

HPLC 法同时测定元胡止痛分散片中延胡索乙素和欧前胡素的含量

章 军, 王跃生*, 李 慧, 张保献, 臧 琛, 王国华, 欧阳旭
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立简便、快速的同时测定元胡止痛分散片中延胡索乙素和欧前胡素的高效液相色谱分析方法。方法: 甲醇回流提取延胡索乙素和欧前胡素, 以 Kromasil C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 为分析柱, 以乙腈-甲醇-0.1% 磷酸水溶液(三乙胺调 pH=6.0) (41: 13: 46) 为流动相; 检测波长为 280 nm; 柱温 40 °C; 流速为 0.8 mL·min⁻¹。结果: 延胡索乙素峰和欧前胡素峰分离良好, 阴性无干扰, 方法学考察合格。结论: 该方法适用于元胡止痛分散片中延胡索乙素和欧前胡素的含量测定。

[关键词] 元胡止痛分散片; 延胡索乙素; 欧前胡素; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0010-03

Determination of dl-tetrahydropalmatine and imperatorin in Yuanhuzhitong dispersible tablet by HPLC

ZHANG Jun, WANG Yue-sheng*, LI Hui, ZHANG Bao-xian, ZANG Chen, WANG Guo-hua, OU Yang-xu
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a rapid HPLC method for determination of dl-tetrahydropalmatine and imperatorin in Yuanhuzhitong dispersible tablet. **Method:** dl-tetrahydropalmatine and imperatorin were extracted by reflux extraction method with methanol. A kromasil C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) column was used with the mobile phase of acetonitrile-methanol-0.1% phosphoric acid (pH was adjusted to 6.0 by triethylamine) (41: 13: 46) at the detection wavelength of 280 nm. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹ at the column temperature of 40 °C. **Results:** The dl-tetrahydropalmatine peak and imperatorin peak can be separated perfectly. The negative samples were not found interference in this condition. The method is accurate. **Conclusion:** The method is suitable for the determination of dl-tetrahydropalmatine and imperatorin in Yuanhuzhitong dispersible tablet.

[Key words] Yuanhuzhitong dispersible tablet; dl-tetrahydropalmatine; imperatorin; determination; HPLC

元胡止痛分散片是由延胡索和白芷两味药材组成, 具有理气、活血、止痛之功效, 用于治疗气滞血瘀的胃痛, 胁痛, 头痛和痛经等。延胡索中的有效成分延胡索乙素具有镇痛作用, 白芷中的有效成分欧前胡素具有抗菌、抗肿瘤等多种药理作用, 与药品质量

密切相关。目前测定元胡止痛方大多仅测定延胡索乙素或欧前胡素一种成分^[1-5], 不能全面地控制药品的质量”本实验在一个色谱条件下可同时测定延胡索乙素和欧前胡素两种成分, 且样品制备方法简单, 采用甲醇回流, 提取液浓缩即可。目前仅有一篇文献可在一个色谱条件下同时测定两种成分, 但样品制备方法复杂^[6]。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱系统, 二极管阵列检测器, HP ChemStation for LC 3D Rev. A. 06.03 工作站。

[收稿日期] 2009-05-31

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAI09B08-06)

[通讯作者] * 王跃生, Tel: (010) 64030267, E-mail: wylw915@163.com。

元胡止痛分散片、延胡索阴性样品、白芷阴性样品由中国中医科学院中药研究所制剂室提取制备;延胡索乙素对照品(供含量测定用,批号:0726-9906);欧前胡素对照品(供含量测定用,批号:11826-200410)均购于中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,磷酸、三乙胺为分析纯。

2 实验方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈, (5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相:乙腈-甲醇-0.1%磷酸水溶液(三乙胺调 pH=6.0)(41:13:46);检测波长:280 nm;柱温:40 °C;流速:0.8 mL·min⁻¹;进样量:10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取经五氧化二磷减压干燥 36 h 的延胡索乙素和欧前胡素对照品适量,精密称定,置量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含延胡索乙素 0.04 mg;欧前胡素 0.05 mg 的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取 10 片供试品,研匀,取粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定重量,水浴回流 1 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,滤过,精密量取续滤液 40 mL,挥干,用甲醇溶解残渣,转移至 5 mL 量瓶中,定容,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按制剂处方组成分别除去白芷和延胡索后,制成白芷阴性样品和延胡索阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.5 干扰试验 吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL 进样,记录色谱图。结果与供试品溶液色谱图比较,阴性对照溶液在延胡索乙素、欧前胡素色谱峰相应位置无干扰峰。见图 1。

