

# 多波长反相高效液相色谱法对止痛方中 几种有效成分含量测定

施建南<sup>1\*</sup>, 杨奕樱<sup>1</sup>, 刘艳洁<sup>2</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵阳医学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** **目的:**利用多波长反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立对民间验方仲氏止痛散加减后的止痛方中6种有效成分的含量进行同时测定的方法。**方法:**使用Diamond C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温30℃, 甲醇-乙腈-0.1%氨水为流动相, 以1 mL·min<sup>-1</sup>梯度洗脱, 检测波长230 nm(芍药苷)、235 nm(乌头碱、次乌头碱)、280 nm(延胡索乙素)、280 nm(原阿片碱)、235 nm(新乌头碱)。**结果:**6个成分峰面积与浓度呈良好的线性( $r > 0.9994$ ), 芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的加样回收率分别为97.2% (RSD 1.4%), 96.5% (RSD 1.2%), 102.5% (RSD 0.7%), 96.8% (RSD 0.7%), 100.8% (RSD 1.1%), 98.5% (RSD 1.1%)。**结论:**利用RP-HPLC同时测定止痛方中的几种有效成分, 简便易行, 为止痛方相关制剂的质量控制提供一定的依据。

**[关键词]** 高效液相色谱; 止痛方; 有效成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0136-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121030.1142.003.html>

**[网络出版时间]** 2012-10-30 11:42

## Analysis Several Active Ingredients of Zhitong Prescription One-time by RP-HPLC Determination

SHI Jan-nan<sup>1\*</sup>, YANG Yi-ying<sup>1</sup>, LIU Yan-jie<sup>2</sup>

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Guiyang Medical College, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** Using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method to analyze 6 ingredients of Zhitong prescription one-time. **Method:** Using Diamond C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the column temperature was 30℃; methanol acetonitrile 0.1% ammonia water as the mobile phase, 1 mL·min<sup>-1</sup> gradient elution; detection wavelength was 230 nm (paeoniflorin), 235 nm (the aconitine hyaconitine), 280 nm (tetrahydropalmatine), 280 nm (protopine) and 235 nm (mesaconitine). **Result:** The peak area and concentration of the six components showed good linearity ( $r > 0.9994$ ) the paeoniflorin aconitine hyaconitine, tetrahydropalmatine protopine, new aconitine the recoveries were 97.2% (RSD 1.4%), 96.5% (RSD 1.2%), 102.5% (RSD 0.7%), 96.8% (RSD 0.7%), 100.8% (RSD 1.1%), 98.5% (RSD 1.1%). **Conclusion:** By using RP-HPLC simultaneous determination of the active ingredients of the the analgesic prescription of several simple, we can provide a basis for the quality control of the preparation of Zhitong prescription.

**[Key words]** high performance liquid chromatography; analgesic side; ingredients

止痛方是在民间验方仲氏止痛散的基础上结合  
临床实践加减裁化而得, 由白芍、制川乌、胡椒、延胡

索4味药物组成, 具有温通散寒、活血行气、化痰止  
痛之功效, 临床主要用于治疗痛经、乳痛、腹痛、肢体  
疼痛及外科术后疼痛等。其提取物主要成分主要包  
括芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头类生物碱  
等<sup>[1]</sup>。目前尚无对止痛方中几种有效成分含量同  
时测定的方法报道。同时, 由于不同成分化学结构

**[收稿日期]** 20120919(013)

**[通讯作者]** \* 施建南, 硕士, 讲师, 从事药物、物理实验教学与  
研究, Tel: 18985124583, E-mail: sjn201209 @  
126.com

的差异,在同一波长下检测会影响整个检测方法的灵敏度<sup>[2]</sup>。因此,笔者采用多波长反相高效液相色谱法,建立同时测定止痛方提取物6种主要成分的检测方法。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 美国 Agilent 1200 HPLC 液相色谱仪(四元泵、自动进样器、G1314B 紫外线检测仪)和 Chemstation B 2.0 工作站。上海将来公司 KQ-250VDB 型双频数控超声波清洗器。Sartorius BS 124S 型电子 1/1 000 分析天平和 Sartorius BT25s 型 1/10 万天平。Gilson 100 ~ 1 000  $\mu\text{L}$  移液器,上海雷磁 PHS-3C 型精密 pH 计。

**1.2 试剂** 流动相用水为高纯水,乙腈为色谱纯,其余所用试剂均为分析纯,对照品芍药苷(批号 200629)、延胡索乙素(批号 200409)、原阿片碱(批号 200402)、乌头碱(批号 200410)、次乌头碱(批号 200629)、新乌头碱(批号 9403)。止痛方提取物为本实验室自制。

