反向高效液相色谱法测定天麻胶囊中天麻素的含量

王小龙*, 李华丽

(河南省平顶山市药品检验所, 河南 平顶山 467000)

[摘要] **目的**: 建立天麻胶囊中天麻素的含量测定的方法。**方法**: 采用反向高效液相色谱(RP-HPLC) Kromasil ODS-C_{18} (4.6mm × 200mm) 柱, 流动相: 乙腈-0.2% 磷酸水溶液(3∶97) 检测波长 220nm。**结果**: 天麻素的线性范围在 0.0092μg~ 0.046μg, r = 0.9995, 平均回收率: 98.8%, RSD 为 0.6%。**结论**: 该法灵敏、准确可用于控制天麻胶囊的质量。

[关键词] 天麻胶囊; 天麻素; 含量测定; 反向高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)04-0014-02

天麻胶囊是由天麻、杜仲、羌活、当归、玄参等 10 味中药组成, 具有祛风除湿、舒筋活络、活血止痛功效。临床常用于治疗肢体拘挛、手足麻木、腰腿酸痛, 收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第三册。天麻为天麻胶囊中主要有效成份之一, 天麻具有平肝息风、止痉, 用于肢体麻木等。查阅相关资料[1] 可知, 天麻素又为天麻主要指标性成份。标准中未收载该制剂的含量测定, 只有定性检验, 而定性检验在前处理中天麻素易损失, 斑点不清晰, 结果不宜判断。为了有效控制其产品质量, 本实验采用 RP-HPLC 法测定了该制剂中主要有效成份天麻素的含量, 为完善天麻胶囊的质量标准提供了科学依据。

1 仪器与试药

SSI PC2000 高效液相色谱仪, SSI Model 500 紫外检测器, ANASTAR 色谱工作站, SSI OV-100C 柱温箱, 20μL 进样阀。天麻素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0807-9903); 天麻胶囊为市售(三个厂家 A、B、C 三个批号 030103, 030401, 030909) 乙腈为色谱纯、水为纯化水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil ODS-C_{18} (4.6mm × 200mm 5μm); 流动相: 乙腈-0.2% 磷酸水溶液(3∶97), 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 220nm; 进样量: 20μL; 柱温: 25 ℃; 保留时间: 9.2min。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取天麻素对照品 4.6mg, 加甲醇定容至 100mL, 精密量取 5mL, 置 10mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 制成每 1mL 含天麻素 0.023mg 的溶液即得。

2.3 供试品溶液的制备 取天麻胶囊 10 粒, 精密称定内容物重量, 求其平均装量。研细, 取约 0.5g (相当于 2 粒的重量), 精密称定, 加乙醚 30mL 回流提取 2h, 弃去乙醚液, 残渣用 80% 甲醇 50mL, 置索氏提取器中回流提取 2h, 提取液蒸干, 残渣用 80% 甲醇溶解, 并定容至 10mL, 精密吸取 5mL, 置 10mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 即得。

2.4 线性关系考察 精密称取天麻素对照品 4.6mg, 置 100mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。精密量取 1mL, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密吸取 1, 2, 3, 4, 5mL, 置 10mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀。在上述色谱条件下进行检测, 测定天麻素峰面积, 以峰面积 Y 为纵坐标, 天麻素浓度 X 为横坐标, 经线性回归分析, 得天麻素的回归方程为: $Y= 28560X + 1064$, $r = 0.9995$。结果表明: 天麻素在 0.0092μg~ 0.046μg 范围内, 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 在上述色谱条件下, 连续进样 5 次, 结果测定天麻素峰面积 RSD 值为 1.3%。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 每隔 2h 进样 20μL, 测得峰面积并计算, 重复 5 次, 结果供试品溶液在 10h 内峰面积基本无变化, RSD 为 1.2%。

2.7 重复性试验 平行称取同一批号(030103) 的样品 5 份, 按"2.3"供试品溶液的制备项下方法处理, 依上述色谱条件进样, 按样品测定法, 测定天麻素的含量, 结果 RSD 为 0.9%。