2.6 线性关系考察 精密称取经五氧化二磷减压干燥 36 h 的延胡索乙素对照品 4.26 mg 和欧前胡素对照品 5.06 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含 0.085 2 mg 延胡索乙素和 0.101 2 mg 欧前胡素的混合对照品溶液,精密量取该溶液 2, 4, 6, 8, 10 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀。按上述色谱条件依序进样测定,进样量 10 μL。以对照品进样量(μg)为横坐标,色谱峰面积积分值(A)为纵坐标,绘制标准曲线,建立回归方程:Y=852.3 X - 3.330, r=0.999 9。表明延胡索乙素在(0.17~0.85) μg 范围内与色谱峰面积有良好的线性关系;Y=

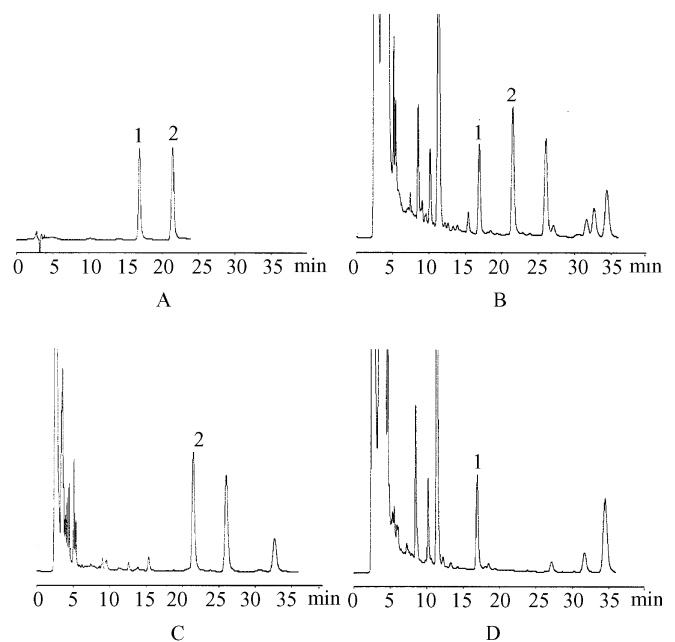


图 1 对照品(A)、元胡止痛分散片(B)、
延胡索阴性对照(C)、白芷阴性对照(D)的 HPLC 图谱
1 延胡索乙素; 2 欧前胡素

1 511X - 8.987, r=0.999 9。表明欧前胡素在(0.20~1.0) μg 范围内与色谱峰面积有良好的线性关系。

2.7 精密度试验 取供试品溶液连续进样 5 次,计算延胡索乙素峰面积的 RSD 为 1.3%;欧前胡素峰面积的 RSD 为 1.0%,表明精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一批次元胡止痛分散片,按照 2.3 项下方法平行制备供试品溶液 5 份,测定延胡索乙素和欧前胡素含量。结果延胡索乙素平均含量为 0.040 8%, RSD 为 2.5%;欧前胡素平均含量为 0.037 6%, RSD 为 0.91%,表明重复性良好。

2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样(8 h 进样后置冰箱冷藏保存,进样前放至室温),测得延胡索乙素和欧前胡素峰面积的 RSD 分别为 2.0% 和 1.7%。结果表明供试品溶液至少稳定 24 h。

2.10 加样回收率试验 取同一批次已知含量的元胡止痛分散片约 0.25 g,精密称定,准确加入一定量的延胡索乙素和欧前胡素对照品,按上述供试品溶液制备方法和色谱条件进行测定并计算回收率,结果见表 1、表 2。

2.11 含量测定 精密称取 3 批元胡止痛分散片,按照 2.3 项下方法制成供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液 5 μL 与供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,测定,按外标一点法,计算延胡索乙素和欧前胡素含量,结果见表 3。

