,调经止痛作用,醋制后主治肝气郁滞、胸闷肋痛、胃病、腹痛、月经不调、痛经等症状,为臣药,其主要成分为 α -香附酮。

该制剂收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第7册,但标准仅规定了其性状及理化鉴定项目,尚无定量检测方法^[1]。为了确保复方元胡止痛片临床用药的安全有效,本实验采用HPLC法,对其中原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檗碱、 α -香附酮含有量同时测定进行,该方法简便准确,可为其质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪(美国Waters公司);XS205DU 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ5200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 复方元胡止痛片购自山西双人药业有限责任公司(片重0.3 g,批号150401、150912、151106)。甲醇为色谱纯;冰醋酸为分析纯;水为重蒸馏水。原阿片碱(110853-201404,含有量99.7%)、延胡索乙素(110726-201516,含有量99.8%)、 α -香附酮(110748-201513,含有量99.7%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;紫堇碱(518-69-4,含有量98.0%)、去氢紫堇碱(83218-34-2,含有量97.5%)、四氢小檗碱(522-97-4,含有量98.0%)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 取样品适量,研细,精密称取2.0 g,置于25 mL量瓶中,加入70%乙醇,超声提取60 min,放冷,加入70%乙醇至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取各对照品适量,置

于6个20 mL量瓶中,70%乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品贮备液(原阿片碱0.410 mg/mL、延胡索乙素0.548 mg/mL、去氢紫堇碱0.672 mg/mL、紫堇碱0.534 mg/mL、四氢小檗碱0.398 mg/mL、 α -香附酮1.026 mg/mL)。分别量取2.0、5.0、5.0、5.0、5.0、5.0 mL,置于同一100 mL量瓶中,加70%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得(原阿片碱0.008 2 mg/mL、延胡索乙素0.027 4 mg/mL、去氢紫堇碱0.033 6 mg/mL、紫堇碱0.026 7 mg/mL、四氢小檗碱0.019 9 mg/mL、 α -香附酮0.051 3 mg/mL)。

2.1.3 阴性对照溶液 按处方比例称取除延胡索、香附以外的药材各1份,按照制备工艺和“2.1.1”项下方法制备相应阴性对照溶液。

2.2 色谱条件 依利特C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);体积流量1.2 mL/mL;进样量10 μ L;流动相A为甲醇-乙腈(1:1),B为0.1%冰醋酸,梯度洗脱^[2-6](0~12 min, 46.0% A; 12~29 min, 46.0% → 65.0% A; 29~42 min, 65.0% → 75.0% A; 42~51 min, 75.0% A; 51~60 min, 75.0% → 46.0% A);检测波长280 nm^[7-9](原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱和四氢小檗碱)和242 nm^[10-11](α -香附酮)。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,置于20 mL量瓶中,70%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得到系列质量浓度对照品溶液。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果见表1,可知各成分在各自范围内均呈良好的线性关系。

2.3.2 专属性实验 取阴性对照、对照品、供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下测定,色谱图见图1,可知阴性无干扰,表明该方法专属性良好。

2.3.3 精密度试验 按“2.1.2”项下对照品溶液,在“2.2”项色谱条件下进样6次,测得原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檗碱、 α -香附酮峰面积RSD分别为1.05%、0.99%、1.08%、0.93%、1.04%、0.66%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取样品(批号150401)6份,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,在

表1 6种成分的线性关系
Tab. 1 Linear relationships of six constituents

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
原阿片碱	$Y = 5.2284 \times 10^5 X + 183.6$	2.05 ~ 41.00	0.999 9	0.112
延胡索乙素	$Y = 1.6364 \times 10^6 X + 370.8$	2.74 ~ 54.80	0.999 8	0.257
去氢紫堇碱	$Y = 1.5905 \times 10^6 X - 279.1$	3.36 ~ 67.20	0.999 6	0.219
紫堇碱	$Y = 1.0872 \times 10^6 X + 358.2$	2.67 ~ 53.40	0.999 5	0.296
四氢小檗碱	$Y = 8.5143 \times 10^5 X - 411.7$	1.99 ~ 39.80	0.999 7	0.124
α -香附酮	$Y = 1.8639 \times 10^6 X - 157.5$	5.13 ~ 102.60	0.999 8	0.376