[收稿日期] 2005-03-03

[通讯作者] 王小龙, Tel: (0375) 3399783; E-mail: pdshxl@ sina.com

2.8 空白实验　按处方组成,取除天麻外的其余药味,按工艺要求制成缺天麻的阴性对照溶液。按上述色谱条件测定,结果在天麻素峰出现的位置上($t = 9.233$)无对应峰出现,见图 1,表明其它组分对测定无干扰。

2.9 回收率试验　采用加样回收法,取已知含量的供试品(030103)5 份,分别精密加入一定量天麻素对照品溶液,按供试品溶液的制备及含量测定的方法进行,计算加样回收率为。结果见表 1。

表 1　加样回收率的测定($n = 5$)

序号	样品量(g)	样品含量(mg)	对照品加入量(mg)	检出量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.2847	0.0146	0.0138	0.0248	98.9	98.8	0.6
2	0.2932	0.0150	0.0138	0.0288	99.0		
3	0.2618	0.0134	0.0138	0.0272	97.9		
4	0.2543	0.0131	0.0138	0.296	98.7		

2.10 样品测定　分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20μL,注入高效液相色谱仪中,在上述色谱条件下测定天麻素的色谱峰面积,以外标法计算天麻素的含量,结果见表 2。

表 2　供试品含量测定($n = 3$)

序号	厂家	天麻素含量(mg/粒)
1	A	0.116
2	A	0.114
3	B	0.104
4	B	0.102
5	C	0.003
6	C	0.005

3　讨论

3.1 天麻胶囊共有 10 味药组成,成分较复杂,进样前需加适当处理。试验中曾经采用甲醇超声提取;水饱和的正丁醇超声提取,蒸干,加水 10mL 溶解,用乙醚萃取,水层和乙醚层分别蒸干,水层和乙醚层的残渣用 80% 甲醇 12mL 溶解,加流动相至 25mL 量瓶中;用 D101 大孔树脂柱处理;按上述色谱条件下进行检测,实验证明天麻素易损失。结果用乙醚除杂,80% 甲醇索氏提取较完全,提取物杂质少,重复性好,故选择 80% 甲醇索氏提取。

3.2 流动相的选择　曾经选用多个流动相,不同比例的甲醇-水-磷酸盐缓冲溶液,乙腈-水,乙腈-(不同浓度)磷酸水溶液,结果以乙腈-0.2% 磷酸水溶液(3∶97)峰形及分离效果最好。可使样品中天麻素峰与相邻的色谱峰分离,峰形对称。

3.3 检测波长的选择　用甲醇制备的天麻素对照品溶液进行紫外扫描,结果在 220nm 和 270nm 处都有最大吸收,220nm 的吸收强于 270nm 处的吸收。故选择检测波长为 220nm。

3.4 曾实验改变提取时间,结果以本试验提取时间为最佳。

3.5 供试品溶液的制备曾经采用 80% 甲醇稀释至刻度,经测定其样品的理论塔板数和分离系数太低,不利于天麻素峰和相邻的色谱峰达到基线分离,试验比较,加入等量的流动相稀释至刻度,分离效果有所改善。

4　结论

由样品测定数据,不同厂家的天麻胶囊中天麻素的含量参差不齐,参照药典对天麻药材中天麻素的含量规定折合,天麻胶囊中天麻素的含量应不得低于 0.0563mg/粒,经实验分析及日常数据积累可知,市售天麻胶囊中天麻素的含量差距较大,是否存在低限投料或制备工艺不合理的问题。这样直接影响天麻胶囊的疗效,故应对天麻胶囊的质量做进一步控制。

[参考文献]

[1] 徐礼燊,沙世炎,曾纪琰,等. 中草药有效成分分析法[M]. 下册,北京:人民卫生出版社,1984. 74-79.
[2] 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,2000. 44.
[3] 秦剑. RP-HPLC 法测定天麻丸中天麻素的含量[J]. 中成药,2003,25(6):508-509.
[4] 黄敏. HPLC 法测定川天康胶囊中阿魏酸和天麻素含量[J]. 中成药,2000,22(8):543-546.