black-headed gulls [J]. J Virol, 2005, 79(5): 2814 - 2822.
[4] Subbarao K, Klimov A, Katz J, *et al*. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness [J]. Science, 1998, 279(5349): 393 - 396.
[5] Soubies S M, Volmer C, Croville G, *et al*. Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence [J]. J Virol, 2010, 84(13): 6733 - 6747.
[6] Spesock A, Malur M, Hossain M J, *et al*. The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins [J]. J Virol, 2011, 85(14): 7048 - 7058.
[7] Sarkar M, Chanda S, Chakrabarti S, *et al*. Surveillance in Eastern India (2007-2009) revealed reassortment event involving NS and PB1-F2 gene segments among co-circulating influenza A subtypes[J]. Virol J, 2012, 9: 3.
[8] Lin D, Lan J, Zhang Z. Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007, 39(3): 155 - 162.
[9] 李观强, 张志珍, 李国明. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白表达影响因素分析[J]. 中国热带医学, 2012, 12(1): 1 - 5.
[10] 李观强, 李国明, 张志珍. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白研究进展[J]. 医学检验与临床, 2011, 22(3): 56 - 57, 79.
[11] 张志珍, 段炼, 李康生. 华南流感病毒 NS1 基因特性研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(3): 237 - 243.
[12] Xu K M, Li K S, Smith G J, *et al*. Evolution and molecular epidemiology of H9N2 influenza A viruses from quail in southern China, 2000 to 2005 [J]. J Virol, 2007, 81(6): 2635 - 2645.
[13] Montano R F, Penichet M L, Blackall D P, *et al*. Recombinant polymeric IgG anti-Rh: a novel strategy for development of direct agglutinating reagents[J]. J Immunol Methods, 2009, 340(1): 1 - 10.

(**收稿**:2012-01-12;**修回**:2012-04-05)
(编辑 汪勤俭)

技术方法

文章编号:1000-5404(2012)16-1694-02

HPLC 法测定活络镇痛胶囊中欧前胡素的含量

孙 燕 (100071 北京,解放军第307医院药学部)

[**摘要**] **目的** 建立测定活络镇痛胶囊中欧前胡素含量的高效液相色谱法。**方法** 采用 Diamonsil™ C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(55∶45);检测波长:300 nm;流速:1.0 ml/min。**结果** 欧前胡素在 0.120 ~ 0.600 μg 范围内呈良好线性关系(r=0.999 9);欧前胡素平均回收率 98.11%,RSD 为 0.93%(n=6);重现性较好:6 次测定结果平均值为 0.182 mg/粒,RSD 为 1.68%;精密度和稳定性的相对标准偏差 RSD 分别为 0.09% 和 0.51%。**结论** 高效液相色谱法操作简便,重现性好,结果准确可靠,适用于该药的质量控制。

[**关键词**] 活络镇痛胶囊;HPLC;欧前胡素;含量测定
[**中图法分类号**] R283.65;R284.1 [**文献标志码**] B

活络镇痛胶囊是由《部标》WS3-B-2959-98 活络镇痛片[1]改变剂型而来,处方由天南星、红花、防风、白芷、当归5味药组成,具有舒筋活血、消瘀止痛功能。用于闪腰岔气,淤血作痛,筋骨疼痛,腰痛、腿痛,疗效确切,与片剂相比,胶囊具有崩解快、生物利用度高的优点。故我们在工艺考察对比的基础上,将其制成了胶囊剂,原片剂的质量标准仅有鉴别方法,未建立含量测定项目,不能有效对其进行质量控制。方中白芷为其主要成分,欧前胡素为白芷药材中的主要有效成分,研究报道其对酪氨酸酶活性具有抑制作用,进而抑制皮肤黑色素的生成[2]。本研究在分析处方和文献[3 - 4]的基础上,建立了方中白芷主要成分欧前胡素的高效液相色谱测定方法,操作简便,结果准确,可用于本品的质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

SP8010 液相色谱仪(SP8010 泵,SP1200 紫外检测器):美国物理光谱公司,SePu3000 色谱工作站。欧前胡素对照品(110844-200003,供含量测定),购自中国药品生物制品鉴定所,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。3 批样品制剂室自制。

1.2 方法

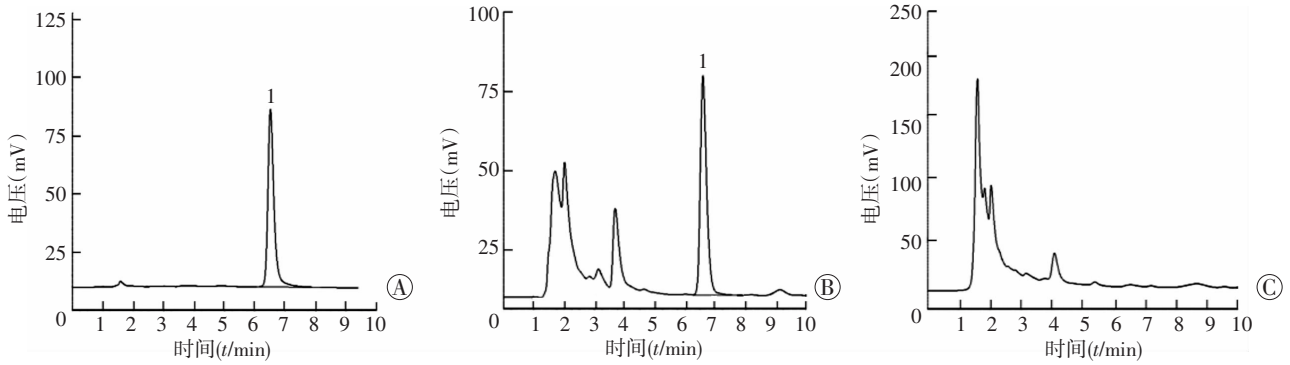
1.2.1 色谱条件 色谱柱 DiamonsiL™ C_{18}(5 μm,150 mm × 4.6 mm),流动相:甲醇-水(55∶45);流速:1.0 ml/min;检测波长为 300 nm;柱温:室温;欧前胡素色谱峰理论板数:4 166;对照品、供试品、空白色谱图见图1。

