

HPLC 测定跌打伤药凝胶膏剂中血竭素 和延胡索乙素的含量

李江英¹, 赵锋¹, 吕卓², 孙哲³, 张亚军^{3*}

(1. 西安市中医医院, 西安 710001; 2. 陕西省食品药品检验所, 西安 710065;
3. 西北大学 生命科学学院, 西安 710069)

[摘要] 目的:建立同时测定跌打伤药凝胶膏剂中血竭素和延胡索乙素的方法。方法:采用 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (三乙胺调 pH 至 6.0) (60:40), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 程序可变检测波长 (0~20 min 为 440 nm, 20~35 min 为 280 nm), 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。结果:血竭素和延胡索乙素分别在 0.037 0~0.592 8, 0.026 50~0.424 0 μg 峰面积与进样量呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.1% (RSD 1.4%), 96.7% (RSD 1.7%)。结论:该方法简便、准确、重复性好, 可用于跌打伤药凝胶膏剂的质量控制。

[关键词] 跌打伤药凝胶膏剂; 血竭素; 延胡索乙素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0057-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070057

Determination of Dracohodin and Tetrahydropulmatine in Dieda Shangyao Cataplast by HPLC

LI Jiang-ying¹, ZHAO Feng¹, LYU Zhuo², SUN Zhe³, ZHANG Ya-jun^{3*} (1. Xi'an Municipality Traditional Chinese Medicine Hospital, Xi'an 710001, China; 2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China; 3. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of dracohodin and tetrahydropulmatine in Dieda Shangyao cataplast. **Method:** A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was adopted with programmed wavelength UV detection. A C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used for the analysis at 30 °C. The separation was carried out with the mobile phase consisting of methanol and 0.1% phosphoric acid (60:40, adjusted to pH 6.0 with triethylamine) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, and the sample size was 10 μL. The eluate was detected by programmed wavelength (0-20 min, 440 nm; 20-35 min, 280 nm). **Result:** The linearities were from 0.037 0 to 0.592 8 μg for dracohodin, 0.026 5 to 0.424 0 μg for tetrahydropulmatine. The average recoveries of dracohodin and tetrahydropulmatine were 98.1% (RSD 1.4%) and 96.7% (RSD 1.7%), respectively. **Conclusion:** The established method was simple, accurate and highly reproducible that it could be used for quality control of Dieda Shangyao cataplast.

[Key words] Dieda Shangyao cataplast; dracohodin; tetrahydropulmatine; HPLC

跌打伤药凝胶膏剂是西安市中医医院自配制剂改进品种,原剂型为软膏剂(808 伤药软膏,陕药管制字[2001]第 1770 号),具有活血化瘀、消肿止痛、续筋接骨等作用,用于外伤所致的多种肿痛及骨折,疗效确切^[1]。该制剂由血竭、自然铜、延胡索、当

归、乳香、没药、冰片和樟脑组成,其中血竭、自然铜、冰片和樟脑粉碎为细粉,其余延胡索等 4 味煎煮后浓缩为浸膏,与基质聚丙烯酸钠、甘羟铝、聚维酮 K-30、柠檬酸、甘油等构成凝胶膏剂。根据跌打伤药凝胶膏剂的药物组成(药粉和浸膏),选择制剂中血

[收稿日期] 20140307(017)

[基金项目] 陕西省科学研究发展计划项目(2013k12-07-06);西安市科技计划项目(sf1205)

