

HPLC法同时测定经痛舒颗粒中3种单酯型生物碱的含量

王超群^{1*}, 翟宏焱², 朱玉¹, 王晓华^{1#} (1.安徽省医学科学研究院, 合肥 230061; 2.安徽省食品药品检验院, 合肥 230051)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1250-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.35

摘要 目的:建立同时测定经痛舒颗粒中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Shimadzu C₁₈,流动相为乙腈-四氢呋喃(25:15, V/V)-0.1 mol/L 醋酸铵溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为235 nm,柱温为35 ℃。结果:苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的进样量分别在0.371 4~2.228 4、0.041 8~0.251 0、0.074 2~0.445 3 μg范围内与峰面积呈良好的线性关系(*r*分别为0.999 9、0.999 6、0.999 8);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均<2%;平均加样回收率分别为97.8%、98.2%、98.0%,RSD分别为2.1%、1.7%、2.2%(*n*=6)。结论:该方法操作简便,结果准确可靠,可作为经痛舒颗粒中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量测定方法。

关键词 经痛舒颗粒;单酯型生物碱;高效液相色谱法;苯甲酰新乌头原碱;苯甲酰乌头原碱;苯甲酰次乌头原碱

Content Determination of 3 Kinds of Monoester Aconitum Alkaloids in Jingtongshu Granules by HPLC

WANG Chao-qun¹, ZHAI Hong-yan², ZHU Yu¹, WANG Xiao-hua¹ (1.Anhui Provincial Academy of Medical Sciences, Hefei 230061, China; 2.Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of benzoylmesaconine, benzoylaconitine and benzoylhypaconitine in Jingtongshu granules. METHODS: HPLC method was adopted. The Shimadzu C₁₈ column was used with the mobile phase of acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15, V/V)-0.1 mol/L ammonium acetate solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was 235 nm with column temperature at 35 ℃. RESULTS: There was a good linear relationship between the volume of benzoylmesaconine and peak area in the range of 0.371 4-2.228 4 μg(*r*=0.999 9), benzoylaconitine in the range of 0.041 8-0.251 0 μg(*r*=0.999 6) and benzoylhypaconitine in the range of 0.074 2-0.445 3 μg(*r*=0.999 8). RSDs of precision, repeatability, stability tests was all less than 2%, and the average recovery was 97.8% (RSD=2.1%), 98.2% (RSD=1.7%) and 98.0% (RSD=2.2%) (*n*=6), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, rapid and can be used for the content determination of benzoylmesaconine, benzoylaconitine and benzoylhypaconitine in Jingtongshu granules.

KEYWORDS Jingtongshu granules; Monoester aconitum alkaloids; HPLC; Benzoylmesaconine; Benzoylaconitine; Benzoylhypaconitine

经痛舒颗粒是根据名老中医经验方研制的中药复方新制剂,主治寒凝滞所致的经前或经行小腹冷痛等。经痛舒颗粒由附子(制)、当归等11味药组成。其中,附子是方中君药,其味甘,性微辛,大热,有毒,归心、肾、脾经,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛之功效^[1]。经痛舒颗粒中使用的附子为其炮制品,通过炮制可使有毒成分乌头碱类双酯型生物碱(即新乌头碱、乌头碱、次乌头碱)转化为毒性相对较低的单酯型生

物碱(即苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱)^[2]。为控制经痛舒颗粒的产品质量,本研究建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定经痛舒颗粒中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD型HPLC仪,配有SPD-M20A检测器、LC

示,布渣叶的4种溶剂浸泡液的紫外光谱谱线均有明显的特征;且不同来源的布渣叶各溶剂浸泡液的紫外吸收谱图中峰形、吸收峰数目及峰值基本相同。

综上所述,该法简便、可靠,可用于布渣叶药材的鉴别和可为其质量控制提供参考,并在一定程度上丰富了中药布渣叶的鉴别方法。

参考文献

* 助理研究员。研究方向:中药质量分析方法。电话:0551-62828461。E-mail:50780339@qq.com

通信作者:研究员,硕士生导师。研究方向:天然药物及分析方法。电话:0551-62823664。E-mail:1210wxh@sina.com

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:88-89.
- [2] 袁久荣.中药鉴别紫外谱线组法及应用[M].北京:人民卫生出版社,1999:80.
- [3] 曾聪彦,林铿.布渣叶的薄层色谱鉴别研究[J].中国民族民间医药,2009,18(22):14.
- [4] 孙冬梅,谭志灿,毕晓黎,等.布渣叶的薄层色谱鉴别及红外光谱分析[J].中国药业,2012,21(12):15.
- [5] 李智勇.太白洋参的紫外谱线组法鉴别研究[J].时珍国医国药,2008,19(6):1311.

