RP-HPLC 测定骨健口服液中延胡索乙素的含量

潘云雪[1],诸葛陇[1],张芳芳[2]（1.杭州市药品检验所，杭州 310017；2.金华职业技术学院医学院，浙江 金华 321007）

摘要：目的 建立骨健口服液中延胡索乙素的含量测定方法。**方法** 采用反相高效液相色谱法。色谱柱：ZORBAX XDB-C_{18} 柱（150 mm × 4.6 mm, 5 μm），流动相：0.1%磷酸溶液（用三乙胺调节 pH 值至 6.0）-甲醇（45∶55），检测波长：280 nm，流速：0.8 mL·min^{-1}，柱温：45 ℃。**结果** 延胡索乙素在 0.054 ~ 2.160 μg 内线性关系良好，相关系数 r = 0.999 9，平均回收率为 98.9%，RSD = 0.5%(n=9)。**结论** 该方法简便、准确、重现性好，可用于骨健口服液的质量控制。

关键词:反相高效液相色谱法；骨健口服液；延胡索乙素

中图分类号：R917.101;R917.78 **文献标识码**：B **文章编号**：1007-7693（2009）05-0400-03

作者简介：潘云雪，女，博士，副主任药师 Tel: (0571)85463889 E-mail: panyunxue@hz.cn

Determination of Tetrahydropalmatine in Gujian Oral Liquid by RP-HPLC

PAN Yunxue[1],ZHUGE Long[1],ZHANG Fangfang[2](1.*Hangzhou Institute for Drug Control, Hangzhou* 310017,*China;* 2.*Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua* 321007,*China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the quantity of tetrahydropalmatine in Gujian oral liquid. **METHODS** RP-HPLC was used. Chromatographic conditions:ZORBAX XDB-C_{18} column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of 0.1% H_3PO_4（pH adjusted to 6.0 by triethylamine）-methnol (45∶55), the flow rate was 0.8 mL·min^{-1}, the detective wavelength was set at 280nm and column temperature was 45 ℃. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 0.054～2.160 μg for the tetrahydropalmatine (r=0.999 9).The average recovery was 98.9% and the RSD was 0.5% (n=9). **CONCLUSION** The method is simple and accurate with good repeatability, which may be used for the quality control of Gujian oral liquid.

KEY WORDS:RP-HPLC；Gujian oral liquid；tetrahydropalmatine

骨健口服液是 1999 年经浙江省卫生厅批准为准字号的医院制剂，由丹参、当归、延胡索、黄芪等药味组成，具有益气活血、补益肝肾、理气止痛的功效，对早期股骨头坏死具有缓解症状并阻止疾病发展的作用，临床主要用于治疗股骨头无菌性坏死。方中延胡索具有活血、利气、止痛的功效。为了更好地控制药品质量，笔者建立了 RP-HPLC 测定该制剂中延胡索乙素的含量。方法学研究表明，该方法简便、准确，重现性好，可作为该制剂的质量控制方法。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪：包括四元梯度泵、自动进样器、紫外检测器、色谱工作站；AG245 电子天平；320pH 计（Mettler Toledo）。

延胡索乙素对照品（中国药品生物制品检定所，批号：110726-200208）；骨健口服液（浙江省中医院制剂室，批准文号：浙药制 Z20060061，批号：20050822、20051024、20051102）；甲醇为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：ZORBAX XDB-C_{18} 柱（150 mm×4.6 mm, 5 μm）；流动相：0.1%磷酸溶液（用三乙胺调节 pH 值至 6.0）-甲醇（45∶55）；流速：0.8 mL·min^{-1}；检测波长：280 nm；柱温：45 ℃。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取经五氧化二磷减压干燥过夜的延胡索乙素对照品 10.80 mg，置 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品贮备溶液。精密量取 5 mL 对照品贮备溶液置 25 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取本品 10 mL，加氨试液调 pH 值至 10，置分液漏斗中，用乙醚萃取三次（20 mL，15 mL，10 mL），合并乙醚液，用水 20 mL 洗涤 1 次，乙醚液挥干，残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备

取缺延胡索药材的阴性制剂 10.0 mL，同“2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.5 专属性试验

取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液，按“2.1”项下色谱条件测定。结果供试品溶液在与延胡索乙素对照品相同保留时间处出现色谱峰，而阴性对照液在与延胡索乙素相同保留时间处无色谱峰出现，表明阴性对照无干扰。HPLC 图谱见图 1。

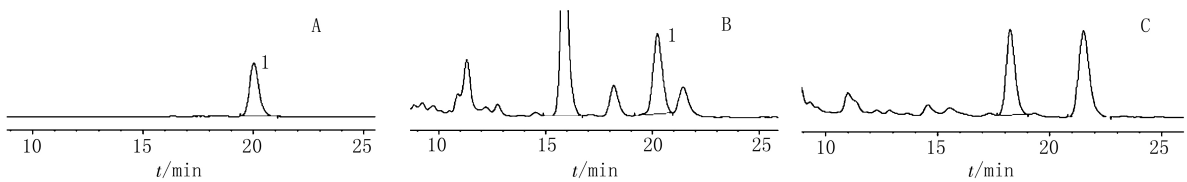

图 1 高效液相色谱图

A-对照品；B-供试品；C-阴性样品；1-延胡索乙素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard;B-sample;C-blank sample;1-tetrahydropalmatine

