

HPLC 同时测定都梁滴丸中的阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素

席海为¹, 马强², 李强¹, 雷海民^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

[摘要] 目的: 建立一种同时测定都梁滴丸中的阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素含量的方法。方法: 都梁滴丸以 75% 甲醇超声提取 30 min 后取上清液, 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长分别为 254, 320, 330 nm。结果: 4 种成分的方法最低定量限为 3 ~ 15 mg·kg⁻¹, 线性范围 0.5 ~ 50 mg·L⁻¹, 相关系数 (r^2) ≥ 0.999 5。高、中、低 3 个添加水平的平均加样回收率 ($n=5$) 为 96.6% ~ 102.5%, RSD 0.16% ~ 2.07%。结论: 该方法简便、快速适用于都梁滴丸中阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素和异欧前胡素的含量测定。

[关键词] 高效液相色谱法; 都梁滴丸; 阿魏酸; 5-甲氧基补骨脂素; 欧前胡素; 异欧前胡素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0081-05

Simultaneous Determination of Ferulic Acid, 5-Methoxypsoralen, Imperatorin and Isoimperatorin in Duliang Dropping Pills by High Performance Liquid Chromatography

XI Hai-wei¹, MA Qiang², LI Qiang¹, LEI Hai-min^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a high performance liquid chromatographic (HPLC) method for simultaneous determination of ferulic acid, 5-methoxypsoralen, imperatorin, isoimperatorin in Duliang dropping

[收稿日期] 20110309(008)

[第一作者] 席海为, 硕士研究生, 从事中药分析研究

[通讯作者] * 雷海民, 副教授, 硕士生导师, Tel: 010-84738640, E-mail: leihaimin@126.com

表 4 使用不同色谱柱测定

色谱柱	理论塔板数	质量分数 /mg·g ⁻¹	RSD /%
岛津 Shim-pack VP-ODS (6.0 mm × 150 mm, 5 μm)	7 500	1.81	
迪马 Diamonsil C ₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	11 000	1.83	0.6
奥泰 Alltima HP-C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	15 000	1.82	

女金丸药味众多, 所含化学成分比较复杂, 供试品溶液中含较多的杂质成分, 选择甲醇与乙腈混合流动相, 能够使橙皮苷的峰形较好, 且与其他峰更好

地分离。从图 1 可以看出, 2 倍橙皮苷保留时间处有明显的吸收峰, 若需连续进样分析时, 每次采集数据后可以提高流动相的乙腈比例将杂质成分快速洗出, 再进行下一次进样。

采用本方法测定橙皮苷的含量, 简便、准确、重复性好, 可以有效控制女金丸的质量。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 340, 132, 478.

[责任编辑] 蔡仲德]

pills. **Method:** Duliang dropping pills were extracted supersonically with 75% methanol for 30 min. The supernatant was separated on Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) by gradient program with methanol (A)–water with 0.1% phosphoric acid (B) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and determined by diode array detector at 254, 320, 330 nm respectively. **Result:** The limits of quantification of four compounds were in the range of 3–15 mg·kg⁻¹, this method showed a good linearity between 0.5–50 mg·L⁻¹ and the correlation coefficient (R^2) was more than 0.999 0. The average recoveries were from 96.6% to 102.5% with relative standard deviation from 0.16% to 2.07%. **Conclusion:** This method is simple and rapid and suitable for determination of the four compounds in Duliang dropping pills.

[Key words] HPLC; Duliang dropping pills; ferulic acid; 5-methoxypsoralen; imperatorin; isoimperatorin

都梁丸是由白芷和川芎 2 种中药组成的具有悠久历史的中药方剂,具有活血通络,祛风散寒的功效,广泛应用于头痛和偏头痛的临床治疗。关于都梁丸的最早记载是宋·王缪的《是斋百一选方》,“香白芷大块,择白色新洁者,先以棕刷刷去尘土,用沸汤泡洗四五遍。上为细末,炼蜜和丸,如弹子大,每服一丸,多用荆芥点腊茶细嚼下”。都梁滴丸在原方的基础上开发为滴丸剂型,已被国家列入头痛类的非处方药,并已生产多年,但迄今对其制剂质量控制的标准仍不完善,仅凭借 HPLC 测定了都梁滴丸中的欧前胡素含量^[1]。考虑到处方内白芷的主要成分经研究主要为挥发油和香豆素类化合物^[2-4],其中欧前胡素、异欧前胡素和 5-甲氧基补骨脂素均具有药理活性^[5-6]。川芎中主要成分是阿魏酸和挥发油等^[7-8],其中的阿魏酸被证明具有中枢保护和降低颅动脉血压的作用^[9],且与偏头痛的治疗相关^[10]。故本研究采用高效液相法同时对都梁滴丸中的阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素进行了定量分析,建立了简便且快速测定都梁丸 4 种有效成分含量的方法。

