

RP-HPLC法同时测定盐酸阿普林定片的含量和有关物质

王昕*,唐素芳,王卫(天津市药品检验所,天津 300070)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0842-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.43

摘要 目的:建立同时测定盐酸阿普林定片含量及有关物质的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamonsil C₁₈,流动相为甲醇-水-10%四丁基氢氧化铵溶液(40:60:2,V/V/V,用磷酸调节pH至3.0),流速为1.0 ml/min,检测波长为258 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:盐酸阿普林定质量浓度在25.55~204.40 μg/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.9994$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.6%;平均回收率为100.1%,RSD=0.5%($n=9$);杂质总量≤0.84%。结论:本方法简便、准确、专属性好、灵敏度高,可用于盐酸阿普林定片的质量控制。

关键词 盐酸阿普林定片;含量测定;有关物质;反相高效液相色谱法

Content Determination of Aprindine Hydrochloride Tablets and Its Related Substances by RP-HPLC

WANG Xin, TANG Su-fang, WANG Wei (Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the content determination of Aprindine hydrochloride tablets and its related substances. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Dikma Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water-10% tetrabutyl ammonium hydroxide (40:60:2.0, V/V/V, adjusted to 3.0 using phosphoric acid) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 258 nm, and column temperature was 30 ℃. Sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of aprindine hydrochloride were 25.55-204.40 μg/ml ($r=0.9994$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 0.6%; the average recovery was 100.1% (RSD=0.5%, $n=9$); the total amount of impurities was lower than 0.84%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, specific and sensitive, and can be used for quality control of Aprindine hydrochloride tablets.

KEYWORDS Aprindine hydrochloride tablets; Content determination; Related substances; RP-HPLC

验的提取溶剂。

表4 血尿安片剂样品含量测定结果($n=2$, mg/g)

Tab 4 Results of content determination of Xueniao' tablets sample($n=2$, mg/g)

批号	盐酸小檗碱
110901	12.43
111101	12.17
111102	13.02
110401	12.32

3.2 超声提取时间的考察

在现行标准中两种剂型均采用超声提取,其中胶囊提取10 min,片剂提取30 min。在确定溶剂后,对不同超声提取时间10、20、30、40、50、60 min(功率:250 W,频率:40 kHz)进行考察,结果超声40 min与50 min差别不大,超声60 min能够较完全地提取出制剂中的盐酸小檗碱。但由于时间过长,因而参照2010年版《中国药典》“黄柏”的超声提取操作,选定40 min作为本试验的超声提取时间。

3.3 流动相的选择

在现行标准中,胶囊的流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液[0.05 mol/L 磷酸二氢钾和0.05 mol/L 庚烷磺酸钠(1:1)](30:70, V/V),含0.2%三乙胺,用磷酸调节pH至3.0;片剂的流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调节pH至3.0)(32:

68, V/V)。两者流动相配制复杂、烦琐,故本试验对流动相进行了优化:加入十二烷基磺酸钠离子对试剂^[6],选择乙腈-0.1%磷酸溶液(每100 ml加十二烷基磺酸钠0.1 g)(45:55, V/V)为流动相。使流动相的配制更简便、快捷,且所测成分盐酸小檗碱的色谱峰形、分离度及保留时间均能得到满意的结果。

综上所述,本试验建立的测定方法同时适用于血尿安胶囊和片剂两种剂型的含量测定,且该方法简便、准确、高效,为血尿安制剂的质量控制标准的统一、提高提供了科学依据。

参考文献

- [1] 张倩,蔡丽芬,钟国跃. RP-HPLC法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2061.
- [2] 钟祥,李应东. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(3): 185.
- [3] 罗懿妮,赖宇红,薛巧如,等. 盐酸小檗碱RP-HPLC测定条件的比较[J]. 中药材, 2004, 27(9): 647.
- [4] 郭洛宏. HPLC法测定三黄片中盐酸小檗碱、大黄素和大黄酚含量的结果分析[J]. 中国药房, 2011, 22(40): 3824.
- [5] 李红玲,莫炫永. HPLC法同时测定川黄柏中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(27): 2562.
- [6] 叶秀金,宋粉云. HPLC测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 90.

