

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01040

# 反相高效液相色谱法测定乌金胶囊中延胡索乙素

## Reversed-phase high-performance liquid chromatography in determination of tetrahydropalmatine contents in *Wujin* capsule

王 慧, 费 扬, 黄玉凤, 陈安妮, 张国庆\*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 建立反相高效液相色谱法测定乌金胶囊中延胡索乙素含量,并应用于该制剂质量控制。**方法** 使用 Agilent Extend-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),甲醇-0.1%磷酸(以三乙胺调 pH 值至 6.0)=55 : 45 为流动相,流速 1.0 ml/min,柱温 35℃,检测波长 280 nm,测定 5 批次乌金胶囊中延胡索乙素含量。**结果** 延胡索乙素在 1.09~21.8 μg/ml( $r=0.999\ 9$ )范围内呈良好线性关系,平均加样回收率为 98.62%,RSD=1.26% ( $n=6$ )。5 批次乌金胶囊中延胡索乙素含量在 15.87~50.57 μg/g。**结论** 反相高效液相色谱法灵敏、准确,适用于乌金胶囊中延胡索乙素的质量控制。

**[关键词]** 乌金胶囊;反相高效液相色谱法;延胡索乙素;含量测定**[中图分类号]** R 927.2 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-1040-02

乌金胶囊是我院临床用于原发性肝癌的辅助治疗制剂,由乌骨藤、郁金、延胡索、黄芪、山楂组成。该制剂功能主治清热解毒、活血化瘀、益气止痛,用于痈肿疮毒、痰湿积聚、血瘀气滞、胸胁胀痛诸症。延胡索又名元胡、玄胡、玄胡索,为罂粟科植物延胡索(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang)的干燥块茎,具有活血、利气、止痛等功效,主要用于胸肋、腕腹疼痛,经闭痛经及跌扑肿痛<sup>[1]</sup>。延胡索主要成分为生物碱,现已从各种延胡索及其同属植物中提出生物碱共 40 余种,按其化学结构可分为原小檗碱、阿扑芬、原阿托品、苯酞异喹啉等。原小檗碱型生物碱达 20 个,其中经鉴定的有:d-紫堇碱(即延胡索甲素)、dl-四氢巴马亭(即延胡索乙素)<sup>[2]</sup>,延胡索乙素止痛镇静作用最强。目前测定延胡索中延胡索乙素的方法主要为高效液相色谱法<sup>[3-5]</sup>,本研究参考 2010 版《中华人民共和国药典》<sup>[6]</sup>中延胡索乙素的含量测定方法,建立了反相高效液相色谱法测定乌金胶囊中延胡索乙素的含量,方法准确、重现性好,可用于乌金胶囊质量控制。

### 1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二级管阵列检测器、Chemstation 色谱工作站;METYLER AE240 型电子天平。

1.2 试剂 乌金胶囊由第二军医大学东方肝胆外科医院制剂室生产,批号:20091201、20100201、20100401、20100701、20100901;延胡索乙素对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号:110726-201011;甲醇为色谱纯,无水乙醇、磷酸、三乙胺等均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

### 2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Extend-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250

mm,5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸(以三乙胺调 pH 值至 6.0)=55 : 45;流速 1.0 ml/min;检测波长 280 nm;进样量 10 μl;柱温 35℃。

#### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取延胡索乙素对照品 10.9 mg,置 10 ml 量瓶中,用甲醇定容,摇匀得浓度为 1.09 mg/ml 的母液。精密移取 1 ml 母液置 10 ml 量瓶中,用甲醇定容,摇匀得浓度为 109 μg/ml。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取乌金胶囊 5 g,置于平底烧瓶中,加入氨水-甲醇(1 : 20)100 ml,称定重量,超声 15 min,然后加热回流 1 h 放冷,用氨水-甲醇(1 : 20)混合溶液补足减少的质量,摇匀,过滤。取滤液 50 ml,浓缩残渣加 10 ml 甲醇溶解,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性供试品的制备 以相同处方比例按乌金胶囊制备工艺制备不含延胡索药材的阴性样品。

#### 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性实验 按 2.1 项色谱条件,用阴性样品、对照品溶液和制剂样品溶液分别进样,根据色谱参数计算系统适应性。对照品中延胡索乙素保留时间是 24.377 min,拖尾因子 1.005,理论塔板数大于 5 000,分离度大于 3.0。阴性样品、对照品和制剂样品色谱图见图 1。

2.3.2 标准曲线及线性 配制延胡索乙素对照品浓度为 1.09、2.18、5.45、10.9、16.35、21.8 μg/ml,以色谱峰面积(Y)对对照品浓度(X)进行线性回归,得线性方程: $Y=8.210\ 5X+0.239\ 5$ , $r=0.999\ 9$ ,结果表明延胡索乙素在 1.09~21.8 μg/ml 范围内线性良好。

2.3.3 检测限及定量限 精密量取延胡索乙素对照品溶液适量,以信噪比 3 : 1 计,检测限为 0.36 μg/ml,以信噪比 10 : 1 计,定量限为 1.09 μg/ml。

[收稿日期] 2011-04-21 [接受日期] 2011-07-21

[作者简介] 王 慧,硕士,主管药师,E-mail: wang\_h2007@sina.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing\_zhang91@126.com

