

(PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells; Profile analysis of extracts[J]. *Food Chem*, 2009, 116(3): 702-708.  
[20] Radovanovic B C, Radovanovic A N, Souquet J M. Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet

Sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90 (14): 2455-2461.

## HPLC 法同时测定椒香温中止痛软膏中 8 种成分

李双双<sup>1</sup>, 李希<sup>1,2\*</sup>, 邓谦<sup>2</sup>, 施崇精<sup>2</sup>, 冯建安<sup>2</sup>, 黄嫣<sup>2</sup>, 王玉<sup>2</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 四川成都 611137; 2. 四川省中医药科学院中医研究所, 四川成都 610031)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定椒香温中止痛软膏(延胡索、肉桂、白芍等)中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛的含有量。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 230、272 nm。结果 8 种成分在各自范围内线性关系良好( $r>0.999\ 0$ ), 平均加样回收率 97.82%~101.08%, RSD 1.10%~2.38%。结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于椒香温中止痛软膏的质量控制。

**关键词:** 椒香温中止痛软膏; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)11-2853-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.006

## Simultaneous determination of eight constituents in Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment by HPLC

LI Shuang-shuang<sup>1</sup>, LI Xi<sup>1,2\*</sup>, DENG Qian<sup>2</sup>, SHI Chong-jing<sup>2</sup>, FENG Jian-an<sup>2</sup>, HUANG Yan<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610031, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, tetrahydropalmatine, corydaline, rosmarinic acid, dehydrocorydaline and cinnamaldehyde in Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment (*Corydalis Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, *Paeoniae alba Radix*, etc.).

**METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.1% phosphoric acid flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 230, 272 nm. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r>0.999\ 0$ ), whose average recoveries were 97.82% - 101.08% with the RSDs of 1.10% - 2.38%.

**CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment.

**KEY WORDS:** Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment; chemical constituents; HPLC

收稿日期: 2020-07-15

基金项目: 四川省中央引导地方科技发展专项(2018TZYD0003); 四川省中医药管理局科研项目(2018HJZX012)

作者简介: 李双双(1993—), 女, 硕士生, 从事药物新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: 1452992160@qq.com

\* 通信作者: 李希(1969—), 女, 硕士, 研究员, 主任中药师, 从事中药新剂型、新技术、新工艺研究。E-mail: 1836820767@qq.com

椒香温中止痛软膏由延胡索、肉桂、白芍、夏枯草等药材加工制成,具有温中散寒、行气止痛的功效,临床上主要用于治疗脾胃虚寒引起的脘腹冷痛。方中延胡索性味辛、苦、温,具有活血、利气、止痛的功效,主要成分为生物碱,包括延胡索乙素、延胡索甲素、脱氢紫堇碱等<sup>[1-3]</sup>;白芍具有缓急止痛的功效,主要成分为芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸等,有着抗炎、抗肿瘤、抑菌等药理作用<sup>[4-6]</sup>;肉桂性味辛、甘、大热,具有散寒止痛、温通经脉的功效,主要成分为挥发油,以桂皮醛含有量最高,约为84%,具有解热镇痛、抗炎、扩张血管等药理作用<sup>[7-9]</sup>;夏枯草性味辛、苦、寒,可反佐以制肉桂等之过热,主要成分为迷迭香酸,具有抗氧化、抗炎等药理作用<sup>[10-11]</sup>。该制剂临床应用多年,疗效显著,但其药味多样,仅检测单一成分难以全面反映其整体疗效,目前也尚无完善的质量评价方法。

因此,本实验在查阅相关文献的基础上,建立HPLC法同时测定椒香温中止痛软膏中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛的含有量,以期为该制剂的质量控制及药效研究提供依据。

