

高效液相色谱法测定复方痛风定颗粒中秋水仙碱含量^{*}

汪琦¹, 冯汉鸽², 贺薇薇¹, 马卓³, 巴赛⁴

(1. 湖北中医药大学 2007 级硕士研究生班, 武汉 430065; 2. 湖北省中医院药剂科, 武汉 430061; 3. 湖北工业大学生物工程学院, 武汉 430068; 4. 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的 制定复方痛风定中秋水仙碱的含量测定方法, 以便控制质量。方法 采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 色谱柱 Agilent HC-C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm; 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (45:55); 检测波长: 245 nm; 柱温: 25 °C。结果 复方痛风定颗粒中秋水仙碱在 0.06~0.18 mg·mL⁻¹ 范围线性关系良好, r=0.9993 平均回收率 98.66%, RSD=1.73%。结论 该法操作简单, 结果准确, 可作为本制剂的质量控制和评价方法。

[关键词] 痛风定颗粒, 复方; 秋水仙碱; 含量测定; 色谱法, 高效液相

[中图分类号] R286 R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2011)01-0092-02

复方痛风定颗粒是由光慈菇、延胡索、黄柏、怀牛膝等中药研制而成的中药复方制剂, 光慈菇为方中主药, 具有解毒散结、消肿镇痛的功效; 秋水仙碱为主要有效成分, 能抑制粒细胞浸润和乳酸的生成, 是治疗痛风急性发作的有效成分, 并且具有一定毒性^[1-2]。本课题组成员已对制剂制备工艺的优选, 延胡索中延胡索乙素和黄柏中盐酸小檗碱的含量测定做过报道^[3], 笔者以秋水仙碱的含量为该制剂的主要考察指标之一进行测定, 以保证制剂质量, 确保制剂临床用药安全和临床疗效。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Waters 600 泵, Waters HDA 检测器, EMPOWER 化学工作站, Agilent HC-C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm; 5 μm), E12140 型电子天平 (OHAUS), 320-SdeltaH 计 (梅特勒 托利多); KQ-100A 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 秋水仙碱 (西双版纳药业有限公司, 批号: 090301), 实验药材来自湖北省中医院中药房, 经鉴定符合卫生部部颁标准, 经制备制成复方痛风定颗粒 5 批, 甲醇 (山东禹王实业有限公司, 色谱纯); 重蒸馏水为自制; 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent HC-C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm; 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (45:55); 检测波

[收稿日期] 2010-03-22 [修回日期] 2010-04-27

[基金项目] * 湖北省科技厅资助项目 (基金编号: 2008FY230400)

[作者简介] 汪琦 (1984-), 男, 湖北武汉人, 在读硕士, 从事中药新制剂和新剂型的研究。电话: 027-88317011 E-mail: 61294445@qq.com

[通讯作者] 冯汉鸽, 女, 主任药师, 从事中药新制剂和新剂型研究。电话: 027-88929175 E-mail: fhang@126.com

长: 245 nm; 柱温: 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 分离度不低于 2.0 理论塔板数以秋水仙碱峰面积计算不低于 3000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取秋水仙碱对照品 7.5 mg 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配制成 0.3 mg·mL⁻¹ 溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品 20 g 研碎, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加 80% 乙醇 120 mL 浸泡 30 min 加热回流 2 h 回流 3 次, 放冷滤过, 合并滤液, 置于水浴锅上将乙醇挥发完全, 用 10% 盐酸调节 pH=2 用三氯甲烷萃取 3 次, 每次 80 mL 合并萃取液, 用 5% 氢氧化钠溶液约 200 mL 洗涤 1 次。水浴挥干三氯甲烷, 残渣用甲醇溶解至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用筛孔孔径 0.45 μm 滤膜过滤, 吸取滤液作为供试品试剂^[4-5]。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方制备不含光慈菇药材的样品, 同“2.2.2”项方法制成阴性样品溶液。

2.3 适应性实验 取不含秋水仙碱的阴性制剂, 按供试品的方法提取, 并按色谱条件测试。结果在秋水仙碱对照品处未出现色谱峰。见图 1。

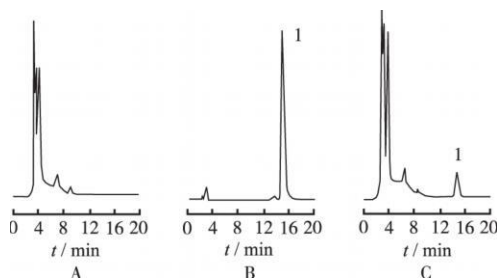


图 1 阴性样品、对照品和样品的 HPLC 色谱图

A 阴性样品; B 对照品; C 样品; 1 秋水仙碱

2.4 线性关系考察 取标准品适量, 分别配制成 0.03 0.06 0.09 0.12 0.15 0.18 mg·mL⁻¹ 浓度的溶

液,各吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪中,按上述色谱条件进行测定,以峰面积积分值为纵坐标,进样浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $Y=2.713 \times 10^7 X - 5.916 \times 10^5$, $r=0.9993$ 。结果表明秋水仙碱在 $0.03 \sim 0.18 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内具有良好线性关系。