1 材料

岛津 LC-20AT 型高效液相色谱,配有 DAD 检测器,LC-solution 工作站;KQ-600B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);MS₂ 型漩涡振荡器(德国 IKA 公司),甲醇(HPLC 级,美国 Fisher 公司),其他试剂均为分析纯(北京化工厂)。5-甲氧基补骨脂素(纯度 99%)购于美国 Sigma 公司;异欧前胡素(批号 110827-200407),阿魏酸(批号 0773-9910),欧前胡素(批号 110826-200712)均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱。0~6 min 40% A;6 min~10 min 40%~56% A;10~15 min 56%~60% A;15~20 min 60% A;20~35 min 60%~69% A;35~38 min 69% A。流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。检测波长欧前胡素(3 号峰)和异欧前胡素(4 号峰)在 254 nm,5-甲氧基补骨脂素(2 号峰)在 320 nm,阿魏酸(1 号峰)在 330 nm 检测。柱温 30 ℃。

2.2 对照品储备液的配制 分别精确称取阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素的对照品各 50.0 mg(精确至 0.1 mg)于 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,分别配成 1 000 mg·L⁻¹ 的对照品储备液。将对照品储备液配制成混合对照品溶液再将其稀释成系列混合对照品工作溶液,4 ℃ 下,避光保存。

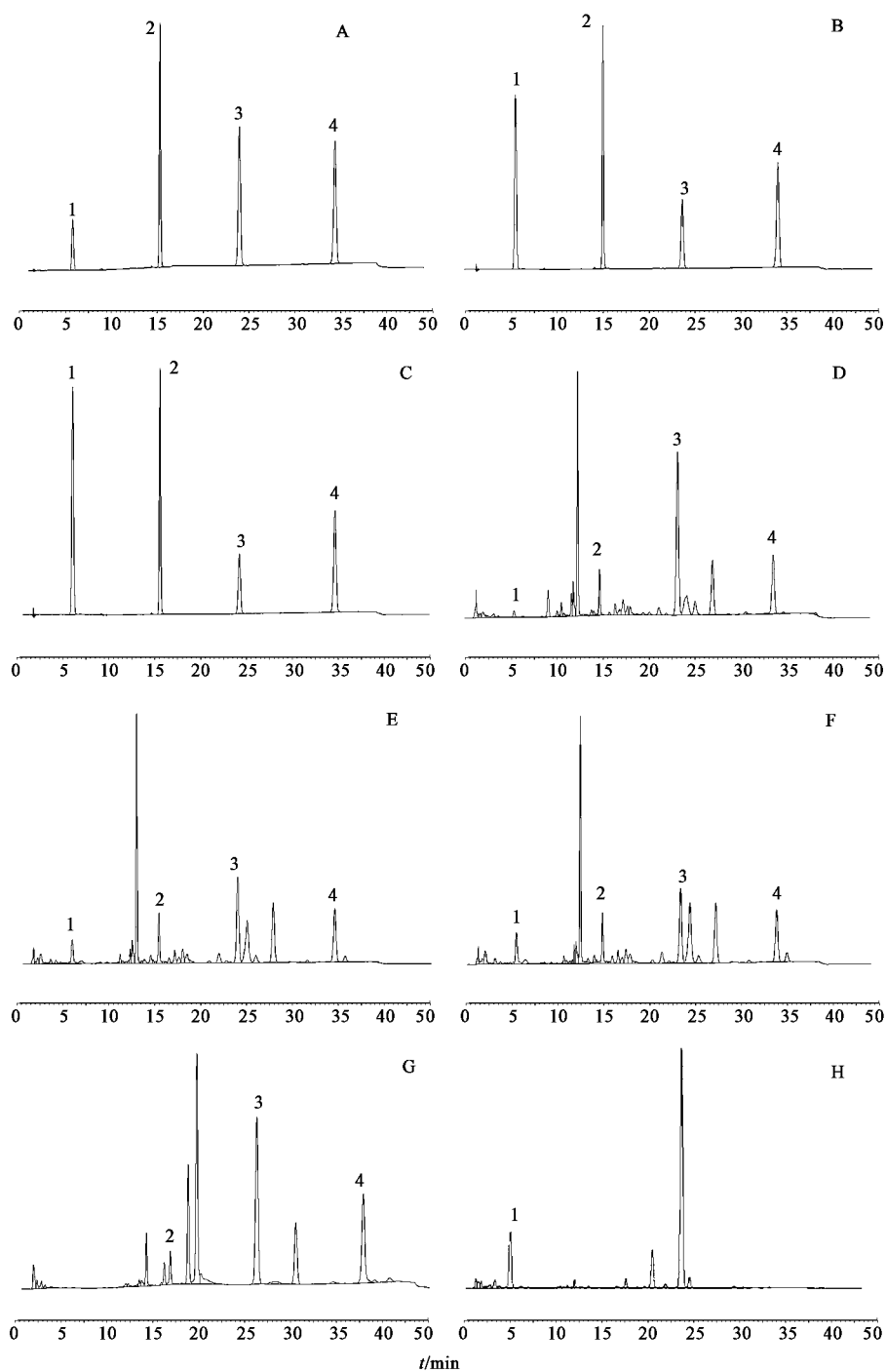
2.3 线性关系的考察 分别精密量取质量浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20, 40, 50 mg·L⁻¹ 的混合对照品工作溶液测定,以色谱峰面积 Y 对相应的质量浓度 X (mg·L⁻¹) 做图,结果表明阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素均在 0.5~50 mg·L⁻¹ 线性关系良好($R^2 \geq 0.999 5$)。