(收稿日期:2014-11-04 修回日期:2015-01-04)

(编辑:孙冰)

solution 色谱数据工作站、CTO-20A 柱温箱和 SIL-20AC 自动进样阀(日本岛津公司);XP56 型百万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);SB2200-T 型超声波清洗器(上海奥特赛恩斯仪器公司);万分之一电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

经痛舒颗粒(广州四知堂医药科技有限公司,批号:130101、130102、130103);苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱对照品(批号分别为111795-200901、111794-201102、111796-201002,纯度分别为99.6%、96.5%、97.3%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-四氢呋喃(25:15, V/V)为流动相A, 0.1 mol/L 醋酸铵溶液(每1 000 ml 加冰醋酸0.5 ml)为流动相B, 梯度洗脱(0~48 min, 15%→26% A; 48~49 min, 26%→35% A; 49~58 min, 35% A; 58~65 min, 35%→15% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:235 nm;柱温:35 ℃。色谱见图1。

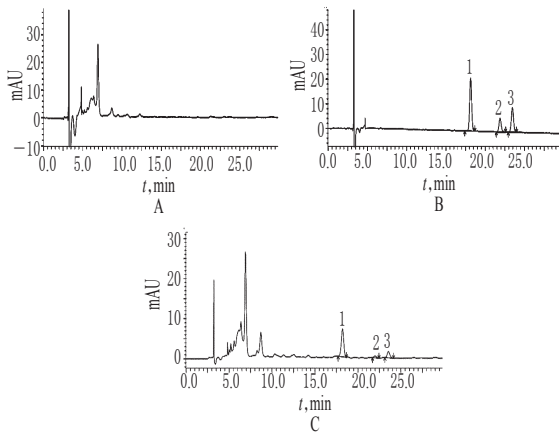


图1 高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 混合对照品; C. 供试品; 1. 苯甲酰新乌头原碱; 2. 苯甲酰乌头原碱; 3. 苯甲酰次乌头原碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. negative control; B. mixed control; C. test samples; 1. benzoylmesaconine; 2. benzoylaconitine; 3. benzoylhypaconitine

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对照品各适量,分别加乙腈定容至10 ml 量瓶中,测得质量浓度分别为371.4、41.8、74.2 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取经痛舒颗粒10 g, 研细, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇100 ml, 超声(功率:300 W, 频率:50 kHz)处理30 min, 滤过; 残渣用甲醇洗涤2次, 滤过, 合并滤液, 挥干溶剂, 残渣加0.05 mol/L 硫酸溶液20 ml 溶解, 并转移至分液漏斗中, 以氯仿振荡提取2次, 每次25 ml, 弃去氯仿液, 酸水液用氨水调pH至10, 摇匀, 以氯仿振荡提取4次, 每次20 ml; 合并氯仿液, 加水50 ml 振荡洗涤, 弃去水液, 氯仿液置于水浴锅上蒸干, 残渣加乙腈使溶解, 并定容至2 ml 量瓶中, 经0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按经痛舒颗粒的制备工艺制备缺附子的阴性样品, 按“2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.5 线性关系考察

精密吸取上述混合对照品溶液1、2、3、4、5、6 μl, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以对照品的进样量(x, μg)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得苯甲酰新乌头原碱的回归方程为 $y=1\ 309\ 897.2x-7\ 615.4$ ($r=0.999\ 9$), 线性范围为0.371 4~2.228 4 μg; 苯甲酰乌头原碱的回归方程为 $y=1\ 219\ 167.0x-518.6$ ($r=0.999\ 6$), 线性范围为0.041 84~0.251 0 μg; 苯甲酰次乌头原碱的回归方程为 $y=1\ 259\ 008.4x+2\ 304.1$ ($r=0.999\ 8$), 线性范围为0.074 22~0.445 3 μg。结果表明, 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱与苯甲酰次乌头原碱的进样量均在各自范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液3 μl, 按“2.1”项下色谱条件连续进样6次, 记录峰面积。结果, 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积的RSD依次为0.48%、0.52%、0.62% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液各10 μl, 分别于0、2、4、6、8、12 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积的RSD分别为1.47%、1.90%、1.80% ($n=6$), 表明供试品溶液在12 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批经痛舒颗粒(批号:130102)适量, 共6份, 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样10 μl, 记录峰面积, 并计算样品含量。结果, 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的平均含量分别为13.34、1.02、3.16 μg/g, RSD分别为1.64%、1.78%、1.90%, 表明该方法重复性较好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的经痛舒颗粒(批号:130102)共6份, 每份5 g, 精密称定, 分别精密加入苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对照品各适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率, 结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Result of recovery test ($n=6$)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
苯甲酰新乌头原碱	67.13	61.9	129.48	100.7	97.8	2.1
	66.82	61.9	126.86	97.0		
	68.47	61.9	130.16	99.7		
	67.76	61.9	127.56	96.6		
	66.69	61.9	125.68	95.3		
	66.72	61.9	127.29	97.9		
苯甲酰乌头原碱	5.13	5.24	10.32	99.0	98.2	1.7
	5.11	5.24	10.25	98.1		
	5.24	5.24	10.42	98.9		
	5.18	5.24	10.19	95.6		
	5.1	5.24	10.36	100.4		
	5.1	5.24	10.18	96.9		
苯甲酰次乌头原碱	15.9	12.37	28.12	98.8	98.0	2.2
	15.83	12.37	27.75	96.4		
	16.22	12.37	28.75	101.3		
	16.05	12.37	28.18	98.1		
	15.8	12.37	27.57	95.1		
	15.8	12.37	27.96	98.3		