[第一作者] 李江英,主任药师,从事中药质量控制研究, Tel:029-87482496, E-mail:lijiangy@126.com

[通讯作者] *张亚军,博士,副教授,从事中药制剂及其体内过程研究, Tel:029-88302686, E-mail:zyjljy@163.com

竭和延胡索有效成分血竭素、延胡索乙素为指标,能更好地表征制剂质量。单独测定制剂中血竭素或延胡索乙素研究已有报道^[2-3],但未见同时测定血竭素和延胡索乙素的研究报道。本实验采用 HPLC 程序可变波长法,建立了同时测定血竭素和延胡索乙素含量的方法,并探讨适于二者化学性质和凝胶膏剂剂型特点的样品提取方法。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪, G1313A 型自动进样器, G1313A 型四元泵, G1316A 型柱温箱, G1315B 型二极管阵列检测器, Agilent 色谱工作站(美国 Agilent 公司); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试药 跌打伤药凝胶膏剂(西安市中医医院提供,批号 131001, 131005, 131010); 血竭素高氯酸盐(批号 110811-201105)、延胡索乙素(批号 110726-201213)对照品购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 AgilentTC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液(三乙胺调 pH 至 6.0)(60:40), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 程序可变波长检测(0~20 min 为 440 nm, 20~35 min 为 280 nm), 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

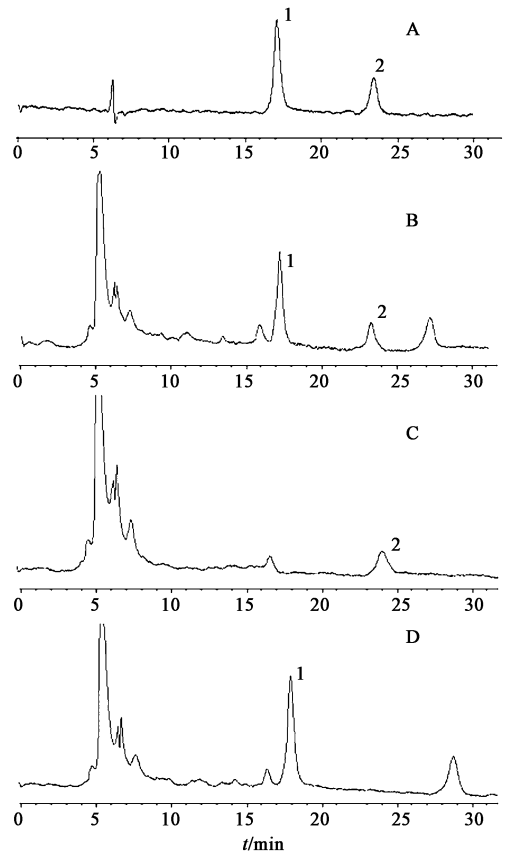
2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品混合溶液 精密称取血竭素高氯酸盐对照品 2.041 mg, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加 3% 磷酸甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得血竭素对照品贮备溶液。精密称取延胡索乙素对照品 1.060 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得延胡索乙素对照品贮备溶液。精密量取血竭素、延胡索乙素对照品贮备液各 1 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇定容、摇匀, 即得质量浓度分别为 14.82, 10.60 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液(血竭素质量 = 血竭素高氯酸盐质量/1.377)。

2.2.2 供试品溶液 取跌打伤药凝胶膏剂 3.0 g, 剪碎, 精密称定, 加 1.5% 磷酸甲醇溶液 20 mL, 加热回流 2 次, 每次 30 min, 滤过, 滤渣连同滤纸置烧瓶中, 加浓氨-甲醇(1:20)混合溶液 30 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 用少量甲醇洗涤滤渣与滤器。合并滤液与洗液, 减压浓缩至约 15 mL, 放冷, 移至 25 mL 棕色量瓶中, 用适量甲醇洗涤容器, 洗液并入同一量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方比例, 分别制备缺血竭或缺延胡索的凝胶膏剂, 照供试品溶液同法制备阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 分别量取对照品溶液、供试品和阴性样品溶液(缺血竭或缺延胡索)各 10 μL 进样, 见图 1。结果表明, 血竭素和延胡索乙素的色谱峰分离良好, 阴性样品(缺血竭或缺延胡索)无干扰。



A. 对照品; B. 供试品; C. 缺血竭阴性样品; D. 缺延胡索阴性样品;
1. 血竭素; 2. 延胡索乙素

图 1 跌打伤药凝胶膏剂的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Dieda Shangyao cataplasm