(收稿日期:2014-10-31 修回日期:2015-01-09)

(编辑:周 箐)

* 副主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:022-23374074。

E-mail:sunshinexin909@sina.com

盐酸阿普林定片收载于《国家药品标准》化学药品地方标准上升国家标准第七册,标准号为WS-10001-(HD-0655)-2002,国外药典未收载。原标准采用紫外分光光度法测定该药的含量,辅料干扰为2.3%,但未收载有关物质测定方法^[1]。笔者根据2010年版《中国药典》^[2]的相关规定,并参考有关文献^[3-6],建立了以反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定盐酸阿普林定片的含量和有关物质的方法,旨在为其质量控制提供参考。

1 材料

1200型高效液相色谱仪,包括G1311A四元梯度泵、G1329A自动进样器、ChemStation色谱工作站、SPD-20A紫外检测器(美国Agilent公司);AE-240型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);AS 10200A型超声仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

盐酸阿普林定对照品(天津市某药厂,批号:120305,纯度:99.6%);盐酸阿普林定片(天津市某药厂,批号:120801、120802、120803,规格:25 mg);四丁基氢氧化铵为分析纯,甲醇为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-10%四丁基氢氧化铵溶液(40:60:2,V/V/V,用磷酸调节pH至3.0);流速:1.0 ml/min;检测波长:258 nm;柱温:30℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取盐酸阿普林定对照品适量,加入流动相溶解并稀释制成每1 ml中含0.1 mg盐酸阿普林定的溶液,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品20片,精密称定,研细,精密称取细粉适量(约相当于盐酸阿普林定10 mg),置于100 ml量瓶中,加入流动相,超声(功率:100 W,频率:40 kHz)处理10 min,溶解,加入流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 空白对照溶液 按处方比例制备不含主成分的空白样品,按“2.2.2”项下方法操作,即得空白对照溶液。

2.2.4 破坏性试验贮备液 取本品细粉适量(约相当盐酸阿普林定0.1 g),精密称定,置于10 ml量瓶中,加入流动相适量,振荡使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得破坏性试验贮备液。

2.3 专属性试验

2.3.1 空白对照干扰试验 取“2.2”项下供试品和空白对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可见,空白对照不干扰主成分和有关物质的测定。

2.3.2 破坏试验 (1)酸破坏:取“2.2.4”项下贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加入1 mol/L盐酸溶液1 ml,放置2 h,用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至中性,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用;(2)碱破坏:取“2.2.4”项下贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加入1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,放置2 h,用1 mol/L盐酸溶液调节pH至中性,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用;(3)氧化破坏:取“2.2.4”项下贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加入30%过氧化氢溶液1 ml,放置2 h,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用;(4)高温破坏:取“2.2.4”项下贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加入流动相5 ml,置于水浴中加热30 min,放冷至室温后,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用;(5)光照破坏:取“2.2.4”项

下贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,置于4 500 lx下光照48 h,加入流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。精密量取上述5种溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱至主峰保留时间的2倍,详见图1。由图1可见,在强酸、强碱、氧化破坏条件下,供试品溶液检出杂质峰个数及杂质质量均有不同程度的增加,且各杂质峰与主峰均可达到基线分离,分离度均≥1.5。