表 1 元胡止痛分散片中延胡索乙素加样回收率试验结果

样品	称样量 (g)	样品中 含量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	0.254 87	0.104 0		0.192 7	104.1		
2	0.2558 2	0.104 4		0.190 3	100.8		
3	0.252 67	0.103 1	0.085 2	0.187 4	98.9	100.1	2.5
4	0.253 02	0.103 2		0.186 8	98.1		
5	0.258 24	0.105 4		0.189 4	98.6		

表 2 元胡止痛分散片中欧前胡素加样回收率试验结果

样品	称样量 (g)	样品中 含量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	0.254 87	0.095 8		0.201 5	97.9		
2	0.255 82	0.096 2		0.202 8	98.7		
3	0.252 67	0.095 0	0.108	0.203 6	100.6	100.5	2.3
4	0.253 02	0.095 1		0.204 5	101.3		
5	0.258 24	0.097 1		0.209 3	103.9		

表 3 元胡止痛分散片中延胡索乙素和欧前胡素含量

批号	延胡索乙素含量(mg/片)	欧前胡素含量(mg/片)
080919	0.198	0.184
080922	0.184	0.174
080925	0.187	0.175

3 讨论

3.1 分离条件的选择 本试验考察了 Diamonsil、Kromasil Zorbax 3 种类型色谱柱, 均为反相 C₁₈ 填料; 5 μm; 4.6 mm × 250 mm, 结果使用 Kromasil 色谱柱可使延胡索乙素和欧前胡素色谱峰具有良好的对称性。理论塔板数较大, 故选用。又考察了各种流动相系统, 如: 甲醇-水系统; 甲醇-酸水溶液系统; 甲醇-缓冲盐溶液系统等, 最后采用乙腈-甲醇-0.1% 磷酸溶液(三乙胺调 pH= 6.0) 系统时, 分离良好。

3.2 供试品溶液制备方法的选择 参考 2005 版药典^[7] 延胡索中延胡索乙素采用浓氨-甲醇(1:20) 回流提取; 白芷中欧前胡素采用甲醇超声提取, 因此考察了甲醇和浓氨-甲醇(1:20) 两种提取溶剂; 超声和回流两种提取方法, 结果显示, 采用甲醇回流提取时, 两成分含量均达到最高。再对提取时间和溶剂用量进行了考察, 最终确定了 2.3 项下的提取方法。

本试验在同一色谱条件下, 同时检测元胡止痛分散片中延胡索乙素和欧前胡素两种不同类型的成分, 经系统适应性试验和方法学考察, 证明本条件分离度好, 阴性无干扰, 达到定量要求。文献[6] 报导的制备方法复杂, 为酸水提取, 乙醚萃取 3 次, 母液加入氨水, 再用乙醚萃取 3 次, 极为繁琐。本实验供试品制备方法采用甲醇回流提取液浓缩, 即可。可节省时间, 简化操作, 并提高精度。

[参考文献]

- [1] 汪玲, 程贝, 罗兰, 等. 元胡止痛分散片中延胡索乙素的含量测定[J]. 医药导报, 2009, 28(01): 114-115.
- [2] 朱才庆, 吴迪, 李艳, 等. 高效液相色谱法测定复方元胡止痛胶囊中延胡索乙素的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(07): 1727-1729.
- [3] 卢红文, 秦昉, 徐佳. 液相色谱/质谱联用测定元胡止痛软胶囊中延胡索乙素的含量[J]. 中国药师, 2007, 10(12): 1199-1201.
- [4] 王洪志, 李惠芬, 周静, 等. HPLC 法测定元胡止痛片中欧前胡素和异欧前胡素[J]. 中草药, 2007, 38(07): 1018-1019.
- [5] 韩建伟, 李琼娅, 魏元锋, 等. 高效液相色谱法测定元胡止痛贴中延胡索乙素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(06): 822-823.
- [6] 朱央央, 余伯阳. RP-HPLC 测定元胡止痛方中延胡索乙素和欧前胡素的含量[J]. 中成药, 2004, 26(06): 455-458.
- [7] 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: 97, 79.