

· 研究报告 ·

HPLC法测定扶正平消胶囊中吴茱萸次碱的含量研究

李盛建, 钱 跹, 周 瑾, 吕 磊, 张国庆, 赵 亮 (上海东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438)

[摘要] **目的** 建立高效液相色谱法测定扶正平消胶囊中吴茱萸次碱含量的方法。**方法** 样品经乙醇提取, 乙酸乙酯液-液萃取后测定, 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈, 流动相为乙腈-四氢呋喃甲酸水溶液(2% 四氢呋喃+0.2% 甲酸), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 40 °C, 检测波长为 240 nm。**结果** 吴茱萸次碱含量在 1.18~118 μg/ml 范围内线性关系良好, $r=0.9999$; 其中日内、日间精密度 RSD 均 < 2%, 平均加样回收率为 94.20%。**结论** 本法准确、专属性强、重复性好, 可用于测定扶正平消胶囊中吴茱萸次碱的含量。

[关键词] 高效液相色谱; 吴茱萸次碱; 扶正平消胶囊; 质量标准

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2018)03-0274-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.018

Determination of rutaecarpine in Fuzhengpingxiao capsule by HPLC method

LI Shengjian, QIAN Xian, ZHOU Jin, LÜ Lei, ZHANG Guoqing, ZHAO Liang (Department of Pharmacy, Shanghai Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To develop a new method to determine the contents of rutaecarpine in Fuzhengpingxiao capsule by HPLC method. **Methods** Samples were handled by ethanol and extraction with ethyl acetate. The separation was achieved on an Agilent TC-C₁₈ column using a mobile phase system of acetonitrile-water (2% Tetrahydrofuran and 0.2% formic acid) at a flow rate of 1.0 ml/min. The temperature of column was 40 °C and the detection wavelength was 240 nm. **Results** The calibration curves of rutaecarpine showed good linearity in the ranges of 1.18-118 μg/ml, $r=0.9999$. The results of intra-day and inter-day precisions were both within 2%, the average additional recovery rate was 94.20%. **Conclusion** The HPLC method was accurate, specific, sensitive and reproducible, which could be used for quality control of rutaecarpine in the preparation of Fuzhengpingxiao capsule.

[Key words] HPLC; rutaecarpine; Fuzhengpingxiao capsule; quality standard

扶正平消胶囊是上海东方肝胆外科医院临床用于治疗原发性肝癌的经验方剂, 是由吴茱萸、夏枯草、黄芪等二十八味中药组成的复方制剂。扶正平消胶囊是针对我国中医所称肿瘤患者气滞血淤、热毒内蕴、肝失疏泄、气阴两虚的病机理论, 采用行气破血、扶正抗邪的抗癌中药对症治疗, 并且结合临床长期研究, 筛选精炼组方而制成的医院制剂。对于这二十八味中药大复方制剂, 本院现有的质量标准未对其进行有效的质量控制。本方中吴茱萸药材比重较大, 研究表明其具有良好的抗肿瘤作用^[1-3]。因此本研究利用 HPLC 法对吴茱萸中的吴茱萸次碱进行含量测定, 旨在为完善扶正平消胶囊的质量标准提供科学依据。

吴茱萸次碱有多种含量测定方法, 包括 HPLC 法^[4]、薄层色谱扫描法^[5]、液相色谱-串联质谱法^[6]等。其中 HPLC 法具有较多优点, 包括速度快、分辨率高等。因此, 笔者首先考虑使用 HPLC 法对扶正平消胶囊中吴茱萸进行含量测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、ChemStation B 02.01 色谱工作站); METTLER AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); SB 3200-T 超声发生器(上海科导超声仪器公司)。

1.2 试剂

吴茱萸次碱(批号: ST00570120MG, 上海诗丹德生物科技有限公司); 甲醇、乙腈(均为色谱纯, 美

[作者简介] 李盛建, 药师, Tel: (021)81875579, Email: punk8@163.com

[通讯作者] 赵 亮, 副主任药师, Tel: (021)81875579, Email: zhaoliangphar@163.com

国Merck公司);甲酸、四氢呋喃(均为色谱纯, Sigma公司);乙酸乙酯(分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司);水为超纯水;扶正平消胶囊(批号: 20160501、20160502、20160601,本院制剂室)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),乙腈-四氢呋喃甲酸水溶液(2% 四氢呋喃+0.2% 甲酸)(35 : 65)为流动相,流速 1.0 ml/min,柱温:40 °C;检测波长 240 nm,进样量 20 μl,运行时间 60 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取吴茱萸次碱对照品 11.80 mg,置于 50 ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 0.236 mg/ml 对照品储备液,置 4 °C 冰箱中。

