

- [3] Yang C J, Li D X, Wan X C. Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods: An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 861(1): 140-144
- [4] 张亚梅, 张小娟, 简晖, 等. 大孔吸附树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1226-1229
- [5] 邢建国, 翟科峰, 何承辉, 等. 大孔吸附树脂纯化天山雪莲中有效成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1062-1066
- [6] Borse B B, Rao L J M, Nagalakshmi S, et al. Fingerprint of black teas from India: identification of the region-specific characteristics [J]. *Food Chem*, 2002, 79(4): 419-424
- [7] Yao L H, Jiang Y M, Caffin N, et al. Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets [J]. *Food Chem*, 2006, 96(4): 614-620
- [8] 杨鹏波, 张晓燕, 丛威, 等. 大孔吸附树脂吸附乳酸及乳酸与谷氨酸的分离 [J]. 过程工程学报, 2007, 7(4): 767-772
- [9] 王琨, 金志华, 林建平, 等. 大孔吸附树脂分离提取多杀菌素 [J]. 离子交换与吸附, 2005, 21(5): 444-451
- [10] 李洁莹, 陈金龙, 费正皓, 等. 大孔吸附树脂对邻甲酚的吸附行为研究 [J]. 离子交换与吸附, 2004, 20(5): 430-437

HPLC 法测定伤痛宁胶囊中延胡索乙素

闫小青¹, 董林毅^{2*}

(1 天津市天津医院, 天津 300180; 2 天津大学, 天津 300072)

摘要: 目的 建立用高效液相色谱法测定伤痛宁胶囊中延胡索乙素的方法。方法 采用高效液相色谱法。Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-水-三乙胺 (65: 35: 0.5) 为流动相; 检测波长为 280 nm; 体积流量为 0.80 mL/min; 柱温为室温; 进样量为 20 μL。结果 延胡索乙素在 0.250~8.000 μg/mL 线性良好, 平均回收率为 100.24%, RSD 为 2.43%。结论 本方法操作简便, 准确, 灵敏, 为伤痛宁胶囊的质量控制建立了方法。

关键词: 伤痛宁胶囊; 延胡索乙素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1109-02

伤痛宁胶囊由延胡索(醋制)、白芷、乳香(制)、没药(制)、山柰、细辛、香附(制)、甘松 8 味中药精制而成, 主要用于各种急慢性软组织损伤所致的疼痛、肿胀、功能障碍; 因闪腰挫伤或陈伤所致的局部疼痛、关节痛、腰腿痛、肩背痛等; 对骨折患者可促进骨痂生长, 缩短骨折愈合时间; 对因气滞血瘀所致的胸痛、脉管炎、乳腺炎、痔疮等有疗效。为了完善其质量控制方法, 笔者选取了延胡索乙素作为质量控制对象之一进行研究。有关延胡索乙素的测定方法主要有高效液相色谱法、紫外分光光度法、薄层扫描法、高效毛细管电泳法^[1-5]。本实验采用高效液相色谱法测定伤痛宁胶囊中延胡索乙素, 方法学考察结果表明, 该方法简便、准确、重现性好。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(美国科美特科学仪器公司, 包括 LDI-6000 色谱输液泵, PVW I-6000 紫外检测器, ANSTAR 色谱工作站); PB153 I-S 型电子分析天平(梅特勒-托利多公司); Milipore I-Q 超纯水装置(美国密理博公司); MSE 台式高速离心机(三洋电器公司); HU I-10260B 超声波清洗器(天津市恒奥科技发展有限公司); YKH I-1 型液体快速混合器(江西医疗器械厂)。

延胡索乙素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 07269605); 伤痛宁胶囊(长沙市恒石医药科技有限公司, 批号分别为 091022、090908、090810); 延胡索(醋制)、白芷、乳香(制)、没药(制)、山柰、细辛、香附(制)、甘松药材由天津市天津医院提供; 甲醇为色谱纯(天津市协和吴鹏色谱科技有限公司提供, 批号 090812); 三乙胺为分析纯, 其他试剂均为分析纯, 实验室用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-水-三乙胺 (65: 35: 0.5) 为流动相; 检测波长 280 nm; 体积流量 0.80 mL/min; 柱温室温; 进样量 20 μL。理论塔板数不低于 5 000。在上述条件下伤痛宁胶囊中延胡索乙素与其他组分达到基线分离, 与相邻的杂质峰分离度大于 2.5。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取延胡索乙素对照品 2 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 振荡, 摇匀, 即得对照品储备液(质量浓度为 80 μg/mL), 冰箱保存, 临用时用甲醇稀释。

2.3 供试品溶液的制备: 取伤痛宁胶囊 10 粒分别精密称定质量后, 将胶囊中药物取出混匀, 精密称取相当 4 粒胶囊所含药物, 置于 100 mL 量瓶中, 加适

* 收稿日期: 2009-12-23

作者简介: 闫小青, 主管药师, 从事专业: 药物分析。

* 通讯作者 董林毅 Tel: 13682164749 E-mail: dongwl119@163.com

量甲醇溶剂, 超声提取 30 min, 放置室温用甲醇定容, 摇匀, 即得, 冰箱保存。临用时用微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液 4 mL, 加入 3 mL 乙醚, 旋涡混匀后, 用离心机 (4 000 r/min) 离心后, 去除上层乙醚液, 目的是去除脂溶性杂质。用 NaOH 试液调 pH 值至 10。用乙醚萃取 3 次, 每次 3 mL, 合并 3 次萃取液。将乙醚液挥干, 残渣用 1 mL 流动相复溶, 旋涡混匀后, 用高速离心机 (12 000 r/min) 离心后, 取上清液, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备: 取除去延胡索以外的其他中药饮片, 在研钵中将其研成粗粉后, 放入烧杯中, 加适量甲醇溶剂, 超声提取 30 min, 然后用微孔滤膜滤过, 取适量滤液吹干, 用流动相复溶, 旋涡混匀后, 用高速离心机 (12 000 r/min) 离心后, 取上清液, 即得。