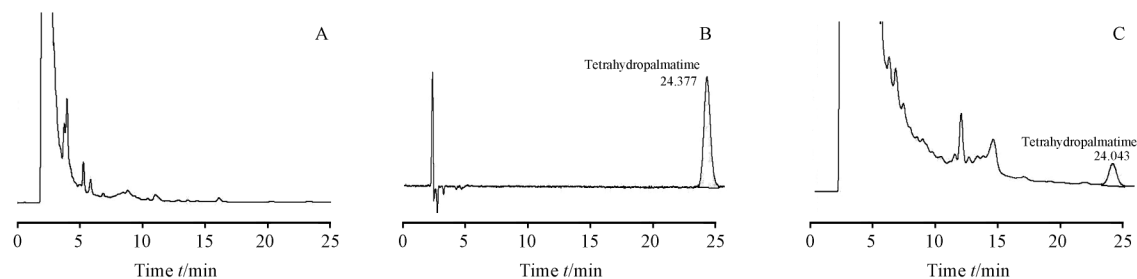


图1 阴性样品(A)、对照品(B)和制剂样品(C) HPLC 色谱图

2.3.4 精密度(RSD) 取2.3.2项下低、中、高3个浓度(1.09、10.9、21.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )对照品溶液在1 d内连续进样5次,以及连续5 d分别进样,每天进样1次,根据峰面积考察日内和日间RSD。日内RSD分别为1.44%、0.38%、0.48%;日间RSD分别为1.86%、0.98%、0.70%,结果表明精密度良好。

2.3.5 稳定性 对照品稳定性考察:低、中、高3个浓度对照品溶液分别于室温放置8 h及4℃放置10 d后进样,RSD均 $<2\%$ ( $n=3$ ),符合方法学要求。制剂样品稳定性考察:取乌金胶囊(批号:20100401)按2.2.2项下方法制备样品,分别于室温放置8 h及4℃放置24 h后测定,RSD $<2\%$ ( $n=3$ ),符合方法学要求。结果显示在上述条件下样品稳定。

2.3.6 重复性 取乌金胶囊(批号:20100401)按2.2.2项下方法制备5份样品,按照2.1项下色谱条件进样,以延胡索乙素的峰面积计算RSD=1.93%。

2.3.7 加样回收率 取乌金胶囊(批号:20100401)6份,每份5 g,分别精密加入浓度为10.9 mg/ml对照品0.2 ml,按照2.1项下色谱条件进样,计算回收率。平均回收率为98.62%,RSD=1.26%,符合方法学要求。

2.4 样品测定 按2.2.2项下方法制备供试品溶液,进样分析,记录色谱峰面积,测定5个批次乌金胶囊,结果见表1。

表1 乌金胶囊中延胡索乙素含量测定结果

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

批号	含量
20091201	18.24 $\pm$ 0.34
20100201	15.87 $\pm$ 0.22
20100401	50.57 $\pm$ 0.53
20100701	24.29 $\pm$ 0.35
20100901	34.49 $\pm$ 0.38

### 3 讨论

3.1 提取方法选择 据文献报道,提取方法主要有乙醇回流法、超声提取法、超临界CO<sub>2</sub>流体萃取法,超临界CO<sub>2</sub>流体

萃取法成本较高,而回流提取设备简单,超声提取具有简便、迅速的特点<sup>[1]</sup>。本研究对甲醇超声提取1 h与甲醇先超声15 min再加热回流提取1 h两种方法进行比较,结果表明加热回流提取率比单用超声提取高一倍,故选择加热回流作为样品提取方法。

3.2 色谱条件优化 考察SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu\text{m}$ )与Extend-C<sub>18</sub>(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu\text{m}$ )色谱柱,前者在10 min左右出峰,杂质峰对样品测定有干扰,故选择后者。延胡索乙素在Extend-C<sub>18</sub>色谱柱保留时间为24 min左右,且制剂中其他成分对样品峰测定无干扰。考察流动相pH值5.5、6.0、6.5,最终确定甲醇-0.1%磷酸(以三乙胺调pH值至6.0)=55:45,样品峰分离度最好,峰型最优。

3.3 含量测定 5批乌金胶囊中延胡索乙素含量在15.87~50.57  $\mu\text{g}/\text{g}$ 之间,为制订该制剂延胡索乙素含量提供了一定参考依据。5批制剂含量差异比较大,可能与药材产地、采收季节及制剂储存条件等因素有关,影响因素的考察还有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 卢耀文,杨中林. 延胡索乙素提取工艺优选研究[J]. 中成药, 2008,30:1247-1248.
- [2] 窦志英,王 艳,孙 巍. 延胡索的研究概况[C]//第五届国际中医药学术研讨会暨第九届国际针灸学术交流会议论文集,2006-10-14. 天津:出版者不详,2006:450-453.
- [3] 朝建伟,张 莉,高小春. HPLC法测定复方元胡止痛膏中延胡索乙素的含量[J]. 中国药师,2009,12:621-623.
- [4] 闫小青,董林毅. HPLC法测定伤痛宁胶囊中延胡索乙素[J]. 中草药,2010,41:1109-1110.
- [5] 刘 源,马双成. 反相高效液相色谱法测定元胡止痛片中延胡索乙素含量[J]. 药物鉴定,2010,19:27-28.
- [6] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:130.

[本文编辑] 尹 茶