

HPLC 法测定延胡索止痛滴丸中延胡索乙素

杨书良, 田 凤, 孙 婷

(哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

延胡索止痛滴丸是以延胡索为原料经提取加工制备而成的滴丸剂型, 具有活血、利气、止痛的功能, 用于胸胁、脘腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻、跌打肿痛。方中延胡索的有效成分延胡索乙素具有较强的镇痛作用。本实验采用 HPLC 法测定延胡索止痛滴丸中延胡索乙素, 作为质量控制的指标, 结果表明方法操作简单、准确、重现性好。

1 仪器与材料

美国戴安高效液相色谱仪, UVD340U 二极管阵列检测器, ASI-100 自动进样器, AL 系列溶剂过滤器, PeakNet 色谱工作站; CP224S 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 延胡索乙素对照品(中国药品生物制品检定所); 延胡索止痛滴丸(自制); 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为美国迪马公司 ODS C_{18} (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-磷酸盐缓冲溶液(78:22); 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 282 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。理论塔板数按延胡索乙素峰计算应不低于 3 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备: 取延胡索止痛滴丸 20 丸, 精密称定, 研细, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL, 精密称定, 超声波处理 2 h, 精密称定, 补足甲醇超声前质量, 静置, 取上清液, 用微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备: 取延胡索乙素对照品 3 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 以甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备: 将除去延胡索之外的基质按滴丸制备工艺制成阴性对照, 按供试品溶液的制备方法制成不含延胡索的阴性对照溶液。

2.3 线性关系的考察: 精密吸取 0.3 mg/mL 延胡索乙素对照品溶液 2、4、6、8、10 μ L, 分别注入高效液相色谱仪中, 测定其峰面积积分值。以质量浓度(C)为横坐标, 相应峰面积积分值(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $A = 31.501 C - 4.937$,

$r = 0.9999$ 。结果表明, 延胡索乙素在 0.6~3 μ g 与峰面积有良好的线性关系。

2.4 空白试验: 对照品溶液、供试品溶液和取阴性对照溶液 5 μ L, 注入色谱仪。结果图谱中在与延胡索乙素色谱峰保留时间一致的位置上无色谱峰。见图 1。

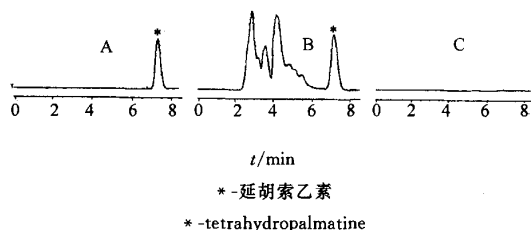


图 1 延胡索乙素对照品(A)、延胡索止痛滴丸(B)和阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of tetrahydropalmatine reference substance (A), Yanhusuo Zhitong Dropping Pills (B), and negative sample (C)

2.5 精密度试验: 精密吸取同一供试品溶液 5 μ L, 连续进样 6 次, 进行测定, 结果延胡索乙素质量分数的 RSD 为 0.89%。

2.6 稳定性试验: 取同一供试品溶液 12 h 内每隔 2 h 测定一次, 测得延胡索乙素质量分数的 RSD 为 0.75%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 取同一批(批号 050420)延胡索止痛滴丸样品 6 份, 每份 20 丸, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算延胡索止痛滴丸中延胡索乙素的质量分数。结果延胡索乙素的平均质量分数为 0.078 mg/丸, RSD 为 0.15%。

2.8 加样回收率试验: 取含延胡索乙素 0.078 mg/丸的延胡索止痛滴丸 10 丸, 精密加入约 0.8 mg 延胡索乙素对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果平均回收率为 99.2%, RSD 为 0.44% ($n=6$)。

2.9 样品测定: 分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 5 μ L, 注入液相色谱仪, 测定峰面积积分值, 按外标法计算, 结果见表 1。根据测定结果, 暂定延胡索止痛滴丸中延胡索乙素的质量分数不低于 0.07 mg/丸。

表 1 延胡索止痛滴丸中延胡索乙素的测定结果 ($n=3$)Table 1 Determination of tetrahydropalmatine in Yanhusuo Zhitong Dropping Pills ($n=3$)