2.10 样品含量测定

盐酸左布比卡因及其注射剂细菌内毒素检查方法的建立

于海洲^{1*},代秀梅²,于风平^{2#},都婧³(1.烟台市食品药品监督管理局检验检测中心,山东烟台 264000;2.淄博市食品药品监督管理局检验所,山东淄博 255086;3.烟台市烟台山医院检验科,山东烟台 264000)

中图分类号 R927.12 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1252-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.36

摘要 目的:建立盐酸左布比卡因及其注射剂细菌内毒素的检查方法。方法:按2010年版《中国药典》(二部)附录细菌内毒素检查法的要求,通过干扰试验确定样品最大不干扰质量浓度,并进行方法学验证。结果:样品的质量浓度为1.56 mg/ml($\lambda=0.25$ EU/ml)时对鲎试剂与细菌内毒素之间的凝集反应无干扰;样品的细菌内毒素限值确定为0.08 EU/mg。结论:所建立的方法可用于盐酸左布比卡因及其注射剂的细菌内毒素检查。

关键词 盐酸左布比卡因;注射剂;细菌内毒素检查;干扰试验

Establishment of Endotoxins Test Method of Levobupivacaine Hydrochloride and Its Injection

YU Hai-zhou¹, DAI Xiu-mei², YU Feng-ping², DU Jing³(1.Yantai Municipal Food and Drug Inspection and Testing Center, Shandong Yantai 264000, China; 2.Zibo Institute for Food and Drug Control, Shandong Zibo 255086, China; 3.Dept. of Laboratory, Yantaishan Hospital of Yantai City, Shandong Yantai 264000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the detection of endotoxins in Levobupivacaine hydrochloride (LH) and its injection. METHODS: According to the requirements of 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (second part) bacterial endotoxin inspection, the largest noninterfere quality concentration of samples was determined by interfering test with and method validation. RESULTS: There was no interference in the endotoxins test when the concentration of LH was 1.56 mg/ml (λ of TAL was 0.25 EU/ml). The limitation of endotoxins was 0.08 EU/mg. CONCLUSIONS: The established method is feasible for the endotoxins test of LH and its injection.

KEYWORDS Levobupivacaine hydrochloride; Injection; Endotoxins test; Interference experiment

取3个批次的经痛舒颗粒各适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件下进样10 μ l,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3, \mu\text{g/g}$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=3, \mu\text{g/g}$)

批号	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱
130101	13.66	0.94	3.12
130102	13.34	1.02	3.16
130103	13.58	0.98	3.11

3 讨论

研究表明,附子经过炮制,其中的双酯型生物碱(新乌头碱、乌头碱、次乌头碱)会水解成苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱等单酯型生物碱,使其毒性大大降低,提高了临床应用的安全性^[9]。然而,目前报道的用于附子中生物碱含量测定的HPLC方法大都集中于双酯型生物碱^[4],而对于单酯型生物碱的含量测定鲜有报道。

本研究参照有关文献^[5-7]的提取方法,对异丙醇-乙酸乙酯(1:1, V/V)与甲醇两种溶媒的提取率进行了比较。结果表明,甲醇的提取率优于异丙醇-乙酸乙酯(1:1, V/V)。由于本研究中的3种单酯型生物碱的化学结构相似、极性相似,在色谱柱

上的保留时间比较接近,因此在进行梯度洗脱时,需缩小梯度变化范围,使洗脱时间延长,以达到良好的分离效果。

综上所述,该方法操作简单,结果准确可靠,可作为经痛舒颗粒中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量测定方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 177.
- [2] 邓江, 龙丽娜, 杜方麓. 市售乌头炮制品种中的乌头总碱、酯型生物碱、乌头碱的含量检查[J]. 中成药, 2007, 29(12): 附14.
- [3] 陈东安, 易进海, 黄志芳, 等. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 64.
- [4] 王瑞, 刘芳, 孙毅坤, 等. 不同附子炮制品中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱含量的HPLC测定[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(10): 1361.
- [5] 邵峰, 俞瑜, 任刚. HPLC法同时测定附子理中丸中3种单酯型生物碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 57.
- [6] 孙兰, 周海燕, 赵润怀, 等. HPLC法同时测定附子中6种单酯和双酯型生物碱[J]. 中草药, 2009, 40(1): 131.
- [7] 侯大斌, 赵祥升. 不同样品制备方法对RP-HPLC法测定附子生物碱含量的影响[J]. 中国药房, 2010, 21(19): 1763.

(收稿日期:2014-02-27 修回日期:2014-05-10)

(编辑:孙冰)

* 主管药师。研究方向:药物质量控制与分析。电话:0535-6243276-8007。E-mail: haizhou_aa@sina.com

通信作者:副主任药师。研究方向:药物质量控制与分析。电话:0533-7866119。E-mail: yfplover@sina.com