2.2.2 供试品溶液

取扶正平消胶囊 20 粒(约 5.0g),去壳取内容物,混匀,取胶囊内容物 2.5 g,精密称定,置于 50 ml 锥形瓶中,加 70% 乙醇 25 ml,超声(50 kHz, 120 W)提取 30 min,过滤,滤液置水浴条件下蒸至约 5 ml,转移至分液漏斗中,加 40 ml 乙酸乙酯分两次液-液萃取,每次 20 ml,合并萃取液,水浴条件下蒸干,分次加入 3 ml 甲醇使溶解,转移至 5 ml 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.2.3 阴性对照溶液

除吴茱萸药材饮片外,取处方量其余 27 种药材饮片,按处方工艺制备阴性对照样品,并按“2.2.2”项下条件制备阴性对照样品溶液。

2.3 系统适应性

取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,得液相色谱图(图 1),吴茱萸次碱保留时间为 38.21 min,色谱峰对称性为 0.95,塔板数大于 15 000。结果表明吴茱萸次碱色谱峰与其他各成分色谱峰得到较好的分离,阴性对照无干扰。

2.4 线性关系考察

采用逐级稀释法,精密量取适量吴茱萸次碱对照品溶液,置于 10 ml 容量瓶中,加入甲醇定容,得到吴茱萸次碱对照品浓度分别为 118、59、11.8、5.9、1.18 μg/ml 不同浓度系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样。每个浓度点平行进样 3

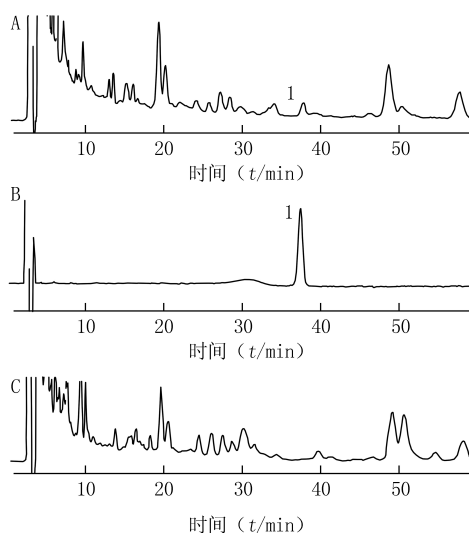


图 1 吴茱萸次碱 HPLC 图

A:扶正平消胶囊样品;B:吴茱萸次碱对照品;C:阴性供试品;1:吴茱萸次碱

针,以吴茱萸次碱溶液的浓度(X)为横坐标,吴茱萸次碱色谱峰面积值(Y)为纵坐标,进行线性回归,得线性方程: $Y = 98.66X + 14.03$, $r = 0.9999$ 。结果表明吴茱萸次碱在 1.18~118 μg/ml 的范围内线性良好,以信噪比为 10 时(S/N=10)测得吴茱萸次碱的最低定量限为 0.59 μg/ml,以信噪比为 3 时(S/N=3)测得吴茱萸次碱的最低检测限为 0.29 μg/ml。

2.5 精密度试验

取低、中、高 3 个浓度(5.9、11.8、59 μg/ml)对照品溶液 20 μl 进样,1 d 内重复测定 3 次,连续 3 d 测定,记录吴茱萸次碱色谱峰面积,考察日内和日间精密度,结果吴茱萸次碱日内精密度 RSD 值分别为 0.68%、0.96% 和 0.22% ($n=3$),日间精密度 RSD 值分别为 1.3%、1.1% 和 0.85%。结果显示该方法精密度符合方法学要求,仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批次扶正平消胶囊样品,共 6 份,按“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,吴茱萸次碱的平均含量分别为 21.86 μg/g(RSD 为 2.63%, $n=6$),结果表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

按“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液,分别在 0、4、8、12、24、48 h 测定样品溶液中吴茱萸次碱的含量,考察样品常温放置稳定性,吴茱萸次碱 RSD 为 1.49% ($n=6$),结果表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

取 1.25 g 扶正平消胶囊粉末,平行操作 6 份,分别加入对照品溶液 0.32 ml (118.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$),按“2.2.2”项下方法操作制备溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,结果如表 1 所示,吴茱萸次碱的平均加样回收率为 94.20% (RSD 为 4.3%, $n=6$),结果表明该方法回收率良好。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=6$)