2.5 精密度实验 精密吸取 $0.18 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液重复进样 5 次测定,测定其峰面积,统计结果表明, $\text{RSD}=1.51\%$ ($n=5$) 表明本仪器精密度良好。

2.6 重复性实验 取批号为 090902 的样品,按“2.2.2”项方法制备,平行制备 5 份,按样品测定方法测定, $\text{RSD}=1.87\%$ ($n=5$),表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性实验 取批号为 090902 的样品,按“2.2.2”项方法制备,分别于 0 2 4 6 8 12 h 测定其峰面积。结果表明, $\text{RSD}=0.72\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率实验 精密称取批号为 090902 的样品 9 份,置于 250 mL 烧瓶中,分别精密加入不同量的秋水仙碱对照品,摇匀,按供试品方法制备,精密吸取上述 9 份不同供试品 $10 \mu\text{L}$ 依法进样测定,计算秋水仙碱回收率。结果平均回收率为 98.66% , $\text{RSD}=1.73\%$ 。见表 1。表明本方法有良好的回收率。

表 1 秋水仙碱对照品的回收率测定结果 μg

样品量	加入量	测得量	回收率 /%
186.10	100	284.34	98.24
186.10	100	283.66	97.56
186.10	100	287.28	101.18
186.10	150	331.26	96.77
186.10	150	330.02	95.95
186.10	150	336.75	100.43
186.10	200	383.48	98.69
186.10	200	384.16	99.03
186.10	200	386.24	100.07

2.9 样品中秋水仙碱的含量测定 精密称取已成型的痛风定颗粒 5 批,按供试品溶液制备方法制备溶液,经孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,进样 $10 \mu\text{L}$,按上述色谱条件测定,计算样品中秋水仙碱含量,结果批号为 090702 090808 090902 091010 091105 的样品,秋水仙碱含量分别为 8.988 9.252 9.139 9.1802 $9.012 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{RSD}=1.231\%$ 。计算得秋水仙碱转移率为 62.15% [6]。

3 讨论

3.1 流动相的选择 HPLC 法对秋水仙碱的测定,文献报道 [7-9] 多种流动相: 甲醇 : 磷酸二氢钾溶液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) = 50 : 50 50% 甲醇; $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷

酸盐缓冲液 (1 : 1, $\text{pH}=4.5$), 乙腈 : 水 = 30 : 70 等,分别进行了对比实验,发现本方法流动相分离效果好,操作简单,适用于制剂的含量测定。

3.2 供试品的制备 秋水仙碱为环庚三烯酮醇的衍生物,分子中有两个骈合的七碳环,氮原子在侧链上呈酰胺状态,所以秋水仙碱几乎不显碱性,在酸性或碱性水溶液中,加三氯甲烷震荡,均可被三氯甲烷提出,再用 5% 氢氧化钠溶液洗涤,去除多余杂质 [8]。本方法不仅可以提高秋水仙碱回收率,并且还可以显著降低其他成分的干扰,操作简便易行。

3.3 检测波长的确定 秋水仙碱对照品溶液在 $210 \sim 380 \text{ nm}$ 范围扫描,结果 245 和 350 nm 处有最大吸收峰, 245 nm 与文献 [9] 的 220 nm 相近,故为了与文献保持一致,而不影响测定结果,确定采用 245 nm 作为检测波长。

3.4 含量考察 实验测定发现光慈菇中秋水仙碱含量较低,但秋水仙碱具有抗炎、镇痛作用,是治疗痛风急性发作的有效成分,并有一定毒性,为了确保产品的质量、临床疗效和用药安全,将秋水仙碱的含量作为质量控制指标进行测定。

采用 HPLC 测定复方痛风定颗粒中秋水仙碱含量,操作简单,准确,可靠,可作为本制剂的质量控制和评价方法。

[DO] 10.3870/yydb.2011.01.030

[参考文献]

- [1] 蒋宇宁,付玲,李茜.秋水仙提取工艺的研究[J].新疆中医药,2007,26(6):40-42
- [2] 刘净,于志斌,叶蕴华,等.山慈菇的化学成分[J].药学学报,2008,43(2):181-184.
- [3] 罗琨,冯汉鸽,彭丽霞.HPLC测定复方痛风安颗粒中延胡索乙素的含量[J].湖北中医杂志,2007,29(4):52-53
- [4] 田素英,陈周全.山慈菇中秋水仙碱醇提工艺的优选[J].中草药,2006,33(8):47-48
- [5] 宋小妹,唐志书.中药化学成分提取分离与制备[M].北京:人民卫生出版社,2004:82-84
- [6] 王北婴,李仪奎.中药新药研制开发技术与方法[M].上海:上海科学技术出版社,2001:96
- [7] 袁理春,徐中志,赵琪.丽江山慈菇秋水仙碱 HPLC 测定[J].西南农业学报,2007,20(1):120-122
- [8] 俞永梅,张曦.HPLC法测定秋水仙碱片的含量[J].中国医药指南,2008,6(3):23-24
- [9] 卞晓岚,翟青,张芳华.高效液相色谱法测定复方秋水仙碱胶囊中秋水仙碱的含量[J].时珍国医国药,2000,11(4):41-44