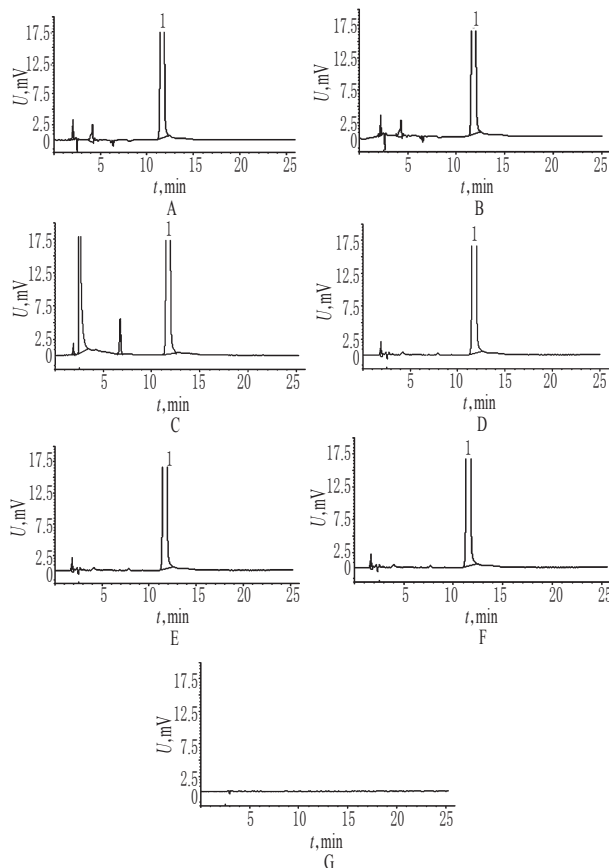


图1 专属性试验高效液相色谱图

A.酸破坏样品;B.碱破坏样品;C.氧化破坏样品;D.光照破坏样品;E.高温破坏样品;F.未破坏样品;G.空白对照;1.盐酸阿普林定

Fig 1 HPLC chromatograms of specification test

A.sample destroyed by acid; B.sample destroyed by alkali; C.sample destroyed by oxidation; D.sample destroyed by light; E.sample destroyed by heat; F.undestroyed sample; G.blank control; 1.apripidine hydrochloride

2.4 线性关系考察

精密称取盐酸阿普林定对照品102.2 mg,置于100 ml量瓶中,加入流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取上述溶液各适量,加入流动相稀释制成约25、50、100、150、200 μg/ml的系列浓度溶液。精密量取上述溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。以盐酸阿普林定质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $y=4.68x-11.84$ ($r=0.9994$)。结果表明,盐酸阿普林定质量浓度在25.55~204.40 μg/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 检测限和定量限

取盐酸阿普林定对照品适量,精密称定,加入流动相稀释配制成0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μg/ml的系列溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。以信噪比为3计算得盐酸阿普林

定的检测限为4 ng;以信噪比为10计算得盐酸阿普林定的定量限为10 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样5次。结果,盐酸阿普林定峰面积的RSD=0.2%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:120801)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12 h时进样测定。结果,盐酸阿普林定峰面积的RSD=0.6%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取样品(批号:120801)细粉6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,盐酸阿普林定含量的RSD=0.3%,表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

按处方制备空白辅料,称取辅料约2片,置于50 ml量瓶中,加入流动相稀释至刻度,摇匀,作为辅料贮备液;另取盐酸阿普林定对照品约0.1 g,精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取辅料贮备液5 ml,共9份,分别置于50 ml量瓶中,精密加入对照品贮备液4.0、5.0、6.0 ml各3份,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,分别精密量取续滤液10 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
盐酸阿普林定	0.404	0.405	100.3	100.1	0.5
	0.404	0.404	100.2		
	0.404	0.407	100.8		
	0.505	0.505	100.2		
	0.505	0.503	99.7		
	0.505	0.508	100.7		
	0.605	0.604	99.8		
	0.605	0.601	99.3		
	0.605	0.608	100.4		

2.10 样品含量测定

精密量取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液各10 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,按外标法以峰面积计算含量,并将该结果与原标准记载方法的测定结果进行比较,详见表2。结果表明,笔者在试验前期采用紫外分光光度法测定的盐酸阿普林定含量高于RP-HPLC法测定的结果。

表2 样品含量测定结果($n=2$,%)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=2$,%)

批号	盐酸阿普林定	
	紫外分光光度法	RP-HPLC法
120801	102.3	100.2
120802	102.0	99.8
120803	101.7	99.2

2.11 样品有关物质测定

取样品研细,称取细粉适量,加入流动相溶解并稀释制成每1 ml中约含1.0 mg的溶液,滤过,取续滤液作为有关物质测定供试品溶液;精密量取上述供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加入流动相稀释至刻度,摇匀,作为有关物质测定的

对照溶液;精密量取上述对照溶液1 ml,置于10 ml量瓶中,加入流动相稀释至刻度,摇匀,作为灵敏度溶液。取上述灵敏度溶液10 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样,调节主成分色谱峰的信噪比不小于10;精密量取上述供试品溶液与对照溶液各10 μ l,分别注入HPLC仪,记录色谱至主成分色谱峰保留时间的2倍,按主成分自身对照法计算最大单个杂质和杂质总量,结果见表3。

表3 样品有关物质测定结果(%)

Tab 3 Results of the determination of related substances in samples(%)