2.6 线性关系考察

分别精密吸取上述对照品贮备溶液 0.5，1.0，2.5，5.0，10.0，20.0 mL 至 20 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，分别按“2.1”项下色谱条件进样 20 μL，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，以对照品进样量（μg）为横坐标绘制标准曲线，回归方程为 $Y=1\,126.5X+0.568\,5$，$r=0.999\,9$。表明延胡索乙素进样量在 0.054～2.160 μg之间与峰面积呈良好线性关系。

2.7 重复性试验

取批号为 20051102 的样品 6 份，分别按含量测定方法平行操作、测定，平均含量为 0.022 6 mg·mL^{-1}，RSD＝1.0%，表明方法重复性良好。

2.8 重现性试验

取批号为 20051102 的样品 6 份，由本所化药室的检验人员分别按“2.7”项下的方法平行操作、在化学药品实验室的 Waters HPLC 仪器上测定，结果平均含量为 0.022 5 mg·mL^{-1}，RSD＝0.9%，表明方法重现性良好。

2.9 稳定性试验

取供试品溶液，分别在 0、1、2、4、8、12 h 各进样 1 次，测定延胡索乙素的峰面积。结果 RSD＝1.8%，表明延胡索乙素在 12 h 内基本稳定。

2.10 加样回收试验

精密吸取 5 mL 已知含量（0.022 6 mg · mL^{-1}）的同一供试品溶液（批号：20051102）9 份，分成 3 组，每组各分别精密加入延胡索乙素对照品贮备溶液 0.8，1.0，1.2 mL，置水浴上挥去甲醇，加适量水使成 10 mL，按供试品方法提取、测定含量，计算加入量的回收率，结果见表 1。

表 1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test (n=9)

样品含量/μg	加入量/μg	测得值/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
113.0	86.4	198.5	98.96		
113.0	86.4	199.3	99.88		
113.0	86.4	198.7	99.19		
113.0	108.0	219.9	98.98		
113.0	108.0	220.0	99.07	98.9	0.5
113.0	108.0	219.6	98.70		
113.0	129.6	240.9	98.69		
113.0	129.6	240.3	98.23		
113.0	129.6	241.1	98.84		

2.11 耐用性试验

取供试品溶液，分别采用 3 种不同厂牌的 ODS 柱（Extend C_{18} 柱，200 mm × 4.6 mm, 5 μm; Luna C_{18} 柱，250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Gemini C_{18} 柱，250 mm × 4.6 mm, 5 μm）进行实验，结果延胡索乙素峰和前后杂质峰的分离度都大于 1.5，能满足系统适用性要求。

2.12 样品含量的测定

取本品 3 批（批号：20050822、20051024、20051102），按“2.3”项下方法制备供试品溶液。分别吸取供试品溶液 10 μL、对照品溶液 10 μL，在上述色谱条件下进样，测定峰面积，按外标法以峰面积计算延胡索乙素的含量，结果 3 批含量分别为 0.022 0，0.022 8，0.022 6 mg·mL^{-1}。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

延胡索乙素为叔胺类生物碱，其游离碱在乙醚中有较好的溶解度[1]，根据以上性质采用氨水碱化后乙醚提取的方法。经薄层色谱法检验，乙醚萃取 3 次，则延胡索乙素基本提取完全。

3.2 色谱条件的选择

在试验过程中发现，延胡索乙素色谱峰前后均有其他峰干扰，参考文献[2-3]，尝试各种不同的色谱条件，采用正交法比较了不同 pH 值的流动相（pH 值分别为 5.0，6.0，7.0），不同的流速（0.8，0.9，1.0 mL·min^{-1}）和不同的柱温（30，40，45 ℃），结果发现采用以 0.1%磷酸溶液（用三乙胺调节 pH 值至 6.0）-甲醇（45∶55）为流动相；流速：0.8 mL·min^{-1}；柱温：45 ℃测定，色谱峰分离良好，且保留时间适中，测定结果令人满意。

REFERENCES

[1] ZUO M L,YUAN N.Determination of tetrahydropalmatine in Jiawei Juantong capsule by HPLC [J].Chin Pharm (中国药业), 2003,12 (3) : 47-48.

[2] Ch.P(2005) Vol Ⅰ (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005 : 94.

[3] DAI J Y,LAI Z F.Determination of tetrahydropalmatine of Kuaiwei tablets by HPLC[J].Chin Pharm(中国药业),2005,14 (6):40-41.

收稿日期：2008-04-10