在本方法确定的实验条件下进行测定,分别以 10 倍信噪比作为定量限,结合前处理步骤确定了 4 种成分的方法定量限(LOQ)。结果见表 1。

2.4 空白对照品溶液的配制 按照处方药的比例,分别配制不含白芷和川芎的模拟制剂,按照 2.5 所述前处理方法制备空白对照溶液,按照 2.1 所述色谱条件进行测定。结果表明,空白对照溶液在与阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素相对应的保留时间处未显示色谱峰,阴性无干扰。见图 1。

表 1 都梁丸中 4 种成分的保留时间、检测波长、线性方程和定量限

化合物	保留时间/min	检测波长/nm	定量限/mg·kg ⁻¹	线性方程	相关系数
阿魏酸	5.57	330	3	$Y = 55\ 442X - 4\ 568.7$	0.999 5
5-甲氧基补骨脂素	14.89	320	3	$Y = 43\ 139X - 2\ 802.4$	0.999 7
欧前胡素	23.35	254	15	$Y = 47\ 415X - 5\ 200.7$	0.999 6
异欧前胡素	33.84	254	15	$Y = 50\ 973X - 6\ 017.9$	0.999 5



A. 254 nm 混合对照品; B. 320 nm 混合对照品; C. 330 nm 混合对照品; D. 254 nm 滴丸; E. 320 nm 滴丸; F. 330 nm 滴丸;
G. 川芎阴性对照; H. 白芷阴性对照; 1. 阿魏酸; 2. 5-甲氧基补骨脂素; 3. 欧前胡素; 4. 异欧前胡素

图 1 都梁丸的液相色谱

2.5 药品的前处理方法 称取都梁滴丸 0.5 g(精确至 1 mg),置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加 75% 甲醇水溶液 15 mL,充分混匀,置超声波清洗器中提取 30 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,稀释适当倍数后供高效液相相色谱测定。

2.6 重复性和稳定性实验 分别精密称取同一批次都梁丸样品 0.5 g(精确至 1 mg) 6 份,按样品前处理方法制备供试品溶液,按含量测定条件操作,测定阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素的物质含量,平行测定 6 次,计算出阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素的平均含量,见表 2。并计算 RSD 分别为 2.10%, 2.89%, 0.31% 2.45%。

取同一供试品溶液室温保存,分别在 0, 2, 6, 8, 12, 24 h 进样测定,结果阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的 RSD($n=6$) 分别为 2.46%, 2.22%, 1.77%, 2.94%。表明供试品溶液中 4 种成分在 24 h 内均稳定。

2.7 方法的加样回收率和精密度 分别精密称取都梁滴丸适量,依据本实验方法进行测定。在高、中、低每个添加水平下,平行制备样品 5 份并测定,阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素的平均回收率分别为 102.5%, 99.2%, 97.9%, 99.4%, RSD 分别为 2.01%, 0.86%, 0.35%, 0.15 (见表 2)。

表 2 阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素平均加标回收率和精密度($n=5$)