2.4 线性关系考察 精密量取血竭素、延胡索乙素对照品贮备液各 4 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 得混合对照品贮备溶液。精密量取该溶液, 用甲醇依次稀释制成含血竭素 59.28, 29.64, 14.82, 7.410, 3.705 mg·L⁻¹, 含延胡索乙素 42.40, 21.20, 10.60, 5.300, 2.650 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。精密量取混合对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 以进样量(X)与其相应的峰面积(Y)求得回归方程与相关系数。结果血竭素和延胡索乙素的回归方程分别为 $Y = 2.52 \times 10^3 X - 3.19$ ($r = 0.9993$), $Y = 2.11 \times 10^3 X + 2.62$, ($r = 0.9990$)。血竭素在 0.037 0 ~ 0.592 8 μg, 延胡索乙素在

0.026 5 ~ 0.424 0 μg 具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液连续进样 6 次,血竭素和延胡索乙素峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.1%。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 依上述色谱条件进样 10 μL ,血竭素和延胡索乙素峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.9%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同批次跌打伤药凝胶膏剂,按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液 ($n=6$),血竭素质量浓度延胡索乙素的质量浓度平均值分别为 0.147 2, 0.087 3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.5%, 1.8%。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批次跌打伤药凝胶膏剂 6 份,每份 1.5 g,分别加入血竭素和延胡索乙素对照品贮备溶液 1.5 mL,按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液,测定血竭素和延胡索乙素的含量,计算回收率,结果见表 1。

表 1 跌打伤药凝胶膏剂中 2 种成分的加样回收率试验
Table 1 Recovery test of dracohodin and tetrahydropulmatine in Dieda Shangyao cataplasm

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
血竭素	0.214 8	0.222 3	0.429 7	96.7	98.1	1.4
	0.217 4	0.222 3	0.436 2	98.4		
	0.226 8	0.222 3	0.449 5	100.2		
	0.218 3	0.222 3	0.438 4	99.0		
	0.218 5	0.222 3	0.435 5	97.6		
	0.212 4	0.222 3	0.427 5	96.8		
延胡索	0.127 5	0.159 0	0.280 3	96.1	96.7	1.7
乙素	0.129 3	0.159 0	0.287 7	99.6		
	0.131 7	0.159 0	0.286 9	97.6		
	0.120 2	0.159 0	0.273 8	96.6		
	0.119 3	0.159 0	0.270 5	95.1		
	0.130 4	0.159 0	0.281 9	95.3		

2.9 样品测定 取 3 批跌打伤药凝胶膏剂,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别注入液相色谱仪,测定峰面积,计算含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 凝胶膏剂药物成分的提取 凝胶膏剂又称巴布剂或巴布膏剂,2000,2005 年版《中国药典》记载为巴布膏剂,2010 年版《中国药典》改称为“凝胶膏剂”,系指药物与亲水性高分子基质混匀涂布于背衬材料上制得的贴膏剂,常用的基质有聚丙烯酸钠、

表 2 跌打伤药凝胶膏剂中血竭素和延胡索乙素的含量 ($n=3$)
Table 2 Contents of dracohodin and tetrahydropulmatine in Dieda Shangyao cataplasm ($n=3$)

样品批号	血竭素	延胡索乙素
131001	0.148 4	0.088 3
131005	0.139 8	0.085 1
131010	0.146 7	0.089 6

羧甲基纤维素钠、明胶、甘油等^[4]。因此,凝胶膏剂药物成分的提取多选用极性溶剂,如 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液^[5],氨试液^[6],50% ~ 90% 甲醇^[7-9],60% 乙醇^[10],正丁醇^[11],无水乙醇^[12],甲醇^[13-14]等。跌打伤药凝胶膏剂采用了聚丙烯酸钠与甘羟铝交联固化成型工艺,水或稀醇不能使骨架溶散,且基质材料遇水呈胶黏性,药物成分的提取回收率低;采用无水乙醇或甲醇加热回流提取,膏体中的水分、甘油、聚维酮等被溶出,聚丙烯酸钠骨架脱水、缩小、变脆,进而破碎分散在溶剂中,药物成分与溶剂的接触面积大、扩散距离短,提取率较高。

