

HPLC 同时测定痛宁凝胶中延胡索乙素 和原阿片碱的含量

王伟^{1,2,3}, 尚强^{1,2,3}, 杨璐^{1,2,3}, 毕宇安^{1,2,3}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001; 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001; 3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001;)

[摘要] 目的: 建立痛宁凝胶中延胡索乙素和原阿片碱的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-磷酸盐溶液为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 原阿片碱在 0.100 6 ~ 5.03 μg 呈良好的线性关系($r = 1.0$), 平均回收率为 99.14%, RSD 1.34% ($n = 6$); 延胡索乙素在 0.100 8 ~ 5.04 μg 呈良好的线性关系, $r = 1.0$, 平均回收率为 101.1%, RSD 1.18% ($n = 6$)。结论: 方法操作简便、可靠, 重现性好, 专属性强, 能有效控制该制剂的质量。

[关键词] 痛宁凝胶; 延胡索乙素; 原阿片碱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0093-03

HPLC Determination of Protopine and Tetrahydropalmatine in Tongning Gel

WANG Wei^{1,2,3}, SHANG Qiang^{1,2,3}, YANG Lu^{1,2,3}, BI Yu-an^{1,2,3}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;

3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of protopine and tetrahydropalmatine in Tongning Gel. **Method:** The liquid chromatography was carried out using Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with detection wave length at 280 nm, acetonitrile-phosphate buffer as mobile phase, gradient elution. The column temperature was at 30 °C and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The calibration curve of protopine was linear in the range of 0.100 6-5.03 μg ($r = 1$), and the recovery was 99.14% (RSD 1.34%). The calibration curve of tetrahydropalmatine was linear in the range of 0.100 8-5.04 μg ($r = 1$), and the recovery was 101.1% (RSD 1.18%). **Conclusion:** This method is simple, accurate, reliable and reproducible, which can be used for quality control of Tongning Gel.

[Key words] Tongning Gel; protopine; tetrahydropalmatine; HPLC

痛宁凝胶是江苏康缘药业股份有限公司自主研发的新药, 由延胡索、川芎、威灵仙等多味中药

组成, 具有活血理气止痛, 祛风通络除湿的功能, 临床上主要用于治疗膝关节骨止痛之功效。生物碱类成分是其作用的主要物质基础^[1-2], 其中以延胡索乙素镇痛作用最强, 对持续性、慢性钝痛有极佳镇痛效果^[3]。另有文献报道原阿片碱具有镇痛、解痉、改善微血管循环、抗血小板聚集、扩血管等作用^[4-5], 故选择延胡索乙素和原阿片碱作为控制本品质量的指标

[收稿日期] 2010-09-26

[基金项目] 国家科技部重大新药创制项目(2009ZX09313-032)

[第一作者] 王伟, 研究员, 从事药品质量标准研究工作, E-mail: chenfenglong1111@yahoo.com.cn

成分[6-7]。参照文献资料,本试验采用高效液相色谱法建立了同时测定痛宁凝胶中 2 种主要生物碱成分原阿片碱和延胡索乙素的定量分析方法,以更好地控制该制剂的质量。通过方法学验证,本方稳定性好,专属性强,可以作为痛宁凝胶的质控方法之一。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪;Waters 2487 紫外检测器,AE-240 电子分析天平(瑞士 Mettler),延胡索乙素对照品(批号 0726-200208,中国药品生物制品检定所),原阿片碱对照品(批号 110853-200201,中国药品生物制品检定所),乙腈(色谱纯,上海星可生化有限公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相以磷酸盐缓冲液(取磷酸氢二钠 1.0 g,磷酸二氢钠 4.0 g,加水使溶解成 1 000 mL)为流动相 A,以乙腈为流动相 B,梯度洗脱程序为 0 ~ 10 min,30% B;10 ~ 30 min,30% ~ 35% B;30 ~ 35 min,35% ~ 40% B;35 ~ 40 min,40% ~ 90% B,检测波长 280 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取减压干燥 24 h 的原阿片碱对照品 10.06 mg,延胡索乙素对照品 10.08 mg 于 20 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 含原阿片碱 503.0 μg、延胡索乙素 504.0 μg 的混合对照品储备溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取痛宁凝胶约 2 g,精密称定,置烧杯中,加 1% 氢氧化钠溶液 30 mL,置磁力搅拌器上搅拌使分散均匀,转移至分液漏斗中,加乙醚振摇提取 3 次,每次 30 mL,合并乙醚提取液,用水洗涤至中性,弃去水液,减压回收乙醚至干,残渣加甲醇溶解,转移并定容于 5 mL 量瓶中,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备 按处方比例和制备工艺制备缺延胡索的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性供试品溶液。

2.3 方法专属性 分别吸取上述 3 种溶液各 20 μL 进样,按上述色谱条件进行检测,可见阴性供试品溶液在原阿片碱及延胡索乙素位置处无干扰,结果见图 1。

2.4 线性关系 分别精密量取上述混合对照品溶液 0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,5.0 mL,置 10 mL 量瓶中,

