

高效液相色谱法测定元胡止痛口服液中延胡索乙素的含量

刘瑞新^{1,3*}, 王青晓²

(1. 河南中医学院第一附属医院药学部, 郑州 450000;

2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立一种测定元胡止痛口服液中延胡索乙素含量的高效液相色谱方法。方法: 收集 10 批元胡止痛片, 经过全面、规范的方法学验证, 确定色谱条件为: C_{18} 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 6.0) (40:60); 检测波长 280 nm。结果: 延胡索乙素在 5.09 ~ 71.23 μg·mL⁻¹ 时, 质量浓度与峰面积积分值呈良好的线性关系, $r=0.999\ 97$, 平均回收率 101.28%, RSD 2.05%; 含量限度定为每 1 mL 含延胡索乙素不得少于 80 μg。结论: 该方法简便、快速、准确, 可用于元胡止痛口服液中延胡索乙素的含量控制。

[关键词] 元胡止痛口服液; 延胡索乙素; HPLC; 含量测定

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0064-03

Determination of Tetrahydropalmatine in Yuanhuzhitong Oral Liquor by HPLC

LIU Rui-xin^{1,3*}, WANG Qing-xiao²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan College of T. C. M., Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China;

3. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of tetrahydropalmatine in Yuanhuzhitong Oral Liquor. **Method:** 10 batches of Oral Liquor were collected. The HPLC determination method was established after comprehensive and standardized methodology validation: C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (adjusted to pH 6.0 with triethylamine) (40:60). The detecting wavelength was 280 nm. **Result:** The linear detection ranges of tetrahydropalmatine were 5.09 ~ 71.23 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 97$), and the average recovery was 101.28% (RSD 2.05%); The content of tetrahydropalmatine shall not be less than 80 μg per mL. **Conclusion:** This method is convenient, rapid and accurate, which could be used for quality control in Yuanhuzhitong Oral Liquor.

[Key words] Yuanhuzhitong oral liquor; tetrahydropalmatine; HPLC; determination of concentrations

元胡止痛口服液收载于国家药品监督管理局国家药品标准 (WS3-099(Z-022)-2002(Z)), 是临床常用中成药, 方由延胡索 (醋制)、白芷二味药组成, 具有理气、活血、止痛功能, 用于气滞血瘀的胃痛、胁痛、头痛及痛经等^[1]。方中延胡索行气活血止痛为主药^[2]。现代研究表明, 延胡索生物碱是延胡索的主要有效成分类型, 而其中延胡索乙素具有明显的镇痛作用^[3], 因此, 控制其中延胡索乙素的含量有重

要意义。

元胡止痛方目前有多种剂型, 文献报道相对较多的是其片剂、胶囊剂及颗粒剂等剂型的含量控制方法, 而其口服液剂型中延胡索乙素的高效液相色谱测定方法的全面、规范建立作者未见报道。本文建立了一种 HPLC 方法测定元胡止痛口服液中延胡索乙素的含量, 方法可靠、可行, 可较好地用于控制该制剂的质量。

1 仪器与试剂

Waters2695 高效液相色谱仪-Waters996 二极管阵列检测器; Waters2695 高效液相色谱仪-Waters2487 双波长紫外检测器; Waters2690 高效液

