

# HPLC法测定瘀创灵凝胶中延胡索乙素的含量\*

刘超英, 刘丹, 韩建伟\*\*

(湖北中医学院中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室, 武汉 430061)

**摘要** 目的: 建立瘀创灵凝胶中延胡索乙素的含量测定方法。方法: 用 HPLC 方法对制剂中所含的延胡索乙素进行含量测定研究。采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 以甲醇-0.1% 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 至 6.0) (60:40) 为流动相, 检测波长为 280 nm, 柱温 35 °C, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 延胡索乙素在 0.11~1.15 μg 范围内呈线性关系 ( $r=0.9999$ ), 平均回收率为 99.7% (RSD=1.8%)。结论: 此方法操作简便、可靠, 重现性好, 专属性强, 能有效控制该制剂的质量。

**关键词:** 瘀创灵凝胶; 延胡索乙素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)08-1330-03

## HPLC determination of tetrahydropalmatine in Yuchuangling gels\*

LIU Chao-ying LIU Dan HAN Jian-wei\*\*

(Ministry of Education Key Laboratory of Resource Science and Compound in Chinese Medicine in Hubei

College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

**Abstract Objective** To establish an HPLC method for determination of tetrahydropalmatine in Yuchuangling gels. **Methods** The liquid chromatography was carried out using Zorbax SB-C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), with detection wavelength at 280 nm. The mobile phase was compound of methanol-0.1% phosphoric acid solution (adjust the pH to 6.0 with triethylamine) (60:40), the column temperature was 35 °C and the flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. **Results** The calibration curve was linear in the range of 0.11-1.15 μg ( $r=0.9999$ ). The average recovery was 99.7% (RSD=1.8%). **Conclusion** The method established in this paper can be adopted for the compound. This method is simple, accurate, reliable and reproducible.

**Key words** Yuchuangling gels; Tetrahydropalmatine; HPLC

瘀创灵凝胶为临床多年应用的治疗软组织损伤的有效方剂, 由延胡索、血竭、乳香、当归、冰片 5 味中药组成, 具有活血散瘀、消肿止痛、生肌止痒的功效。其中, 延胡索为方中君药, 具有活血、利气、止痛之功效<sup>[1]</sup>, 而延胡索乙素等叔胺类生物碱是其作用的主要物质基础, 含量较高, 易控制。故本文选用延胡索乙素作为指标成分, 参考有关文献<sup>[2]</sup>, 建立了测定其含量的高效液相色谱法。通过方法学考察, 稳定性好, 专属性强, 故本方法可作为瘀创灵凝胶的质控方法之一。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 (四元泵, 美国); 延胡索乙素对照品 (批号: 0726-200208 中国药品生物制品检定所); 甲醇 (分析纯, 上海振兴化

工一厂); 瘀创灵凝胶 (本院自制); 其他试剂均为分析纯; 水为重蒸馏水。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[2]</sup> 色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 至 6.0) (60:40); 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 °C; 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>。

### 2.2 溶液制备

对照品储备液: 精密称取减压干燥 48 h 的延胡索乙素对照品 2.87 mg 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解定容, 制成 1 mL 含延胡索乙素 114.8 μg 的对照品溶液。

供试品溶液: 取瘀创灵凝胶约 1 g 精密称定, 置

\* 湖北省教育厅资助项目 (D20081608)

\*\* 通讯作者 Tel: (027) 61093199 E-mail: yongflying@sohu.com

10 mL量瓶中,加盐酸-甲醇溶液(1:99)至刻度,超声提取30 min(功率250 W,频率40 kHz),放冷,滤过,精密吸取续滤液4 mL,加在中性氧化铝柱(100~200目,3 g内径1.5 cm)上,甲醇30 mL洗脱,收集洗脱液,溶剂蒸干,残渣加甲醇溶解,转移并定容于2 mL量瓶中,既得。

