

HPLC法同时测定消核灵胶囊中延胡索乙素和迷迭香酸的含量

王佃荣^{1*}, 陈洪喜¹, 杨智慧²(1.连云港市第一人民医院, 江苏连云港 222002; 2.连云港市药品检验所, 江苏连云港 222006)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4719-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.39

摘要 目的: 建立同时测定消核灵胶囊中延胡索乙素和迷迭香酸含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex C₁₈, 流动相A为0.1%磷酸(以三乙胺调pH至6.0)-甲醇(45:55, V/V), 流动相B为0.1%磷酸-甲醇(55:45, V/V), 梯度洗脱, 流速为0.8 ml/min, 检测波长为282 nm(0~25 min)、330 nm(25.01~60 min), 柱温为28℃, 进样量为10 μl。结果: 延胡索乙素和迷迭香酸检测质量浓度分别为1.502~75.10、6.03~301.6 μg/ml(*r*均为0.999 8); 精密性、重复性、稳定性试验的RSD≤1.36%; 加样回收率分别为97.11%~99.87%、98.47%~101.99%, RSD分别为0.95%、1.08%(*n*=9)。结论: 该方法操作简便、快速易行, 结果准确、可靠, 可作为消核灵胶囊中延胡索乙素和迷迭香酸的含量测定方法。

关键词 消核灵胶囊; 延胡索乙素; 迷迭香酸; 高效液相色谱法

Simultaneous Contents Determination of Tetrahydropalmatine and Rosmarinic Acid in Xiaoheling Capsule by HPLC

WANG Dian-rong¹, CHEN Hong-xi¹, YANG Zhi-hui²(1. The First People's Hospital of Lianyungang City, Jiangsu Lianyungang 222002, China; 2. Lianyungang Institute for Drug Control, Jiangsu Lianyungang 222006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of tetrahydropalmatine and rosmarinic acid in Xiaoheling capsule. METHODS: HPLC was performed on the column of Phenomenex C₁₈ with mobile phase A of 0.1% phosphoric acid (adjusted pH to 6.0 with triethylamine)-methanol (45:55, V/V) and (adjusted pH to 6.0 with triethylamine) B of 0.1% phosphoric acid-methanol (55:45, V/V) (gradient elution) at flow rate of 0.8 ml/min, detection wavelength was 282 nm (0-25 min) and 330 nm (25.01-60 min) and volume size was 10 μl. RESULTS: The linear range was 1.502-75.10 μg/ml for tetrahydropalmatine and 6.03-301.6 μg/ml for rosmarinic acid (*r*=0.999 8); RSDs of precision, reproducibility and stability tests were ≤1.36%; recoveries were 97.11-99.87% (RSD=0.95%, *n*=9) and 98.47-101.99% (RSD=1.08%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and can be used for contents determination of tetrahydropalmatine and rosmarinic acid in Xiaoheling capsule.

KEYWORDS Xiaoheling capsule; Tetrahydropalmatine; Rosmarinic acid; HPLC

消核灵胶囊(苏药制字Z04000076)是连云港市第一人民医院研制的医院制剂, 是由延胡索、夏枯草、穿山甲、全蝎、斑蝥、蜈蚣6味药组成的中药复方制剂, 具有解郁散结、调经理气之功效^[1], 可用于乳癖结块(乳腺小叶增生)的治疗。本品原质量标准中无延胡索乙素和迷迭香酸含量的测定, 亦未见同时测定上述两种物质含量方法的报道。为快速、全面控制药品质量, 确保制剂疗效, 笔者参考相关文献^[2-6], 采用高效液相色谱(HPLC)法同时对消核灵胶囊中延胡索乙素和迷迭香酸含量进行了测定, 现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100型HPLC仪, 包括四元梯度泵、在线脱气机、VWD检测器(美国Agilent公司); BP211D型电子天平(德国Sartorius公司); SK250HP型超声仪(上海利导超声仪器有限公司, 功率: 250 W, 频率: 50 kHz); ZF-2型紫外光灯(上海安亭仪器厂)。