化合物	样品中含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	加入量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	平均回收率/%	RSD/%
阿魏酸	635.32	864	101.25	0.75
	635.32	720	101.08	1.47
	635.32	576	102.47	2.07
5-甲氧基补骨脂素	1 327.58	1 440	99.65	1.71
	1 327.58	1 200	98.81	0.2
	1 327.58	960	99.15	0.88
欧前胡素	7 888	9 960	97.4	0.28
	7 888	8 300	97.38	0.16
	7 888	6 640	97.94	0.35
异欧前胡素	2 943.6	4 268	96.64	0.46
	2 943.6	3 556	97.46	0.61
	2 943.6	2 844	99.39	1.46

2.8 实际样品的测定 应用本方法分别对市售 3 批都梁滴丸样品中的阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素进行分析测定。结果见表 3。

表 3 市售 3 批都梁滴丸中 4 种成分的检测($n=2$)

No.	$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$			
	阿魏酸	5-甲氧基补骨脂素	欧前胡素	异欧前胡素
1	644.18	1 369.60	8 138.88	2 955.68
2	592.88	1 330.77	7 502.03	3 135.58
3	611.01	1 350.17	7 817.37	2 944.73

提取回收率,经过比较发现 75% 甲醇的提取回收率最高,故最终选择 75% 甲醇作为提取溶剂。

3.1.2 提取时间 称取等量的都梁滴丸,同时分别超声提取 15, 30, 45 min,按照样品前处理方法处理后,测定 4 种成分的含量,结果发现提取时间 30 min 时 4 种成分的提取效率均较高。因此采用超声提取时间 30 min。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 色谱柱 分别考察了 Agilent Zorbax Eclipse C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Agilent Zorbax SB C_{18} (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 柱,对于 4 种成分的分离效果,结果表明 4 种成分和都梁丸中的基质峰在不同色谱柱上表现出了明显的分离选择性的差异,尤其是峰对称性差异较大。综合考虑峰对称性、分离度和总分析时间,最终使用 Agilent Zorbax SB C_{18}

3 讨论

3.1 前处理条件的选择

3.1.1 提取溶剂 都梁丸中这 4 种成分在甲醇、乙醇中都有较好的溶解度,所以本实验考察了甲醇、乙醇、水以及 2 种有机溶剂与水不同比例的混合液的

(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 柱获得最理想的分离效果。

3.2.2 检测波长 通过分别对 4 种成分的标准溶液的紫外-可见光的全扫描(200~400 nm) 分析发现在阿魏酸在 330 nm 有最大吸收。5-甲氧基补骨脂素在 320 nm 处有较大吸收且干扰较小, 欧前胡素和异欧前胡素在 254 nm 处都有较大吸收, 且此波段紫外灯能量较稳定。综合考虑以上的紫外吸收特点, 确定用 254, 320, 330 nm 作为检测波长。

3.2.3 流动相 比较了不同组成的流动相, 考虑到阿魏酸的峰型, 选择水相中加入 0.1% 的磷酸。并比较流动相为水与含酸水溶液的分离度、色谱峰形及出峰时间, 结果表明, 选用甲醇和 0.1% 磷酸水溶液为流动相可获得较好的色谱峰形。进一步经过实验优化, 确定 2.1 所示的梯度洗脱条件。

4 结论

本研究建立了 HPLC 法测定都梁滴丸中的 4 种成分的检测方法, 其回收率、定量下限、精密度等各项指标均符合要求, 具有简单、快速的特点, 在 35 min 内可完成对阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素的分析, 适用于药品检验工作。

[参考文献]

[1] 谭生建, 胡文祥, 卢嘉琪, 等. RP-HPLC 测定都梁丸中

欧前胡素的含量[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(7): 410.

[2] 卢嘉, 金丽, 金永生. 中药杭白芷化学成分的研究[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(3): 294.

[3] 弥宏, 曲莉莉, 任玉林. 超临界萃取中药白芷的化学成分的气相色谱-质谱分析[J]. 分析化学, 2005, 33(3): 366.

[4] Liu R M, Li A, Sun A L. Preparative isolation and purification of coumarins from *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth, et Hook. f (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2004, 1052: 223.

[5] 卢闻, 贺浪冲. 白芷香豆素类有效部位体外透皮特性研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(12): 939.

[6] 张韶瑜, 孟林, 高文远, 等. 香豆素类化合物生物学活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 410.

[7] 王文祥, 顾明, 蒋小岗. 川芎化学成分研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 4.

[8] 李艳辉, 易进海, 官艳丽, 等. 超临界萃取川芎精油的 GC-MS 分析[J]. 分析实验室, 2007, 26(5): 106.

[9] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 253.

[10] 杨明山. 偏头痛的药物治疗进展[J]. 医药导报, 2005, 24(2): 89.

[责任编辑 蔡仲德]