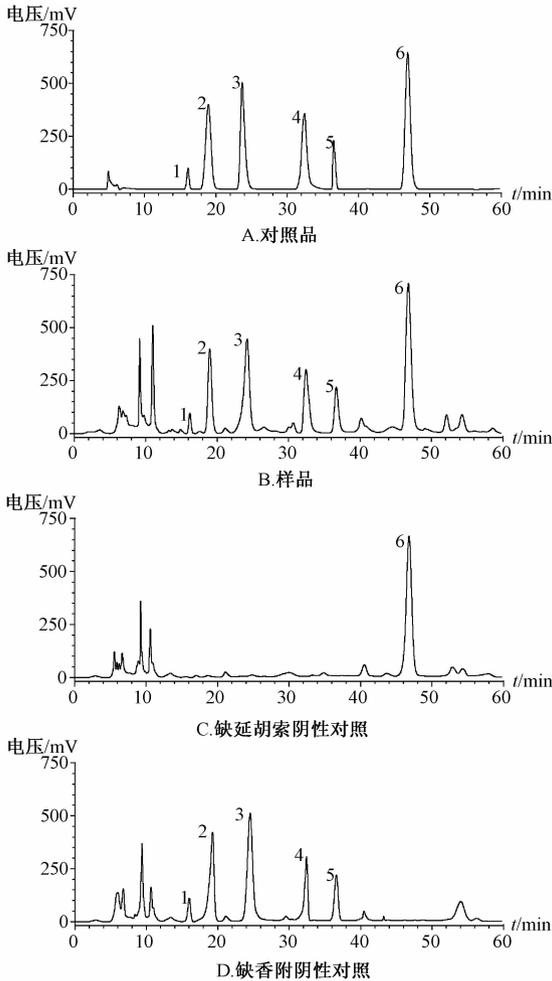


图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

“2.2”项色谱条件下测定，测得原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檗碱、 α -香附酮含有量 RSD 分别为 1.79%、1.64%、1.56%、1.67%、1.71%、1.24%，表明该方法重复性

良好。

2.3.5 稳定性试验 取样品(批号 150401)适量，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定，进样量 10 μL ，测得原阿片碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檗碱、 α -香附酮峰面积 RSD 分别为 1.23%、1.11%、0.97%、1.03%、1.16%、0.79%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取含有量已知的样品(批号 150401)适量，研细，精密称取 6 份，每份 1.0 g，置于 25 mL 量瓶中，加入“2.1.2”项下对照品溶液(0.098 4 mg/mL 原阿片碱、0.082 2 mg/mL 延胡索乙素、0.100 8 mg/mL 去氢紫堇碱、0.080 1 mg/mL 紫堇碱、0.059 7 mg/mL 四氢小檗碱、0.205 2 mg/mL α -香附酮)适量，加入 70% 乙醇，超声提取 60 min，放冷，70% 乙醇定容至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，在“2.2”项色谱条件下测定，计算回收率，结果见表 2。

2.4 样品含有量测定 取 3 批样品，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，外标法计算含有量，结果见表 3。

3 讨论

3.1 流动相选择 本实验考察了甲醇-0.1% 冰醋酸、乙腈-0.1% 冰醋酸、乙腈-0.05% 磷酸、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-水、甲醇-水、[甲醇-乙腈(1:1)]-0.1% 冰醋酸等流动相体系，通过比较 6 种成分的分度度及峰形，最终选择 [甲醇-乙腈(1:1)]-0.1% 冰醋酸。

3.2 样品制备方法选择 本实验考察了提取方式(回流提取、超声提取)、提取溶剂(50%、70%、100% 乙醇)、提取时间(30、60、90 min)等因素，发现回流提取和超声提取对 6 种成分提取率的影响差异不大，考虑到超声提取较回流提取更加简便、快速、稳定，故选择超声提取；以 70% 乙醇

表2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)