1.2 药品与试剂

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0518-85605275。E-mail: 779484024@qq.com

消核灵胶囊(连云港市第一人民医院自制, 批号: 20130304、20130906、20131025, 规格: 0.3 g/粒); 延胡索乙素对照品(批号: 110726-201213)、迷迭香酸对照品(批号: 111871-201203)均由中国食品药品检定研究院提供, 纯度均>98%; 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以0.1%磷酸(以三乙胺调pH至6.0)-甲醇(45:55, V/V)为流动相A, 0.1%磷酸-甲醇(55:45, V/V)为流动相B, 梯度洗脱(0~22 min, 90%→80% A; 22~27 min, 80%→50% A; 27~32 min, 50%→20% A; 32~60 min, 20%→5% A); 流速: 0.8 ml/min; 检测波长: 282 nm(0~25 min)、330 nm(25.01~60 min); 柱温: 28℃; 进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 色谱基线平稳, 延胡索乙素峰、迷迭香酸峰与相邻色谱峰均能达到基线分离, 阴性样品无干扰, 理论板数以迷迭香酸峰计不低于5 000, 详见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取延胡索乙素对照品15.02

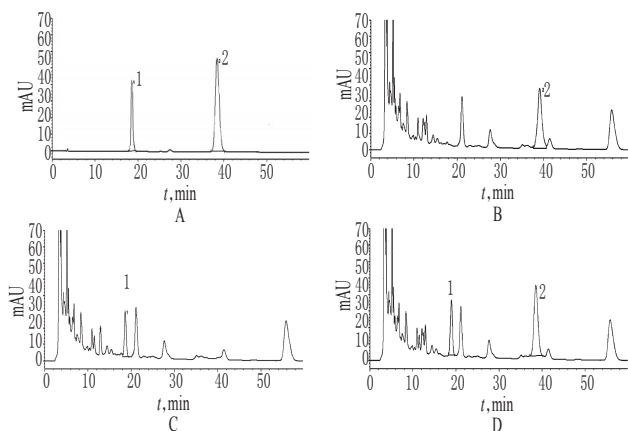


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 缺延胡索的阴性对照; C. 缺夏枯草的阴性对照; D. 供试品; 1. 延胡索乙素; 2. 迷迭香酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substances; B. negative control of *Corydalis yanhusuo*; C. negative control of *Prunella vulgaris*; D. test sample; 1. tetrahydropalmatine; 2. rosmarinic acid

mg、迷迭香酸对照品 60.32 mg, 分别置于 100 ml 量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成延胡索乙素质量浓度为 150.2 μg/ml、迷迭香酸质量浓度为 603.2 μg/ml 的对照品贮备液。分别精密吸上述对照品贮备液各 5 ml, 置于同一 50 ml 量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品 20 粒的内容物, 研细, 取约 1.5 g, 精密称定, 精密加入 15 ml 70% 甲醇, 称定质量, 超声提取 45 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方工艺分别制备不含延胡索和夏枯草药材的阴性样品, 并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

取“2.2.1”项下延胡索乙素、迷迭香酸对照品贮备液各 5、2、1、0.5、0.2、0.1 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 用 70% 甲醇定容, 制成系列混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。以质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得延胡索乙素回归方程为 $y = 1.328 \times 10^3 x - 2.715$ ($r = 0.9998$); 迷迭香酸回归方程为 $y = 2.169 \times 10^3 x + 1.591$ ($r = 0.9998$)。结果表明, 延胡索乙素、迷迭香酸检测质量浓度线性范围分别为 1.502~75.10、6.03~301.6 μg/ml。