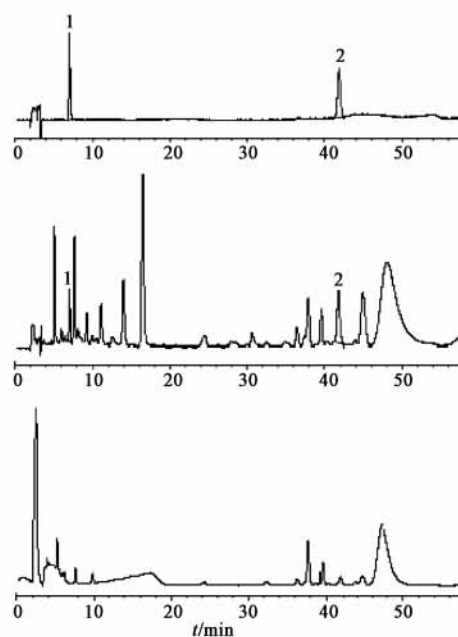


图 1 对照品(A)、样品(B)和阴性样品(C)高效液相色谱
1. 原阿片碱;2. 延胡索乙素

加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀。按上述色谱条件,分别进样 20 μL,测定峰面积。以进样量(μg)为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得原阿片碱回归方程为 $Y = 8.77 \times 10^5 X - 6.48 \times 10^3$, $r = 1.0$,延胡索乙素回归方程为 $Y = 8.64 \times 10^5 X - 4.18 \times 10^3$, $r = 1.0$,表明原阿片碱在 0.100 6 ~ 5.03 μg 具有良好的线性关系,延胡索乙素在 0.100 8 ~ 5.04 μg 具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 吸取原阿片碱与延胡索乙素的混合对照品溶液 20 μL,重复测定 6 次,原阿片碱与延胡索乙素峰面积的 RSD 分别为 0.66%,0.94%。

2.6 稳定性试验 吸取同一供试品溶液 20 μL,分别于 0,2,4,8,12,18 h 进样,测定峰面积,原阿片碱和延胡索乙素峰面积的 RSD 分别为 2.25%,1.50%,表明供试品溶液在 18 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份,按供试品溶液制备方法操作,按上述色谱条件测定,计算原阿片碱和延胡索乙素平均质量分数分别为 0.024,0.046 mg·g⁻¹,RSD 分别为 1.2%,0.9%。表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同批样品约 1.0 g,分别加入混合对照品溶液(原阿片碱 0.024 2 g·L⁻¹,延胡索乙素 0.046 5 g·L⁻¹)各 1.0 mL,按供试品溶液制备方法制备后,HPLC 测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表 1。

表1 回收率试验

组分	样品取样量 /g	样品含量 /μg	对照品加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
原阿片碱	0.991 8	23.80	24.20	47.55	98.14	99.14	1.34
	0.999 2	23.98	24.20	48.52	101.4		
	1.012 5	24.30	24.20	48.25	98.97		
	1.002 6	24.06	24.20	47.98	98.84		
	1.023 1	24.55	24.20	48.19	97.69		
延胡索乙素	1.015 6	24.37	24.20	48.53	99.83	101.1	1.18
	0.991 8	45.62	46.50	92.91	101.7		
	0.999 2	45.96	46.50	92.60	100.3		
	1.012 5	46.58	46.50	93.93	101.8		
	1.002 6	46.12	46.50	93.77	102.5		
	1.023 1	47.06	46.50	94.09	101.1		
	1.015 6	46.72	46.50	92.85	99.20		

2.9 样品的含量测定 取样品3批,按照供试品溶液制备方法操作后,HPLC测定,结果见表2。

表2 痛宁凝胶中含量测定 mg·g⁻¹

批号	原阿片碱	延胡索乙素
100401	0.025	0.045
100501	0.024	0.044
100601	0.024	0.046

3 讨论

3.1 流动相的选择 本试验采用HPLC法测定延胡索乙素的含量,由于该制剂有多味中药组成,成分复杂,使用药典^[8]方法难以将两成分分离完全,在制剂原质量标准的基础上进行了改进,原阿片碱与延胡索乙素的分离度均符合要求。

3.2 提取溶剂的选择 用甲醇做溶剂超声提取,所提取成分复杂,而且延胡索乙素与原阿片碱的色谱峰难以得到体现,另外考虑到凝胶基质卡波姆容易损伤色谱柱,应予以去除,所以采用碱水分散乙醚萃取的方法制备供试品溶液。

3.3 乙醚用量的考察 分别精密称取样品3份,1%氢氧化钠溶液分散完全后,分别用乙醚萃取3,4,5次,合并乙醚萃取液用水洗至中性蒸干后,用甲醇分别定容至5 mL,进行检测,结果表明萃取3次

样品中两成分已提取完全。

[参考文献]

- [1] 金国章,胥杉. 延胡索的药理研究 I. 延胡索甲、乙和丑素和癸素的镇痛作用[J]. 生理学报,1957,21(2):150.
- [2] 唐希灿,金国章,胥杉. 延胡索的药理研究 IX. 延胡索丑素和癸素的中枢神经系统作用[J]. 生理学报,1962,25(2):143.
- [3] 吕清文,丛雅勤. 延胡索药理作用及临床应用浅议[J]. 内蒙古中医药,2005,26(1):26.
- [4] 李良国. 原阿片碱对抗血小板聚集作用[J]. 国外医药·植物药分册,1992,(2):417.
- [5] 余丽梅,黄燮南,孙安盛,等. 原阿片碱对兔胸主动脉的松弛作用[J]. 遵义医学院学报,1999,22(3):5.
- [6] 刘泓,杨亚莉,范斌. 高效液相色谱法测定延胡索药材中原阿片碱及延胡索乙素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(7):9.
- [7] 马宏达,郭涛,颜鸣. HPLC法测定夏天无中原阿片碱、延胡索乙素和巴马亭[J]. 解放军药学报,2009,25(3):208.
- [8] 中国药典.一部[S]. 2010:130.

[责任编辑 蔡仲德]