[收稿日期] 2009-12-10

[通讯作者] 刘瑞新, Tel: (0371) 66233639; E-mail: liuruixin7@ yahoo. com. cn

相色谱仪-Waters2487 双波长紫外检测器;岛津 2100 系列高效液相色谱仪。

延胡索乙素对照品(批号 110726-200409, 中国药品生物制品检定所);KQ-300 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);乙腈为色谱纯(Merck 公司);水为超纯水、磷酸、三乙胺为分析纯;样品:由河南福森制药集团有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(三乙胺调 pH 值至 6.0)(40:60);流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm。理论板数按延胡索乙素峰计算应不低于 6 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 取延胡索乙素对照品适量,精密称定,加甲醇溶液制成每 1 mL 含 25 μg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取本品 10 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 30 mL,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz) 10 min,取出,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,放置,取上清液,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按照处方比例制备缺延胡索的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 线性 精密称取延胡索乙素对照品,加甲醇溶液制成每 1 mL 含延胡索乙素 101.76 μg 的溶液,经逐步精密稀释和倍比配液,制成浓度分别为 5.09, 12.72, 25.44, 35.62, 50.88, 61.06, 71.23 μg·mL⁻¹ 的溶液,依次精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪测定。以色谱峰面积积分值(Y)对质量浓度(X;单位 μg·mL⁻¹)回归,得线性方程 $Y=675\,674.898X-8\,842$, $r=0.999\,97$, 表明延胡索乙素在 5.09 ~ 71.23 μg·mL⁻¹ 时,质量浓度与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 检测限和定量限 采用信噪比法测定,检测限为 4.0×10^{-3} μg;定量限为 1.0×10^{-2} μg (RSD = 2.0%, n=6)。

2.5 专属性 分别精密吸取延胡索乙素对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪测定;在延胡索乙素色谱峰对应的保留时间,在 200 ~ 400 nm 进行紫外光谱扫描,对照品溶液及供试品溶液光谱一致。阴性对照没有干扰。见图 1。

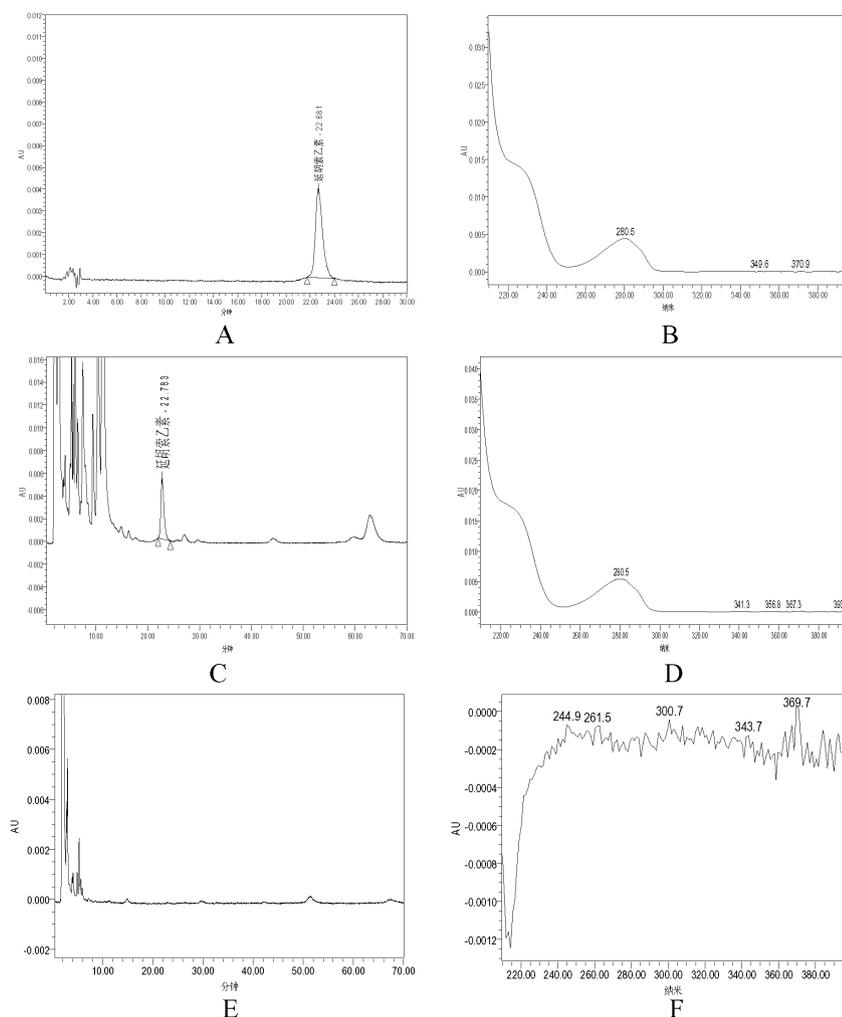


图 1 色谱图和相应保留时间的光谱图
A, B. 对照品; C, D. 样品; E, F. 阴性样品

2.7 耐用性

2.7.1 稳定性试验 取本品(批号 080201),按正文含量测定项下方法,制备供试品溶液,分别在 0, 4, 8, 12, 16, 20 h 进样 1 次,每次进样 10 μL,测定其峰面积,结果平均峰面积 315 483, RSD 1.3%。