1.2.2 对照品溶液的制备 精密称取欧前胡素对照品,加甲醇制成每毫升含 20 μg 的溶液。

1.2.3 测定波长的选择 采用紫外分光光度计,将对照品溶液在波长 200 ~ 400 nm 范围内进行光谱扫描,结果最大吸收波长为 300 nm,故确定测定波长为 300 nm。

1.2.4 提取完全性实验 取本品装量差异项下的内容物,研细,混匀,取 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 ml,密塞,称定质量,分别超声(功率 300 W,频率 50 kHz)处理 10、20、30、40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,进样测定,结果欧前胡素含量分别为 0.10、0.12、0.17、0.17 mg/粒。说明超声处理 30 min 就提取完全,故确定提取时间为 30 min。

[**通信作者**] 孙 燕,E-mail:sylx1978615@sohu.com



A:对照品;B:供试品;C:空白;1:欧前胡素

图1 不同样品HPLC色谱图

2 结果

2.1 线性考察

精密吸取对照品浓度为20 μg/ml的溶液2、4、6、8、10 μl进样,以欧前胡素进样量(μg)作横坐标(X),以欧前胡素峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,并对所测得的数据进行回归分析,回归方程为Y=2 881 547.62 X-117 811.80,相关系数r=0.999 9。说明欧前胡素在0.120~0.600 μg范围内有良好的线性关系。

2.2 精密度实验

取供试品溶液,各连续进样6针(各10 μl),分别测定欧前胡素峰面积积分值,结果其相对标准偏差RSD为0.09%。

2.3 稳定性实验

取同一供试品溶液,分别于0、2、4、6、8 h各测定1次,每次进样10 μl,分别测定欧前胡素峰面积积分值,结果其相对标准偏差RSD分别为0.51%,表明在8 h内测定稳定性较好。

2.4 重复性实验

取同一批号的样品(100201)6份,照供试品溶液制备方法制备供试品溶液,分别取10 μl进样,在1.2.1中色谱条件下分别测定,计算样品中的含量,6次测定结果平均值为0.182 mg/粒,RSD为1.68%。

2.5 加样回收率实验

取已知含量的样品(100201,0.182 mg/粒)10粒,倾出内容物,精密称定,研细,取适量,精密称定,精密加入欧前胡素对照品适量,照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按1.2.1中色谱条件及测定方法进行测定,按下列公式计算回收率,回收率=(测得欧前胡素量-样品中欧前胡素量)/加入欧前胡素的量×100%,结果平均回收率为98.11%,RSD为0.93%(n=6)。

2.6 样品含量测定

采用外标法对3批中试样品进行测定,结果3批样品的含量分别为:100201:0.182 mg/粒;100202:0.178 mg/粒;100203:0.164 mg/粒。

3 讨论

本研究采用高效液相色谱法对其方中主药白芷中指标成分欧前胡素进行含量测定,方法操作简便,回收率高,分离度高,无阴性干扰,结果准确,方法可靠。本品制备工艺中白芷粉碎成细粉(五号筛,80目)入药,通过超声(功率300 W,频率50 kHz)处理不同时间(10、20、30、40 min)欧前胡素的提取率分别为0.10、0.12、0.17、0.17 mg/粒,超声提取30 min即可提取完全,故确定本品供试品溶液制备过程中,超声提取时间为30 min。而《中国药典》2010年版白芷药材含量测定[2],采用过三号筛(50目)药粉,超声提取1 h(功率300 W,频率50 kHz),超声过程会产热,而欧前胡素对热不稳定[5],时间过长,易造成溶剂挥发和成分的破坏,一般不宜太长时间的超声,药典样品处理方法有待进一步考察。实验过程中发现,欧前胡素对照品溶液对热不稳定,最好临用即配,短时间内最好放置冰箱中保存。流动相的选择参考文献[6]比较了甲醇-水(60∶40)和甲醇-水(55∶45),结果前者分离不理想,后者欧前胡素与其他杂质峰分离良好,无阴性干扰,可准确测定该制剂的欧前胡素的含量。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部. [WS3-B-2959-98]. 活络镇痛片[S]//卫生部药品标准·中药成方制剂第十五册. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2005: 51.

[2] 胡大强, 侯丽娜, 傅若秋, 等. 白芷提取分离物体外对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 中国药师, 2012, 15(4): 457-459.

[3] 候媛芳, 高幼衡, 刘沙, 等. 鼻炎片中欧前胡素含量测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(9): 54-55.

[4] 李爱婷, 汤迎爽. 高效液相色谱法测定脑血栓胶囊中芍药苷的含量[J]. 现代中医药, 2007, 27(5): 78-79.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 97-98.

[6] 程艳芹. HPLC法测定腰息痛胶囊中欧前胡素的含量[J]. 中药材, 2006, 29(3): 302-303.

(**收稿**:2012-03-29;**修回**:2012-05-02)

(编辑 张 维)