阴性溶液:按处方比例和制备工艺制备不含延胡索的阴性样品,按“供试品溶液”制备方法制得阴性溶液。

2.3 方法专属性 分别吸取上述3种溶液各10 μL进样,按上述色谱条件进行检测,可见延胡索乙素对照品及样品均在23 min左右出现延胡索乙素特征吸收峰,阴性对照在延胡索乙素位置处无干扰。结果见图1。

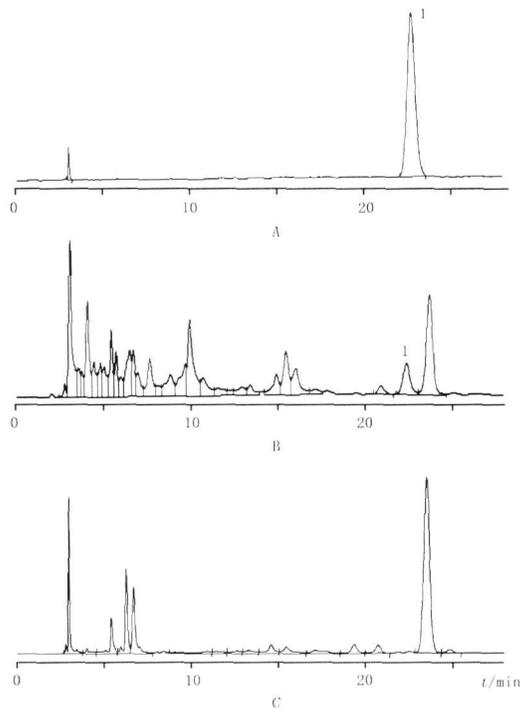


图1 延胡索乙素对照品(A)、样品(B)和阴性样品(C)高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of tetrahydropalmatine reference substance(A), sample(B) and blank sample(C)

1. 延胡索乙素(tetrahydropalmatine)

2.4 线性关系及检测限考察 精密量取延胡索乙素对照品储备液0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件依次进样20 μL,以进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为:

$$Y = 916.3X - 10.82 \quad r = 0.9999$$

表明延胡索乙素在0.11~1.15 μg范围内线性关系

良好。同时将对照品溶液稀释后进样,以信噪比3:1计,测得最小检测浓度为3.45 μg·mL<sup>-1</sup>。

2.5 精密度试验 吸取延胡索乙素对照品溶液10 μL,重复测定6次,峰面积的RSD=0.70%。

2.6 稳定性试验 吸取同一供试品溶液10 μL,分别于0, 2, 4, 6, 12, 24 h进样,测定峰面积的RSD=2.4%。表明至少24 h内供试品溶液仍保持稳定。

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,进行HPLC测定,计算平均含量为177.40 μg·g<sup>-1</sup>,RSD为1.8%。

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0.5 g分别加入延胡索乙素对照品溶液(129 μg·mL<sup>-1</sup>)0.6, 0.7, 0.8 mL各2份,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 回收率试验结果  
Tab 1 Results of the recovery

| 样品含量<br>(content)<br>/μg | 加入量<br>(added)<br>/μg | 实测值<br>(found)<br>/μg | 回收率<br>(recovery)<br>/% | 平均回收率<br>(average<br>recovery) % | RSD<br>/% |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------|
| 89.76                    | 77.40                 | 156.08                | 101.7                   | 99.7                             | 1.8       |
| 89.41                    | 77.40                 | 153.49                | 98.3                    |                                  |           |
| 90.47                    | 90.30                 | 179.75                | 99.1                    |                                  |           |
| 87.99                    | 90.30                 | 179.50                | 98.9                    |                                  |           |
| 89.41                    | 103.20                | 208.78                | 102.3                   |                                  |           |
| 90.30                    | 103.20                | 204.41                | 98.2                    |                                  |           |

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,结果分别是178.21, 177.42, 173.74 μg·g<sup>-1</sup>。