2.7.2 不同商品规格的色谱柱试考察 考察了 3 根不同商品规格的色谱柱(Agilent SB-C₁₈ 柱、资生堂 MG C₁₈ 柱、汉邦 Lichrospher C₁₈ 柱),测定同一批号(080201)样品,结果平均质量浓度 0.174 mg·mL⁻¹, RSD 1.3%。

2.8 准确度 精密量取已知含量的本品 6 份,每份 5 mL,分别置 50 mL 量瓶中,精密加入延胡索乙素对照品溶液($0.063\,6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 10 mL,再加甲醇 25 mL,余按“2.2.2”项下自“超声处理……”开始依法制备加样供试品溶液。精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪,照下述样品测定方法测定,计算回收率。见表 1。

2.9 范围 取样品(批号 080201)分为 3 组,为取样量的 50%,为正常取样,为取样量的 2 倍,每组分别称取 6 份,共计 18 份,按照下述含量测定方法测定延胡索乙素含量,结果 3 组测得的平均含量分别为 0.16, 0.18, 0.18 mg·mL⁻¹; RSD 分别为 0.57%, 2.05%, 2.92%。

表 1 无胡止痛口服液加样回收试验结果 (n=6)

No.	原含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.800	0.636	1.455	102.99		
2	0.800	0.636	1.450	102.20		
3	0.800	0.636	1.425	98.27	101.28	2.05
4	0.800	0.636	1.430	99.06		
5	0.800	0.636	1.455	102.99		
6	0.800	0.636	1.450	102.20		

2.10 样品测定 取本品 10 批, 分别制备供试品溶液, 精密吸取对照品溶液与各供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪测定, 外标法定量, 结果见表 2。

表 2 无胡止痛口服液测定结果

No.	批号	质量浓度 /mg·mL ⁻¹	No.	批号	质量浓度 /mg·mL ⁻¹
1	080101	0.181	6	080801	0.176
2	080201	0.178	7	080802	0.181
3	080301	0.178	8	080803	0.171
4	080401	0.179	9	080901	0.175
5	080501	0.159	10	080902	0.176

3 讨论

3.1 测定波长选择 从图 1 的光谱图可知, 延胡索乙素的^[1]最大吸收峰为 280 nm 处。参照中国药典 2005 年版中延胡索药材的含量测定, 仍选择为 280 nm 作为本品的测定波长。

3.2 供试品制备方法选择 分别以甲醇-浓氨水 (20 1) 甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇、水进行

了考察, 结果表明甲醇溶剂提取效率高, 且有较好的除杂功能, 因此选用甲醇为提取溶剂。

3.3 流动相选择 本试验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 值至 6.0) (40 60) 等, 结果表明后者分离效果较好。

3.4 对含量低限的限定 根据对 10 批样品的测定结果, 并参照延胡索药材中延胡索乙素的含量低限 (去除水分的影响)、制剂处方中延胡索的比重以及制备工艺中成分的转移率, 最终确定本品含量限度定为“每 1 mL 含延胡索乙素 (C₂₁H₂₅NO₄) 不得少于 80 μ g”。

3.5 为了建立一种准确、可行且具备普遍适用性和规范性的元胡止痛口服液中延胡索乙素的含量测定方法, 本文进行了较为全面的实验研究, 并依据《中国药典》2005 版一部附录 A 《中药质量标准分析方法验证指导原则》^[1]进行了较为细致的^[1]方法学的验证, 证明该法准确可靠, 可作为该制剂中延胡索乙素的质控方法。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 362.
- [2] 邹节明, 张家铨. 中成药的药理与应用[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2003: 365.
- [3] 匡海学. 中药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 345.

[责任编辑 仝燕]