## 1 材料

1.1 仪器 DZTW型调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公司);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Agilent 1260 Infinity II型高效液相色谱仪(美国Agilent Technologies公司);电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);BT-125D型电子天平[十万分之一,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 试剂与药物 脱氢紫堇碱(批号20040208,纯度98%)、延胡索甲素(批号20032606,纯度98%)、芍药内酯苷(批号20040106,纯度98%)对照品均购自成都市卓谱仪器有限公司;没食子酸(批号110831-200803,纯度90.10%)、桂皮醛(批号110710-201821,纯度99.60%)、芍药苷(批号110736-201943,纯度98%)、延胡索乙素(批号110726-201819,纯度99.8%)、迷迭香酸(批号11871-201706,纯度90.5%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。椒香温中止痛软膏(批号20200401、20200402、20200403)由四川省第二中医医院制剂室生产。甲醇、磷酸为色谱纯(美国Tedia公司);其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 5% A; 10~15 min, 5%~30% A; 15~42 min, 30%~38% A; 42~60 min, 38%~39% A; 60~72 min, 39%~50% A; 72~83 min, 50%~90% A);体积流量0.9 mL/min;柱温30℃;检测波长272 nm(0~13 min)、230 nm(13~83 min);进样量10 μL。

### 2.2 溶液制备

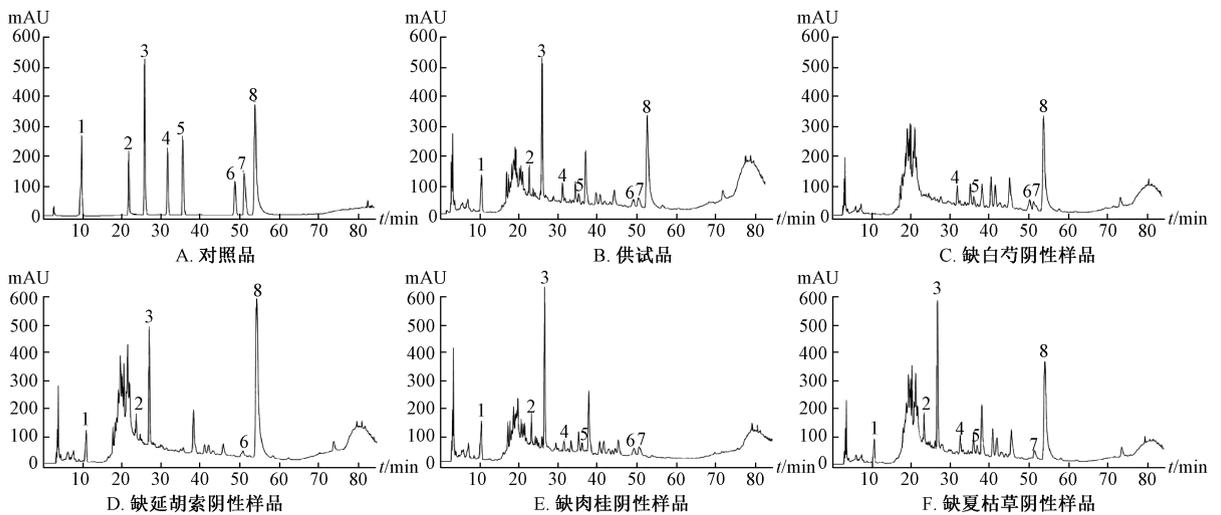
2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,甲醇溶解后定容,制成贮备液(含没食子酸1.034 3 mg/mL、芍药内酯苷1.002 5 mg/mL、芍药苷2.141 7 mg/mL、延胡索乙素0.332 9 mg/mL、延胡索甲素1.109 4 mg/mL、迷迭香酸0.787 4 mg/mL、脱氢紫堇碱1.075 1 mg/mL、桂皮醛3.600 5 mg/mL),分别精密量取1.5、2、4、2、1、2、1、3 mL至20 mL量瓶中,甲醇定容,摇匀,即得(含没食子酸77.58 μg/mL、芍药内酯苷100.25 μg/mL、芍药苷428.33 μg/mL、延胡索乙素33.29 μg/mL、延胡索甲素55.47 μg/mL、迷迭香酸78.74 μg/mL、脱氢紫堇碱53.75 μg/mL、桂皮醛540.08 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液 取软膏(批号20200401)约2.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声提取60 min,放冷,70%甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照处方比例和工艺流程,制备缺白芍、缺延胡索、缺夏枯草、缺肉桂的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.3 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图1。由此可知,各成分色谱峰与相邻峰均能达到有效分离,理论塔板数按各成分计均大于3 000,阴性无干扰,表明该方法专属性良好。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液5、3、2、1.5、1、1 mL,分别置于5、5、5、5、5、10 mL量瓶中,甲醇依次稀释至6个质量浓度(编号1~6),在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标(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线性关系良好。