成分	称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
原阿片碱	1.000 8	0.095 1	0.098 4	0.191 7	98.17	97.98 (1.13)
	1.000 2	0.095 0	0.098 4	0.190 3	96.85	
	0.999 3	0.094 9	0.098 4	0.190 8	97.46	
	0.999 6	0.095 0	0.098 4	0.192 0	98.58	
	1.000 6	0.095 1	0.098 4	0.193 3	99.80	
	1.000 9	0.095 1	0.098 4	0.190 6	97.05	
延胡索 乙素	1.000 8	0.342 3	0.328 8	0.673 4	100.70	99.12 (1.58)
	1.000 2	0.342 1	0.328 8	0.659 2	96.44	
	0.999 3	0.341 8	0.328 8	0.664 6	98.18	
	0.999 6	0.341 9	0.328 8	0.668 7	99.39	
	1.000 6	0.342 2	0.328 8	0.670 7	99.91	
	1.000 9	0.342 3	0.328 8	0.671 4	100.09	
去氢紫 堇碱	1.000 8	0.408 3	0.403 2	0.800 5	97.27	98.33 (0.83)
	1.000 2	0.408 1	0.403 2	0.803 7	98.12	
	0.999 3	0.407 7	0.403 2	0.801 4	97.64	
	0.999 6	0.407 8	0.403 2	0.805 5	98.64	
	1.000 6	0.408 2	0.403 2	0.806 9	98.88	
	1.000 9	0.408 4	0.403 2	0.809 4	99.45	
紫堇碱	1.000 8	0.325 3	0.320 4	0.643 8	99.41	99.05 (1.72)
	1.000 2	0.325 1	0.320 4	0.647 5	100.62	
	0.999 3	0.324 8	0.320 4	0.648 1	100.91	
	0.999 6	0.324 9	0.320 4	0.640 0	98.35	
	1.000 6	0.325 2	0.320 4	0.633 6	96.25	
	1.000 9	0.325 3	0.320 4	0.641 7	98.75	
四氢小 檫碱	1.000 8	0.231 2	0.238 8	0.470 6	100.25	97.83 (1.42)
	1.000 2	0.231 0	0.238 8	0.462 4	96.90	
	0.999 3	0.230 8	0.238 8	0.463 3	97.36	
	0.999 6	0.230 9	0.238 8	0.461 1	96.40	
	1.000 6	0.231 1	0.238 8	0.466 5	98.58	
	1.000 9	0.231 2	0.238 8	0.464 0	97.49	
α-香 附酮	1.000 8	0.637 5	0.615 6	1.250 8	99.63	98.64 (0.70)
	1.000 2	0.637 1	0.615 6	1.246 2	98.94	
	0.999 3	0.636 6	0.615 6	1.240 8	98.15	
	0.999 6	0.636 7	0.615 6	1.238 3	97.73	
	1.000 6	0.637 4	0.615 6	1.243 0	98.38	
	1.000 9	0.637 6	0.615 6	1.247 2	99.03	

为提取溶剂时,6种成分含有量较高;通过比较提取率,确定提取时间为60 min。综上所述,样品制备方法为70%乙醇超声提取60 min。

4 结论

HPLC法能同时测定复方元胡止痛片中原阿片

表3 含有量测定结果 (n=3, mg/g)

Tab. 3 Results of content determination (n=3, mg/g)

批号	原阿 片碱	延胡索 乙素	去氢紫 堇碱	紫堇碱	四氢小 檫碱	α-香 附酮
150401	0.095	0.342	0.408	0.325	0.231	0.637
150912	0.103	0.356	0.421	0.321	0.227	0.609
151106	0.087	0.329	0.396	0.298	0.213	0.651
平均值	0.095	0.342	0.408	0.315	0.224	0.632

碱、延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、四氢小檫碱和α-香附酮的含有量,各组份能较好地分离。同时,该方法简便稳定,专属性强,对复方元胡止痛片的质量控制及临床用药安全有着积极意义。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂):第7册[S]. 北京:人民卫生出版社,1993:123.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:139-140,258.
- [3] 周 卿,尚京川. HPLC-DAD法同时测定延胡索中4种生物碱的含量[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(7):1017-1019.
- [4] 徐 皓. HPLC法测定不同产地元胡药材中5种生物碱含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(8):1403-1407.
- [5] 陈艳红,吴秋云,蔡佳仲. 17批不同产地香附中有效成分的含量测定[J]. 临床医学工程,2010,17(11):41-42.
- [6] 王雪婷,宋德成,翟 静,等. 不同产地香附中α-香附酮含量测定[J]. 创新技术,2013(1):28-29.
- [7] 陈东东,毛坤军,李 祥,等. HPLC法比较延胡索炮制前后7个生物碱成分的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(9):1591-1595.
- [8] 毕福钧,林 彤. RP-HPLC法同时测定醋延胡索配方颗粒中7种生物碱[J]. 中草药,2016,47(4):606-609.
- [9] 冯自立,张 涛,张晓娟,等. 高效液相法测定陕西产延胡索中延胡索乙素,原阿片碱的含量[J]. 安徽农业科学,2009,37(21):9832-9833,9840.
- [10] 卢君蓉,傅超美,周莉江,等. 香附醋制前后香附烯酮,圆柚酮和α-香附酮的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):24-27.
- [11] 季宁平,卢君蓉,盛菲亚,等. 不同醋制方法对香附中指标成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(7):5-7.