

HPLC 测定复方痛风安颗粒中延胡索乙素的含量

罗 焜¹, 冯汉鸽², 彭利霞¹

(1. 湖北中医学院 2004 级硕士研究生, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430061)

关键词: 痛风安颗粒; 延胡索乙素; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-0704(2007)04-0052-02

复方痛风安颗粒剂是由山慈姑、延胡索、黄柏、怀牛膝等中药研制而成的中药复方制剂, 治疗痛风性关节炎疗效良好, 方中延胡索具有止痛镇静、活血通络的作用, 是该制剂的主药之一。延胡索乙素^[1]为延胡索的主要有效成分, 具有热不稳定性和光不稳定性, 含量仅占药材的 0.05%。笔者以延胡索乙素的含量作为该制剂质量控制的指标进行测定, 以确保产品的质量和临床疗效。其方法学研究报告如下。

1 仪器及试剂

1.1 仪器

美国 Waters 600 2996 高效液相色谱仪(PDA 紫外检测器, EMPOWER 化学工作站); KQ 100A 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); E12140 万分之一电子天平(OHAU); 320 Sdelta PH 计(梅特勒-托利多)。

1.2 药品与试剂

延胡索乙素对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用); 实验药材来自湖北省中医院中药房, 经鉴定符合 2005 年版药典, 甲醇、乙腈, 色谱纯; 乙醇、乙醚, 分析纯; 双蒸水为自制; 其他试剂为分析纯。

2 测定条件及方法

2.1 色谱条件

参照中国药典 2005 版一部^[2], 选用色谱柱: Agilent HC-C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸(用三乙胺调节 pH 至 6.0)(38:62); 检测波长: 280nm; 柱温: 30℃。流速: 1ml/分钟; 进样量: 10μl。延胡索乙素峰保留时间约为 12.3 分钟, 阴性对照色谱图在延胡索乙素峰位置无干扰峰, 延胡索乙素与其它组分达基线分离, 分离度不低于 2.0。理论塔板数以延胡索乙素峰面积计算不低于 3000。

2.2 对照品溶液及阴性对照品溶液的制备

精密称取延胡索乙素对照品 0.0006g, 置 10ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物 20g, 置 250ml 圆底烧瓶中, 加 70%乙醇 160ml, 浸泡 30 分钟, 加热回流提取 2 次, 每次 3 小时, 放冷滤过, 合并滤液, 浓缩至 100ml, 取浓缩液 10ml 上中性氧化铝柱, 用 70%乙醇洗涤 3 次, 每次 100ml, 收集洗涤液。挥干, 残渣用甲醇溶解至 10ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45μm 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。另取缺延胡索的阴性制剂, 同法制成阴性对照溶液。吸取延胡索乙素对照品, 供试品溶液及阴性对照溶液各 10μl 进样, 记录色谱图。

3 方法学考察

3.1 线性关系的考察

取标准品溶液适量, 分别配制成 12、24、36、48、60μg/ml 浓度的溶液, 各吸取 10μl 注入色谱仪, 按上述色谱条件进行测定, 以峰面积积分为纵坐标, 进样量为横坐标绘制标准曲线。得回归方程为 $Y = 7.93 \times 10^5 X - 1.00 \times 10^3$ ($r = 0.9997$)。结果表明: 延胡索乙素在 0.12~0.60μg 范围内具有良好的线性关系。

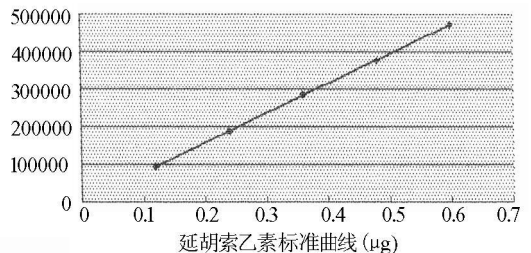


图 1

3.2 精密度试验

精密吸取 6μg/ml 的对照品溶液重复进样测定, 每次 10μl 注入液相色谱仪中, 测定其峰面积。统计结果表明,

4 讨论

利咽颗粒为中药复方制剂, 成分复杂, 杂质多, 经过氧化铝柱处理后, 可除去色素等杂质, 使样品中连翘苷与其他成分得到较好地分离。本方法准确、简便、重复性好, 为有效地控制该制剂的质量提供合理的依据。

参考文献:

[1] 张玲, 单卫华, 时延增, 等. 青翘和老翘中连翘苷的含量测定

[J]. 中国现代应用药学, 1999, 16(1): 45-46.

[2] 候莉, 王强, 任晋斌. RP-HPLC 法测定不同来源连翘药材中连翘苷的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(1): 48-50.

[3] 展雪峰, 张翠萍, 王涛. HPLC 测定银翘解毒片中连翘苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1088-1089.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005 年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 118.