1. 没食子酸 2. 芍药内酯苷 3. 芍药苷 4. 延胡索乙素 5. 延胡索甲素 6. 迷迭香酸 7. 脱氢紫堇碱 8. 桂皮醛  
1. gallic acid 2. albiflorin 3. paeoniflorin 4. tetrahydropalmatine 5. corydaline 6. rosmarinic acid 7. dehydrocorydaline 8. cinnamaldehyde

图1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
没食子酸	$Y=27.260 0X+19.528 0$	0.999 6	7.76~77.58
芍药内酯苷	$Y=8.533 7X+15.225 0$	0.999 7	10.03~100.25
芍药苷	$Y=15.885 0X+97.550 0$	0.999 9	42.83~428.33
延胡索乙素	$Y=37.439 0X+11.680 0$	0.999 5	3.33~33.29
延胡索甲素	$Y=30.061 0X+11.776 0$	0.999 7	5.55~55.47
迷迭香酸	$Y=10.500 0X+8.301 4$	0.999 6	7.87~78.74
脱氢紫堇碱	$Y=23.560 0X+9.063 2$	0.999 5	5.38~53.75
桂皮醛	$Y=21.074 0X+36.691 0$	0.999 9	54.01~540.08

2.5 精密度试验 精密吸取“2.4”项下3号对照品溶液(含没食子酸31.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芍药内酯苷40.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芍药苷171.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、延胡索乙素13.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、延胡索甲素22.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、迷迭香酸31.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、脱氢紫堇碱21.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、桂皮醛216.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，在“2.1”项色谱条件下进样测定6次，测得没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛峰面积RSD分别为1.64%、1.23%、0.77%、1.15%、1.13%、0.54%、1.59%、0.62%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一批软膏(批号20200401)，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于0、3、6、9、12、24 h，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫

堇碱、桂皮醛峰面积RSD分别为0.92%、1.87%、1.28%、0.95%、1.85%、2.69%、1.43%、1.56%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批软膏(批号20200401)，按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛含有量RSD分别为1.17%、1.63%、0.88%、1.63%、1.79%、1.53%、2.08%、1.02%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取同一批各成分含有量已知的软膏(批号20200401)6份，每份约1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入“2.2.1”项下贮备液适量，使其与各成分含有量之比均在1:1左右，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛平均加样回收率分别为99.33%、99.95%、98.87%、100.28%、99.52%、97.82%、100.46%、101.08%，RSD分别为1.72%、1.13%、1.86%、1.77%、2.03%、1.71%、2.38%、1.10%。

2.9 样品含有量测定 取3批软膏，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，每批平行3份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

批号	没食子酸	芍药内酯苷	芍药苷	延胡索乙素	延胡索甲素	迷迭香酸	脱氢紫堇碱	桂皮醛
20200401	0.575 3	0.778 5	2.730 9	0.201 9	0.145 6	0.547 9	0.328 8	3.501 3
20200402	0.560 5	0.769 3	2.658 3	0.201 3	0.140 0	0.539 2	0.321 9	3.493 5
20200403	0.569 8	0.759 5	2.599 4	0.198 6	0.138 5	0.527 1	0.310 6	3.398 5
平均值	0.568 5	0.769 1	2.662 9	0.200 6	0.141 4	0.538 1	0.320 4	3.464 4
RSD/%	1.32	1.24	2.47	0.88	2.64	1.94	2.87	1.65