批 号	延胡索乙素/ (mg · 丸 ⁻¹)	批 号	延胡索乙素/ (mg · 丸 ⁻¹)
050421	0.078	050426	0.074
050422	0.077	050427	0.076
050423	0.074	050428	0.075
050424	0.076	050429	0.079
050425	0.073	050430	0.078

3 讨论

3.1 样品提取方法的考察:分别考察了 60% 甲醇浸泡 24 h、60% 甲醇超声提取 15 min、氨水碱化后甲醇超声提取 15 min, 甲醇超声 0.5、1、2 h, 结果以甲醇超声 2 h 提取最完全。

3.2 流动相的选择:曾选用乙腈-KH₂PO₄、甲醇-三乙胺、甲醇-不同 pH 值磷酸盐缓冲溶液等作为流动相, 但均未达到理想的分离效果, 本实验采用的流动相取得了良好的分离效果。

RP-HPLC 法测定延胡索及其制剂元胡止痛片中延胡索乙素

李惠芬, 刘 芳, 朱丽丽

(天津医科大学药学院, 天津 300070)

延胡索是罂粟科紫堇属延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的块茎, 含有多种生物碱成分, 其中延胡索乙素(四氢巴马汀)是其生物碱中的代表性成分。延胡索乙素具有镇痛、镇静、麻醉、降压、促肾上腺分泌、抗菌、抗溃疡的功效, 广泛应用于临床。以延胡索、白芷为主要原料的元胡止痛片, 具有理气、活血、止痛等功效, 主要用于气滞血瘀的胃痛、肋痛、头痛及痛经等。本实验建立了高效液相色谱测定延胡索乙素, 为该药质量标准提供了参考。

1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相系统, 2487 双波长紫外检测器, 515 双泵, 柱温箱, Millennium³² 色谱管理系统; 日本岛津 UV-240 型紫外-可见分光光度计; AS5150 超声波清洗器。延胡索乙素(中国药品生物制品检定所, 批号 0726-200407); 元胡止痛片(天津同仁堂股份有限公司); 延胡索(天津中药饮片厂, 经天津中医学院第一附属医院尚英合主任药师鉴定); 缺延胡索元胡止痛片阴性样品(实验室自制); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为双蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Prodigy ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温为 40 °C, 流动相为乙腈-0.05% 磷酸 (45 : 55, 三乙胺调 pH 8.6), 测定波长为 280 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取经减压干燥的

延胡索乙素对照品 10.0 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.2 药材供试品溶液的制备: 取已干燥的延胡索适量, 粉碎过 50 目筛, 精密称取 4.000 g 置于 100 mL 碘量瓶, 加甲醇 50 mL, 放置过夜, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 0.1% 稀盐酸 10 mL 溶解, 用浓氨水调 pH 9~10, 用乙醚萃取 3 次, 每次 10 mL, 至水层检识反应为阴性, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 作为药材供试品溶液。

2.2.3 片剂供试品溶液的制备: 取已干燥的元胡止痛片 100 片, 去包衣干燥, 研细, 精密称取粉末 4.000 g, 置 100 mL 碘量瓶后, 其他操作同 2.2.2 项。

2.2.4 阴性对照溶液的制备: 依元胡止痛片处方组成除去延胡索后, 根据样品制备工艺制备阴性对照, 同 2.2.2 项制得阴性对照溶液。

2.3 阴性干扰试验: 按上述色谱条件, 吸取阴性对照溶液、对照品溶液、片剂及药材供试品溶液各 10 μL 进样, 记录色谱图。结果药材和片剂供试品色谱图中, 与对照品色谱峰相应位置上各有一相同保留时间的色谱峰, 而阴性对照溶液在此保留峰位无干扰峰。见图 1。

2.4 标准曲线及线性范围: 上述色谱条件下, 分别精密吸取延胡索乙素对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL 进样, 得回归方程为 $Y = 8.97 \times 10^5 X + 9.68 \times 10^4$, $r = 0.9999$ 。表明延胡索乙素在 0.776~7.760