### 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,使用的流动相在药典<sup>[1]</sup>的基础上进行了改进,缩短了延胡索乙素的保留时间,且分离度和对称性均良好。

3.2 提取溶剂的选择 用甲醇做溶剂时超声后溶液浑浊,且难以过滤,经分析,是因为制剂样品的凝胶基质卡波姆940被中和使羧基离子化后,由于负电荷的相互排斥作用,使分子链弥散伸展,呈极大的膨胀状态而具有粘性,但当pH<3或pH>12时粘稠度降低,故选用盐酸-甲醇溶液(1:99)做溶剂,超声后溶液澄清,容易过滤,延胡索乙素在盐酸-甲醇溶液(1:99)中的溶解度很好。

3.3 提取时间的考察 采用盐酸-甲醇溶液(1:99)超声处理,分别测定不同的提取时间(20

30, 40 min)样品中延胡索乙素的含量, 结果在 30~40 min内样品中延胡索乙素的含量基本不变, 故选择超声 30 min。

**3.4 氧化铝用量的考察** 分别精密吸取供试品盐酸-甲醇溶液(1:99)提取液 4 mL, 加在 3种不同用量的中性氧化铝柱(100~200目; 2, 3, 4 g 内径 1.5 cm)上, 待吸附完成后以甲醇洗脱, 至流出液无色后, 再加甲醇 5 mL继续洗脱, 收集洗脱液, 溶剂蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移并定容于 1 mL量瓶中。以薄层鉴别方法作为检视手段, 选用装填 3 g的氧化铝柱较理想。

**3.5 洗脱剂用量的考察** 精密吸取供试品盐酸-甲醇溶液(1:99)提取液 4 mL, 加在中性氧化铝玻璃层析柱(100~200目, 3 g 内径 1.5 cm)上, 甲醇洗

脱, 至流出液肉眼判断基本无色后, 继续以甲醇洗脱, 收集洗脱液每 1份 3 mL, 分别浓缩后, 用薄层鉴别方法检测, 直至检测不到延胡索乙素橙红色特征斑点, 停止洗脱。比较结果, 确定洗脱剂用量为 30 mL。

#### 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol II (一部): 94
- 2 ZHANG L(张莉), FU M in(付敏), HAN Jian-wei(韩建伟). Optimizing alcohol refluxing extraction technique of Rhizoma Corydalis and Radix Angelicae Dahuricae in compound Yuanhu Zhitong patch (复方元胡止痛贴中延胡索、白芷乙醇回流提取工艺研究). *Chin Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2008 (1): 57

(本文于 2008年 7月 15日收到)

## 关于召开生物制品质量控制与批签发管理国际研讨会的第二轮通知

各有关单位:

为进一步促进我国与其他国家及国际组织在生物制品质量控制领域的合作与交流, 提高我国生物制品质量控制水平, 完善我国生物制品批签发的管理, 扩大我国在世界生物制品质量控制领域的影响力, 由中国药品生物制品检定所主办, 中国医药生物技术协会医药产品质量控制专业委员会、中国微生物学会生物制品专业委员会、中华预防医学会生物制品分会协办的“生物制品质量控制与批签发管理国际研讨会”, 将于 2009年 9月 4-5日在北京召开, 大会组织委员会和学术委员会组成见附件一、附件二。

大会邀请了世界卫生组织(WHO)、英国国家生物制品检定所(NIBSC)、美国药典会(USP)、德国疫苗及血清研究所(PEI)、加拿大卫生部生物制品质量研究中心(CBR)等生物制品质量研究与控制领域的国际著名专家, 国内外疫苗研究机构和生物制品企业资深专家以及中国药品生物制品检定所的专家等在大会上进行交流, 报告内容见附件三。

大会交流方式包括特邀报告、大会报告、墙报展示和论文汇编等。大会报告配有中英文同声翻译。欢迎从事生物制品研究、开发、生产、质量管理的企业和管理机构的人员参加本次会议和投稿交流。

详见: [www.nicpbp.org.cn](http://www.nicpbp.org.cn)