### 3 讨论

3.1 指标成分选择 椒香温止痛软膏中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛药理活性以抗炎、镇痛为主<sup>[12-15]</sup>，而且专属性强、重复性好，故选择其作为指标成分。另外，方中花椒、香附因其指标成分不明确、热稳定性差等因素未纳入定量测定中，而是采用 TLC 法作定性鉴别。

3.2 流动相、体积流量筛选 本实验考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸、[乙腈-甲醇(1:1)]-0.1% 磷酸、甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸，最终选择甲醇-0.1% 磷酸作为流动相；考察了 0.8、0.9、1.0 mL/min，发现在 0.9 mL/min 体积流量下各成分峰形较好。再对甲醇、0.1% 磷酸比例不断进行调节，最终确定为“2.1”项下梯度洗脱程序。

3.3 检测波长筛选 本研究采用 DAD 检测器对各成分进行 200~400 nm 全波长扫描，考虑到既要与其他色谱峰有较好的分离度，又能同时将所有成分都检测出，最终确定为“2.1”项下检测波长，此时各成分色谱峰峰形较好，响应值稳定，与其他相邻峰能达到有效分离。

3.4 供试品溶液制备方法筛选 本实验考察了提取溶剂（甲醇、70% 乙醇、70% 甲醇、50% 甲醇、1% 盐酸甲醇）、提取方式（加热回流、超声、振荡）、提取时间（20、40、60、80、100 min）、料液比（1:5、1:10、1:25、1:50），发现提取溶剂、提取时间、料液比对提取效果影响较大，而提取方式对其影响较小。考虑到实验操作、提取效率等方面，最终确定为“2.2.2”项下方法。

### 4 结论

本实验建立 HPLC 法同时测定椒香温止痛软膏中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛的含有量，该方法简便准确，重复性好，可用于该

制剂的质量控制。

### 参考文献:

[1] 关秀锋, 王锐, 曲秀芬, 等. 延胡索的化学成分与药理作用研究进展[J]. 化学工程师, 2020, 34(3): 57-60.

[2] 王欢, 毕福钧, 林彤, 等. 延胡索 HPLC 指纹图谱研究及 9 种生物碱含量测定[J]. 中药材, 2017, 40(3): 624-629.

[3] 罗镭, 李文庭, 谭春梅, 等. HPLC 同时测定延胡索中 4 个化学成分的含量[J]. 江西中医药, 2017, 48(9): 64-66.

[4] 刘培, 王胜超, 张振凌, 等. 基于一测多评法对白芍中 5 种化学成分质量控制研究[J]. 中医学报, 2019, 34(8): 1723-1729.

[5] 李超, 年莉. 白芍在解表剂中的应用及其相关药理研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(12): 71-72.

[6] 高雅, 李骅, 王四旺, 等. 没食子酸的药理作用及其药物代谢动力学研究进展[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(4): 435-438.

[7] 陈旭, 刘畅, 马宁辉, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及综合应用研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(18): 2581-2584.

[8] 曾超, 陆东, 段伟昌, 等. 肉桂配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 635-638.

[9] 周峰, 籍保平, 李博, 等. 肉桂油有效成分提取、纯化及鉴定研究[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 59-61.

[10] 汪晓河, 马明华, 张婧婷, 等. 中药夏枯草药用概况[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 625-632.

[11] 皮胜玲, 胡玉珍, 彭曦, 等. 野生与栽培夏枯草 HPLC 指纹图谱研究及模式识别分析[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(5): 367-371.

[12] 唐逸丰. 延胡索化学成分与药理作用研究概况[J]. 中医临床研究, 2018, 10(23): 144-146.

[13] 张嘉嘉, 马迟, 朱志灵, 等. HPLC 法同时测定白芍中 5 种成分含量[J]. 福建中医药, 2019, 50(1): 66-67; 70.

[14] 邓淑蓉, 潘宇政. 肉桂主要化学成分及药理作用研究概况[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(4): 448-451.

[15] 曹雯, 张文娟, 潘金凤, 等. 迷迭香酸药理作用的研究进展[J]. 广西中医药, 2019, 42(1): 54-58.