称样量 (m/g)	原有量 (m/ μg)	加入量 (m/ μg)	测得量 (m/ μg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
1.252	27.29	37.76	64.44	98.38	94.20	4.30
1.254	27.34	37.76	61.12	89.46		
1.248	27.21	37.76	64.12	97.75		
1.250	27.25	37.76	62.52	93.41		
1.251	27.27	37.76	61.08	89.54		
1.247	27.18	37.76	63.69	96.69		

2.9 样品含量测定

分别取批号(20160501,20160502,20160601)扶正平消胶囊 20 粒,去壳取内容物,混合均匀,取胶囊内容物 2.5 g,精密称定,置 50 ml 锥形瓶中,按“2.2.2”项下方法操作制备溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,以峰面积外标法计算含量,测定结果见表 2。

表 2 吴茱萸次碱含量测定结果 ($n=3$)

批号	吴茱萸次碱($\mu\text{g}/\text{g}$)
20160501	21.96
20160502	22.10
20160601	22.65

3 讨论

3.1 含量测定成分的选择

吴茱萸药材中主要以生物碱类成分为主,《中华人民共和国药典》(2015 版)中将吴茱萸碱和吴茱萸次碱作为控制吴茱萸药材的指标^[7],但吴茱萸碱不稳定^[8],在一定条件下可转化为吴茱萸次碱^[9]。因此,本研究以扶正平消胶囊中比重最大的药材之一吴茱萸作为研究对象,用 HPLC 法测定吴茱萸次碱的含量作为指标。

3.2 紫外检测波长的确定

以往文献报道中,吴茱萸次碱在 225 nm 处有较大吸收^[4,8,9],但本研究中,如果选择 225 nm 为波长,出峰处有较大干扰,选择 240 nm 作为检测波长时,无干扰峰,峰面积较大,分离度良好,满足含量测定要求。

3.3 前处理方法的优化

吴茱萸次碱为脂溶性成分,笔者尝试了多种溶剂对样品进行提取,比如氯仿、甲醇、乙腈提取,但在进样分析过程中对吴茱萸次碱均存在干扰峰或提取回收率较低,无法满足分析要求。用乙酸乙酯萃取法对样品进行前处理,吴茱萸次碱的加样回收率可以达到 94.20%,证明此提取方法回收率良好。

3.4 流动相的选择

本实验尝试多种流动相对样品进行分离,包括甲醇-磷酸、乙腈-磷酸二氢钾、乙腈-磷酸二氢钾-四氢呋喃等,综合考虑吴茱萸次碱的分离程度、杂质峰干扰、保留时间、峰形、理论塔板数、拖尾因子等因素,最后确定以乙腈-四氢呋喃甲酸水溶液(2% 四氢呋喃+0.2% 甲酸)(35:65)为流动相梯度洗脱最佳。

3.5 方法的适用性

以往文献报道中,吴茱萸次碱的含量测定方法无法满足本研究要求,笔者对样品提取条件、紫外检测波长及流动相组成进行多次优化,达到测定要求。本方法精密度高,重复性好,为制订扶正平消胶囊质量控制标准提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] 郭 惠, 杨云云, 余大领, 等. 吴茱萸次碱的合成、结构表征及体内抗肿瘤作用研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(10): 37-40.
- [2] 郭 惠, 王珍珍, 杨 琦, 等. 吴茱萸次碱对三种肿瘤细胞体外增殖抑制作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(5): 44-47.
- [3] Kim SI, Lee SH, Lee ES, et al. New topoisomerase inhibitors: synthesis of rutaecarpine derivatives and their inhibitory activity against topoisomerase [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(5): 785-9.
- [4] 段朝辉, 张红梅, 朱恩圆, 等. 吴茱萸质量标准研究——TLC 指纹图谱鉴别及 HPLC 测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量[J]. 上海中医药杂志, 2008, 5: 86-88.
- [5] 朱坤福. 薄层扫描法测定吴茱萸颗粒剂中吴茱萸次碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2003, 6: 337-338.
- [6] 鄢良春, 李 波, 华 桦, 等. 液相色谱-质谱法同时测定吴茱萸水提物中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量[J]. 世界中医药, 2014, 2: 141-144.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 171.
- [8] 史万忠, 李世芳, 刘 瑾, 等. 复方灵通胶囊稳定性试验中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量变化[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1356-1360.
- [9] 周 宾. HPLC 测定左金丸中吴茱萸次碱的含量[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 23(3): 34-35.

【收稿日期】 2017-05-24 【修回日期】 2018-03-12

【本文编辑】 陈盛新