血竭素和延胡索乙素均可溶于甲醇和乙醇。分别考察了无水乙醇、甲醇、1.5% 磷酸甲醇、3% 磷酸甲醇溶液作为提取溶剂,结果表明血竭素在无水乙醇中加热回流 4 h,稳定性降低,而在甲醇中加热回流 4 h 稳定性良好,可能与甲醇的沸点较低有关^[15];因酸度影响血竭素的构型转化^[16],血竭素在磷酸甲醇溶液中的提取率明显高于纯甲醇,1.5% 磷酸甲醇与 3% 磷酸甲醇相比,血竭素提取率无明显差异,故选用 1.5% 磷酸甲醇溶液为提取溶剂。此外,研究发现甲醇对该凝胶膏剂中延胡索乙素的提取效率显著低于浓氨试液-甲醇溶液。为了避免碱性氨对血竭素稳定性的影响,跌打伤药凝胶膏剂先用 1.5% 磷酸甲醇提取后,药渣再用浓氨试液-甲醇回流提取处理,达到了充分提取样品中血竭素和延胡索乙素的目的。

3.2 色谱条件的选择 血竭素和延胡索乙素的化学结构不同,紫外吸收差异较大,血竭素和延胡索乙素的测定波长分别为 440,280 nm,故采用程序波长法兼顾二者的检测灵敏度,实现血竭素和延胡索乙素的同时测定。曾参考 2010 年版《中国药典》一部血竭项下方法,以乙腈-0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠水溶液(50:50)为流动相,延胡索乙素出峰时间早于血竭素,程序切换波长先用 280 nm 检测后变为 440 nm,延胡索乙素峰形差且干扰峰较多,不能有效分离;而采用文中流动相条件,血竭素早于延胡索乙素

出峰,程序切换波长先用440 nm后变为280 nm,干扰峰少且二者峰形均较好,能够满足测定要求。

[参考文献]

[1] 夏均青,赵颖林,姚红梅. 中医内外兼治治疗胸腰椎骨折68例[J]. 陕西中医, 2009, 30(5): 541-542.

[2] 常润,夏传涛,杨瑞瑞,等. HPLC法测定展筋活血散中血竭素的含量[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(4): 370-372.

[3] 谢宪斌,王巨存. HPLC法测定壮骨止痛颗粒中延胡索乙素的含量[J]. 天津医科大学学报, 2013, 19(1): 76-79.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010;附录 I I.

[5] 马红. 扶正益肺巴布膏中延胡索乙素的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1819-1820.

[6] 李军红,金日显,赵彬,等. HPLC法测定骨痛灵巴布剂中雪上一枝蒿甲素含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(4): 59-60.

[7] 吴雅崑,王琦. 乳癖消巴布膏质量标准研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(8): 240-242.

[8] 刘月环,杜守颖,陆洋,等. 宣痹凝胶贴膏剂中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 72-74.

[9] 严国鸿,褚克丹,徐伟,等. HPLC法测定双藤痹痛凝胶膏剂中雷公藤甲素和青藤碱的含量[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(5): 27-30.

[10] 王知青,尹华,许丛辉,等. 高效液相色谱法测定三黄散瘀巴布剂中盐酸小檗碱的含量[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(11): 2690-2692.

[11] 刘常青,何百寅,赖小平,等. HPLC测定经络贴巴布剂中3种皂苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(6): 590-593.

[12] 周庆氢,张聪,谢松. 蟾乌巴布膏的质量标准研究[J]. 中成药, 2010, 32(7): 1151-1155.

[13] 谢雪虎,赵正保. 祖师麻巴布剂的质量标准研究[J]. 中国药物与临床, 2011, 11(1): 20-22.

[14] 杨燕云,许亮,张慧. RP-HPLC法测定辣椒风湿巴布膏中辣椒素和二氢辣椒素[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1340-1343.

[15] 徐淑卿,郝颖,赵清. 中药血竭的稳定性研究[J]. 中成药, 2006, 28(4): 586-587.

[16] 刘长龙,高鹏. 提取溶剂酸度对血竭及玉红生肌凝胶中血竭素含量的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(3): 520-522.

[责任编辑 顾雪竹]