2.5 标准曲线制备: 精密量取延胡索乙素对照品储备液 0.075、0.15、0.30、0.60、1.20、1.80、2.40 mL, 置于 7 个 25 mL 量瓶中, 用流动相制成质量浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液, 摇匀, 在选定的色谱条件下分别进样 6 次测定, 记录各色谱峰面积。以峰面积的均值为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 30\,708 X - 1\,459.4$, $r = 0.999\,9$ 。表明延胡索乙素在 0.25~8.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.6 专属性试验: 取延胡索乙素对照品、伤痛宁胶囊供试品和阴性样品, 制备溶液, 进样, 结果在确定上述色谱条件后, 经阴性对照试验, 结果阴性对照无干扰, 证明此色谱条件可行。见图 1。

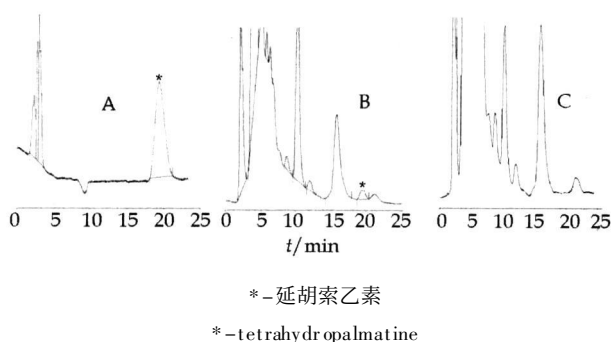


图 1 对照品(A)、伤痛宁胶囊(B)和阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A), Shangtongning Capsula (B), and negative sample (C)

2.7 精密度试验: 取 1 $\mu\text{g/mL}$ 延胡索乙素对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD, 结果 RSD 为 1.82%。

2.8 稳定性试验: 取批号 091022 的伤痛宁胶囊样品, 制备供试品溶液, 分别于 1、2、4、6、8、10 h 进样测定, 记录延胡索乙素峰面积, 计算得 RSD 为 2.70%。

2.9 重现性试验: 取批号 091022 伤痛宁胶囊样品 6 份, 制备供试品液, 进样测定, 计算延胡索乙素的质量分数, 结果其 RSD 为 2.70%。

2.10 加样回收率试验: 精密量取已测知延胡索乙素质量浓度的伤痛宁胶囊供试品溶液 4 mL, 分别加入 80%、100%、120% 的延胡索乙素对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 100.24%, RSD 为 2.43%。

2.11 样品测定: 3 批伤痛宁胶囊 (批号分别为 091022、090908、090810), 每批取样 3 份, 分别制备供试品溶液, 进样 20 μL , 测定延胡索乙素的峰面积, 计算其质量分数, 结果延胡索乙素的平均质量分数分别为 0.49、0.51、0.50 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

对延胡索乙素的 HPLC 测定的相关文献报道有多种流动相, 如甲醇-不同 pH 值磷酸盐缓冲溶液、甲醇-三乙胺、甲醇-水。实验中考察了甲醇-水 (45:55)、0.01 mol/L 磷酸二氢钾水溶液-甲醇 (30:70)、(35:45)、(45:55)、(50:50), 最终选定甲醇-水-三乙胺 (65:35:0.5)。在本流动相条件下, 延胡索能与其他成分得到很好分离, 出峰时间在 20 min 左右, 峰形也很好。

对延胡索乙素的对照品溶液在 200~350 nm 进行扫描, 结果在 281.9 nm 处有最大吸收峰, 故确定采用 280 nm 作为检测波长。

本品为中药复方制剂, 药物成分复杂, 而且延胡索含有多种生物碱。为了排除干扰, 并降低提取过程中的药物损耗, 对药物提取的次数、时间、溶剂以及溶剂的用量进行了考察。结果采用乙醚对药物进行萃取, 除去一些杂质, 然后在碱性条件下, 再用乙醚提取药物 3 次。这种处理方法较用乙醇、甲醇、乙腈等溶剂提取完全, 延胡索乙素损耗较少, 图谱清晰, 而且阴性试验无干扰。

参考文献:

- [1] 李胜迎, 董红, 闫卫东, 等. RP-HPLC 测定排石颗粒中延胡索乙素的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(12): 1875-1877.
- [2] 韩建伟, 张莉, 高小春. HPLC 测定复方元胡止痛贴中延胡索乙素含量[J]. 中国药师, 2009, 12(5): 621-623.
- [3] 朱文英, 贺敬竹, 孙晨. HPLC 法测定胃益胶囊中盐酸小檗碱与延胡索乙素的含量[J]. 药学与临床杂志, 2009, 17(2): 155-157.
- [4] 申强, 陈燕忠, 吕竹芬, 等. 高效液相色谱法测定祛痹舒肩丸中延胡索乙素含量[J]. 中国药业, 2009, 18(9): 21-22.
- [5] 雷世庸, 张荣发. 延胡索乙素的提取及含量测定方法研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(16): 83-84.