(收稿日期: 2006-11-30 编辑: 郝晓屏)

RSD=1.03%(n=5),表明本仪器精密度良好。

3.3 重现性试验

取批号为 051107 的样品,按供试品制备方法,平行操作制备成 5 份供试品溶液后按样品测定项下方法测定,平均含量为 43.22 μ g/g, RSD 为 2.26%(n=5),表明本方法重现性良好。

3.4 稳定性试验

取批号为 051107 的样品,按供试品制备方法制备成供试品溶液后,分别间隔 0、4、6、12、24 小时,每次 10 μ l 注入液相色谱仪中,测定其峰面积。统计结果表明, RSD=1.24%,表明供试品溶液在 24 小时内稳定。

3.5 加样回收率试验

精密称取批号 051107 样品(42.96 μ g/g) 5 份于磨口烧瓶中,分别精密加入不同浓度的延胡索乙素对照品溶液一定量,摇匀,按样品供试液制备项下同法操作,精密吸取上述五个不同样品供试液各 10 μ l 依法进样测定,计算延胡索乙素回收率。结果平均回收率为 97.61%, RSD=0.58%(见表 1),表明本方法具有良好的回收率。

表 1 延胡索中延胡索乙素的回收率测定结果

编号	样品量(μ g)	添加量(μ g)	测得量(μ g)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	343.73	120	450.10	97.06		
2	344.67	120	457.24	98.40		
3	344.17	120	458.32	98.74	97.61	0.58
4	343.78	240	566.15	96.98		
5	344.21	240	568.20	97.26		
6	344.09	240	567.91	97.23		

4 样品中延胡索乙素的含量测定

精密称取已成型的痛风安颗粒 5 批,按供试品的制备方法制备成供试液,分别精密吸取对照品试液和供试品试液 10 μ l 注入色谱仪,以外标法进行测定结果见表 2。

表 2 延胡索乙素的含量测定

编号	取样量(μ l)	测得量(μ g/g)	平均含量(μ g/g)
051107	10	42.94	
051213	10	43.22	
060211	10	42.86	42.92
060228	10	43.01	
060312	10	42.57	

根据表 2 结果,规定本品每 1g 含延胡索乙素的含量不低于 34.23 μ g。

5 讨论

5.1 流动相的选择

对延胡索乙素 HPLC 测定,文献报道有多种流动相如:甲醇-水-磷酸盐缓冲溶液(磷酸氢二钠 2.24g 加磷酸二氢

钠 0.989g 加水至 100ml)(60:40)^[4]、甲醇-磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)(60:40)^[5]、甲醇-3% HAC 溶液(含 0.2mol/L NH₄AC)^[6] 等我们分别进行对比试验,发现本方法流动相分离效果较好,适于本品的含量测定。

5.2 供试品溶液的制备

本品为中药复方制剂,药物成分复杂,而且延胡索中含有多种生物碱,延胡索乙素的含量在其总生物碱比例较低。笔者尝试了多种方法提取延胡索乙素,最后发现采用乙醇回流提取延胡索,其延胡索乙素含量最高。对于提取物的纯化问题,据报道^[7] 提取用乙醚重复萃取,经笔者重复试验发现,单纯使用乙醚重复萃取会导致回收率偏低且有较多的其它成分干扰,而将提取物浓缩后通过中性氧化铝柱,不仅可以明显提高回收率而且可以降低其他成分干扰,且操作简便。

5.3 洗脱溶剂用量考察

实验发现经过 3 次 10 倍量的乙醇洗脱,基本洗脱完全。结果表明,本样品的处理方法提取安全,图谱清晰阴性无干扰。

5.4 检测波长的确定

延胡索乙素对照品溶液在 200~350nm 范围扫描,结果在 281.9nm 处有最大吸收峰,与文献记载 280nm 相近^[2],故为了保持与文献的一致性,而又不影响本品的测定结果,确定采用 280nm 作为检测波长。

5.5 含量考察

笔者对已成型的 5 批样品进行含量测定,规定本品每克含延胡索乙素的量应在平均值的 $\pm 20\%$,即在 34.23 μ g~51.50 μ g 之间。

6 结论

采用高效液相色谱法测定复方痛风安颗粒中延胡索乙素的含量,方法简便、快捷、重现性好,适用于本制剂的质量控制和评价。

本实验是复方痛风安颗粒剂新药研究中的一部分,对于延胡索的最佳提取工艺的考察,及其他药物如山慈菇提取工艺考察,含量测定等研究将另文报道。

参考文献:

- [1] 黄泰康.常用中药成分与药理手册[M].北京:中国医药科技出版社,1999.874-881.
- [2] 国家药典委员会,中华人民共和国药典[S].北京:化学工业出版社,2005.94.
- [3] 张桂芝,聂诗明,吴志明等.延胡索醇提工艺的研究[J].湖北中医杂志,2005,(11):55-57.
- [4] 刘芬,谢慧臣.高效液相色谱法测定妇科调经片中延胡索乙素的含量[J].湖北中医杂志,2005,7:52-53.
- [5] 龚青,周蒂,王碧娟.HPLC 法测定延胡索中延胡索乙素的含量[J].中国现代应用药学杂志,2000,17(4):315-317.
- [6] 杨天展.高效液相色谱法测定胃得康散中延胡索乙素含量[J].时珍国医国药,2000,11(1):31-32.
- [7] 原永芳,李修禄,柳正良等.超临界流体萃取法及高效液相色谱法分析延胡索中延胡索乙素的含量[J].药学报,1996,31(4):282-286.

(收稿日期:2006-10-10 编辑:郑晓屏)