## 2 方法与结果

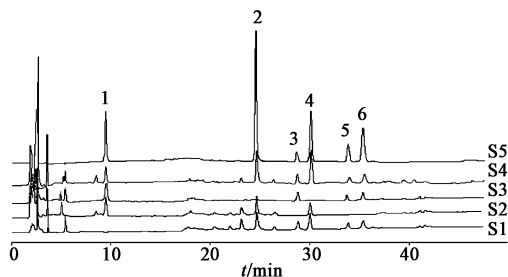
**2.1 溶液制备** 试验溶液制备:称取止痛方提取物 0.5 g 置于 25 mL 棕色量瓶中,加入 20:1 甲醇-氨水溶液 20 mL 后经超声处理 30 min,冷却后定容、摇匀、过滤、低温挥干,使用 4:1 甲醇-乙腈溶解,经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤即得;混合对照溶液:取对照品称重后置于 25 mL 棕色量瓶中,按照 4:1 加入甲醇-乙腈制成混合对照溶液 1 mL,其中含芍药苷 40.70  $\mu\text{g}$ 、延胡索乙素 90.18  $\mu\text{g}$ 、原阿片碱 123.50  $\mu\text{g}$ 、乌头碱 10.15  $\mu\text{g}$ 、次乌头碱 12.15  $\mu\text{g}$ 、新乌头碱 56.26  $\mu\text{g}$ ;阴性对照液:按照试验溶液制备方法分别制备缺少制川乌、白芍、延胡索的 3 组对照液。

**2.2 色谱条件** 用 Diamond C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,甲醇-乙腈-0.1% 氨水为流动相,以 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 梯度洗脱(表 1),检测波长 230 nm(芍药苷)、235 nm(乌头碱、次乌头碱)、280 nm(延胡索乙素)、280 nm(原阿片碱)、235 nm(新乌头碱)。进样量 20  $\mu\text{L}$ ,将配成试剂进行色谱

分析,色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度

t/min	甲醇-乙腈-氨水
0	0:13:87
10	0:31:69
14	0:40:60
19	20:40:40
40	25:45:30
45	40:50:10



S1. 缺白芍阴性;S2. 缺川乌阴性;S3. 缺延胡索阴性;  
S4. 供试品;S5. 混合对照品溶液;  
1. 芍药苷,2. 原阿片碱,3. 新乌头碱,  
4. 延胡索乙素,5. 乌头碱,6. 次乌头碱

图 1 各样品及止痛方 HPLC

结果显示,样品中芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的塔板数分别为 21 946, 34 570, 49 263, 38 065, 43 062, 28 270, 相邻峰分离度均  $>1.5$ 。

**2.3 线性关系考察** 取混合对照溶液 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50, 10.00 mL 置于 8 个不同的 10 mL 量瓶中,通过 4:1 的甲醇-乙腈定容后摇匀,各取 20  $\mu\text{L}$  加入色谱仪分析色谱图,以对照品质量浓度( $X$ )为横坐标( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),色谱峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线,将最低浓度的混合对照溶液稀释成从高到低的梯度浓度溶液,对其检测限(LOD)和定量限(LOQ)进行测定,结果见表 2。

**2.4 精密度试验** 取 2.3 项 20  $\mu\text{L}$  中间浓度梯度点混合对照溶液,连续 6 次进样,测定峰面积值,计算当天内 RSD。每天进样 1 次,连续分析 4 d 求得日间 RSD,结果见表 3。

表 2 混合对照溶液线性关系、检测限和定量限检测

成分	回归方程	$r$	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LOD/ng	LOQ/ng
芍药苷	$Y = 25.90X - 3.242$	0.999 4	0.406 ~ 40.6	0.66	1.64
延胡索乙素	$Y = 21.37X + 8.496$	0.999 7	0.914 ~ 91.4	0.85	1.97
原阿片碱	$Y = 24.19X - 4.851$	0.999 5	1.237 ~ 123.7	0.19	1.72
乌头碱	$Y = 24.62X + 1.419$	0.999 8	0.102 ~ 10.2	0.17	1.94
次乌头碱	$Y = 28.58X + 10.451$	0.999 4	0.563 ~ 56.3	0.15	1.94
新乌头碱	$Y = 26.60X - 2.050$	0.999 5	0.121 8 ~ 12.18	1.84	1.89

表 3 日内日间精密度

分析成分	日内 RSD/%	日间 RSD/%
芍药苷	1.3	1.9
延胡索乙素	1.1	1.4
原阿片碱	1.4	1.6
乌头碱	0.65	1.5
次乌头碱	0.81	0.91
新乌头碱	1.1	1.7