2.4 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件重复进样测定 6 次。结果, 延胡索乙素、迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.82%、1.28% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取样品(批号: 20130304)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温放置 0、1、3、5、8、12 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 延胡索乙素、迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 1.36%、0.98% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一样品(批号: 20130304)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 并按“2.1”项下色谱条件进样测

定。结果, 延胡索乙素、迷迭香酸的平均含量分别为 51.24、203.2 μg/粒, RSD 分别为 1.12%、1.06% ($n = 6$), 表明本方法重复性较好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号: 20130304)内容物 1.5 g, 共 9 份, 分别精密加入高、中、低质量的混合对照品, 每 3 份一组, 并按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算样品含量, 并计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 9$)

待测成分	已知含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
延胡索乙素	260.2	150.2	409.1	99.13	98.86	0.95
	260.3	150.2	410.3	99.87		
	260.5	150.2	408.9	98.80		
	259.9	225.3	481.2	98.22		
	260.3	225.3	484.3	99.42		
	260.2	225.3	479.0	97.11		
	260.1	300.4	558.4	99.30		
	260.6	300.4	560.8	99.93		
	260.2	300.4	554.6	98.00		
迷迭香酸	1019.0	603.2	1621.0	99.80	99.96	1.08
	1020.0	603.2	1625.0	100.30		
	1020.0	603.2	1614.0	98.47		
	1018.0	904.8	1917.0	99.36		
	1020.0	904.8	1930.0	100.57		
	1019.0	904.8	1913.0	98.81		
	1019.0	1206.0	2231.0	100.50		
	1021.0	1206.0	2251.0	101.99		
	1019.0	1206.0	2223.0	99.83		

2.8 样品含量测定

取 3 批样品各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算样品含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 ($n = 3, \mu\text{g/粒}$)

Tab 2 Determination results of samples' contents ($n = 3, \mu\text{g/granule}$)

批号	延胡索乙素	迷迭香酸
20130304	51.24	203.2
20130906	52.03	203.8
20131025	51.98	203.6

2.9 耐用性试验

取供试品溶液(批号: 20130304)适量, 在其他色谱条件不变的情况下, 分别采用 Phenomenex C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent SB C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行试验。结果, 不同色谱柱的供试品中延胡索乙素的含量分别为 51.24、51.09、50.02 μg/粒; RSD 均为 1.21% ($n = 6$), 迷迭香酸的含量分别为 203.2、202.1、203.5 μg/粒, RSD 均为 1.05% ($n = 6$), 表明 3 种不同品牌的色谱柱对延胡索乙素和迷迭香酸的含量测定影响均较小, 方法耐用性较好。

3 讨论

3.1 提取条件的选择

本研究分别考察了加热回流法、冷浸提取法和超声提取法, 以 30% 甲醇溶液、50% 甲醇溶液、70% 甲醇溶液为提取溶剂, 提取 30、45、60 min 时的提取效果, 结果表明以 70% 甲醇

颈痹合剂的质量标准研究

魏晓舒^{1*}, 刘燕², 张敏娟²(1.江苏省无锡药品检验所, 江苏无锡 214028; 2.无锡市中医医院药剂科, 江苏无锡 214071)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4721-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.40

摘要 目的:建立颈痹合剂的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中羌活、木香、葛根进行鉴别;根据药典方法测定相对密度与pH;采用高效液相色谱法测定制剂中葛根素含量。色谱柱为XTerra® RP18,流动相为乙腈-0.05%磷酸(10:90, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为250 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:羌活、木香、葛根的TLC图斑点清晰,分离度好。制剂相对密度为1.08, pH为4.5。葛根素检测质量浓度线性范围为2.079~33.26 μg/ml($r=0.999\ 8$);精密性、重复性、稳定性试验的RSD<1.0%;加样回收率为99.50%~100.50%(RSD=0.42%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、重复性好,可用于颈痹合剂的质量控制。