**2.5 稳定性试验** 取配置好的同一供试品溶液,分别于不同时间点测定峰面积(0,1,2,4,6,8,10,12 h),结果显示 12 h 时供试品最为稳定,峰面积变化不大,芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的 RSD( $n=8$ )分别为 1.8%,1.7%,1.4%,1.0%,1.9%,1.4%。

**2.6 重复性试验** 精密称取同一批号(20120402)的供试品 6 份,按照上述方法制备溶液并对成分进行测定,芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量均值分别为 206.72,122.17,161.12,7.15,32.65,10.69  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,RSD 分别为 0.42%,1.8%,0.77%,1.4%,1.4%,1.5%。

**2.7 加样回收试验** 精密称取同一供试品(20120401)6 份,0.25 g/份,置于 25 mL 量瓶中,在 6 个量瓶中分别加入 1 mL 6 种对照品溶液(芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品溶液的质量浓度分别为 52.54,30.11,42.59,1.80,8.17,2.52  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),平均回收率分别为 97.2%,96.5%,102.5%,96.8%,100.8%,98.5%,RSD 分别为 1.4%,1.2%,0.7%,0.7%,1.1%,1.1%。

**2.8 样品含量测定** 按照供试品溶液的制备和检测方法,对样品中 6 种有效成分进行测定,见表 4。

表 4 止痛方提取物 6 种有效成分含量测定  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	芍药苷	延胡索乙素	原阿片碱	乌头碱	次乌头碱	新乌头碱
20120401	207.15	122.17	169.04	7.12	32.58	10.72
20120402	207.21	123.85	167.92	6.82	33.13	10.64
20120403	208.03	121.67	169.12	7.09	32.79	10.51

### 3 讨论

本试验在参照 2010 年版《中国药典》中相关药材检测波长的基础上,对对照品溶液进行紫外扫描,确定芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的检测波长分别为 230,280,280,235,235,235  $\text{nm}^{[3]}$ 。在流动相的选择时根据指标性成分 pKa 的不同<sup>[4]</sup>,比较了甲醇-乙腈、缓冲盐为主的系统,发现在 pH 9 时,乌头类生物碱可以实现基线

分离且分析时间适宜,色谱柱损坏较小。

在两种不同的提取方法中,应用超声提取的 6 种有效成分的含量高于回流提取,因此最终选择超声提取作为有效成分的提取方法,应用甲醇-氨水(20:1)作为提取剂,30 min 内即可提取完全。

虽然有通过 HPLC 测定芍药苷、延胡索乙素、原阿片碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的研究<sup>[5-10]</sup>,但尚无同时测定上述 6 种成分的方法。本研究将止痛方中的 6 种有效成分在同一洗脱梯度和色谱上得以有效分离,从而为止痛方的质量控制建立起一种有效地检测方法,并对其他方剂多种有效成分一次性测定提供一定的借鉴价值。

### [参考文献]

- [1] 邵世祥,邵泽蓉,王子鑫,等. 中药止痛散膏外敷抗肿瘤止痛的临床观察[J]. 辽宁中医杂志,2005,32(12):1284.
- [2] Kükboyaci N, Güven A, Din E, et al. New HPLC-chemometric approaches to the analysis of isoflavones in *Trifolium lucanicum* Gasp. [J]. J Separation Sci,2010,33(17/18):2558.
- [3] 赵碧清,段更利. 高速逆流色谱法在中药有效成分分离中的应用[J]. 中成药,2009,31(9):1347.
- [4] Ouyang Li-Qun, Wu Hai-Long, Nie Jin-Fang, et al. Simultaneous determination of psoralen and isopsoralen in plasma and Chinese medicine Zhitong capsule by using HPLC-DAD coupled with alternating trilinear decomposition algorithm [J]. Analytica Chimica Acta, 2009,650(2):160.
- [5] 李向阳,屠万倩,张留记,等. RP-HPLC 法测定不同产地的牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 中药新药与临床药理,2011(5):563.
- [6] 胡正明,葛婷婷,荆露,等. HPLC 测定大柴胡颗粒中芍药苷的含量[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(6):589.
- [7] 倪琳,杨锡. HPLC 测定雪山山罗汉止痛涂膜剂中延胡索乙素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):106.
- [8] 王伟,尚强,杨璐,等. HPLC 同时测定痛宁凝胶中延胡索乙素和原阿片碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):93.
- [9] 马芳,赵东,吴晓霞,等. LC-MS-MS 法检测附子水提液中新乌头碱、次乌头碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):95.
- [10] 王岩,刘欣欣. 高效液相色谱法测定嘎日迪五味丸中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱含量[J]. 中国药业,2011,20(17):33.

[责任编辑 邹晓翠]