关键词 颈痹合剂;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量控制;葛根素

Study on the Quality Standard for Jingbi Mixture

WEI Xiao-shu¹, LIU Yan², ZHANG Min-juan²(1.Wuxi Institute for Drug Control, Jiangsu Wuxi 214028, China; 2.Dept. of Pharmacy, Wuxi Municipal Hospital of TCM, Jiangsu Wuxi 214071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish quality standard for Jingbi mixture. METHODS: TLC was adopted to identify the *Notopterygii Rhizoma et Radix*, *Aucklandia lappa* and *Pueraria lobata* and determine the relative density and pH according to pharmacopoeia method. HPLC was adopted to determine the content of puerarin. Column was XTerra® RP18 with mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric(10:90, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 250 nm, column temperature was 25 ℃ and volume injection was 10 μl. RESULTS: TLC of *Notopterygii Rhizoma et Radix*, *A. lappa* and *P. lobata* showed clear spots and good separation. The relative density was 1.08, and pH was 4.5. The linear range of puerarin was 2.079-33.26 μg/ml($r=0.999\ 8$); RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 1.0%; recovery was 99.50%-100.50%(RSD=0.42%, $n=6$). CONCLUSION: The method is simple and good reproducibility, and can be used for the quality control of Jingbi mixture.

KEYWORDS Jingbi mixture; TLC; HPLC; Quality control; Puerarin

颈痹合剂是无锡市中医医院自制制剂,由羌活、葛根、木香等多味中药加工而成。该处方是成形的经验方,具有祛风除湿活血通络的功效,适用于风寒湿痹为主的颈型和神经根

型颈椎病的治疗^[1-2]。根据难治性疾病中药制剂的研发思路^[3],并且根据《医疗机构制剂配制监督管理办法(试行)》^[4]和《医疗机构制剂注册管理办法》^[5]要求,本着确保特色制剂质量、提升

溶液超声提取45 min时延胡索乙素和迷迭香酸的提取效率最高^[7]。

3.2 柱温的选择

取同一供试品溶液适量,分别在25、28、30 ℃下试验,结果均能达到基线分离,但25 ℃时迷迭香酸的出峰时间过长,30 ℃时延胡索乙素和相邻峰的分度不理想,故选择28 ℃为本研究的柱温。

3.3 检测波长的选择

根据延胡索乙素和迷迭香酸紫外吸收扫描结果可知,两者分别在282、330 nm波长处有最大吸收。故为了提高测定灵敏度,本试验采用了切换检测波长。结果显示,该方法具有较高的灵敏度,提高了检测结果的准确性。

综上所述,该方法操作简便,快速易行,结果准确、可靠,可作为消核灵胶囊中延胡索乙素和迷迭香酸的含量测定方法。

参考文献

[1] 李永溟,尹可华,戴翔铃.HPLC法测定消核灵胶囊中熊

果酸的含量[J].重庆医学,2002,31(11):1 145.

[2] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:263、525-527.

[3] 花汝凤,姚江雄,黎志坚,等.HPLC同时测定夏桑菊颗粒中迷迭香酸与异迷迭香酸苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(24):75.

[4] 徐婷,曹惠明,金昔陆,等.延胡索乙素临床应用的研究进展[J].上海中医药大学学报,2000,14(4):60.

[5] 王晓玲,郑振,洪战英,等.中药延胡索的化学成分与质量控制研究进展[J].时珍国医国药,2011,22(1):227.

[6] 王发,张秉华,郭欢迎.HPLC法测定复方甘草麻黄碱片中盐酸麻黄碱和延胡索乙素的含量[J].药物分析杂志,2010,30(3):541.

[7] 陈玲玲,朱德全,蔡月娥,等.正交试验优化溪黄草中咖啡酸和迷迭香酸的超声提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):12.

*主任药师。研究方向:药品质量分析。电话:0510-66112737。
E-mail:weixiaoshu.2007@163.com

(收稿日期:2014-10-23 修回日期:2015-08-27)

(编辑:陈宏)