批号	最大单个杂质	杂质总量
120801	0.36	0.83
120802	0.35	0.82
120803	0.36	0.84

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者比较了甲醇-水(调pH至酸性)、甲醇-水-三乙胺(调pH至酸性)、甲醇- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、甲醇- KH_2PO_4 和甲醇-庚烷磺酸钠为流动相时的色谱峰。结果发现,在非酸性流动相系统中,由于本品结构中的极性基团与色谱柱硅胶表面残留的硅羟基发生静电作用,使被测成分难以被洗脱,检测不到色谱峰;在酸性流动相系统中,虽然可以抑制硅羟基的电离、检出色谱峰,但峰形拖尾严重。笔者以甲醇-水-10%四丁基氢氧化铵溶液(40:60:X,X=0.5、1.0、1.5、2.0、2.5)为流动相进行比较,结果发现,四丁基氢氧化铵对主峰的保留时间影响不大,但可以明显改善主成分色谱峰形的对称性^[7]。当采用甲醇-水-10%四丁基氢氧化铵溶液(40:60:2,V/V/V)时,色谱峰对称性为最好。分别以磷酸调节流动相pH为2.0、2.5、3.0、3.5进行研究,结果发现,流动相的酸碱性对主成分色谱峰峰形及其保留时间均有较大影响。当流动相pH为3.0时,峰形对称性最好,且保留时间适宜。故本研究选择甲醇-水-10%四丁基氢氧化铵溶液(40:60:2,V/V/V,用磷酸调节pH至3.0)为流动相。

3.2 检测波长的选择

由色谱图可见,本品主成分和主要杂质分别在258 nm和254 nm波长处有最大吸收,因两波长相近,确定以主成分的最大吸收波长258 nm为本研究的检测波长。

3.3 与原标准测定方法的比较

原标准含量测定方法为紫外分光光度法,而本研究建立了以RP-HPLC法测定样品含量及有关物质的方法。结果表明,RP-HPLC法专属性更强、操作简单,可避免辅料吸收带来的误差;此外,原标准中对杂质未进行测定,而本研究建立的有关物质测定方法灵敏度高,可以精确测定杂质含量。

综上所述,本方法简便、准确、专属性好、灵敏度高,可用于盐酸阿普林定片的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第七册[S].2002:206.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:91.
- [3] 谢沐风.如何建立高效液相色谱法测定有关物质的方法[J].中国医药工业杂志,2007,38(1):45.
- [4] 谢沐风.高效液相色谱法测定含量时关于确立色谱条件与溶液浓度的讨论[J].中国药品标准,2008,9(4):288.
- [5] 金祥飞,沈卫阳,党柱,等.药物中有关物质的色谱分析研

ATR-FTIR 及人工神经网络分类法鉴别薏苡仁与伪品草珠子种仁

吕惠玲^{1*}, 万茶艳², 程存归²(1. 金华市中心医院药剂科, 浙江 金华 321000; 2. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0845-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.44

摘要 目的: 建立快速鉴别及评价薏苡仁及其伪品草珠子种仁的方法。方法: 采用衰减全反射傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)法测定薏苡仁与草珠子种仁的红外光谱, 选择4个特征吸收峰所对应的吸光度值作为特征向量, 建立人工神经网络(ANN)模型, 对不同薏苡仁与草珠子种仁样本所得红外光谱的特征向量进行分类。结果: 所建立的方法对薏苡仁与草珠子种仁的识别率均为100%。结论: 该方法判别准确度高, 可用于薏苡仁与草珠子种仁的快速鉴别。

关键词 薏苡仁; 草珠子种仁; 衰减全反射傅里叶变换红外光谱法; 人工神经网络; 鉴别

Identification between *Coicis Semen* and *Coix lachrymal-jobi* by ATR-FTIR and ANN Classification

LYU Hui-ling¹, WAN Cha-yan², CHENG Cun-gui²(1. Dept. of Pharmacy, Jinhua Municipal Central Hospital, Zhejiang Jinhua 321000, China; 2. College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Zhejiang Jinhua 321004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for rapid identification and evaluation of *Coicis Semen* and *Coix lachrymal-jobi*. METHODS: The infrared spectrum of *Coicis Semen* and *C. lachrymal-jobi* were identified by ATR-FTIR. Using absorbance value of 4 characteristic absorption peaks as feature vector, artificial neural network (ANN) model was established to classify feature vector of infrared spectrum of *Coicis Semen* and *C. lachrymal-jobi*. RESULTS: Established method was highly accurate, and the correct rates of *Coicis Semen* and *C. lachrymal-jobi* identification were both 100%. CONCLUSIONS: The method has high accuracy, and can be used for rapid identification of *Coicis Semen* and *C. lachrymal-jobi*.

KEYWORDS *Coicis Semen*; *Coix lachrymal-jobi*; ATR-FTIR; Artificial neural network; Identification

薏苡仁又名薏仁、苡米、苡仁、土玉米、薏米、起实、薏珠子、草珠珠、回回米、米仁、六谷子, 其性微寒, 味甘、淡, 具有利水消肿、健脾去湿、舒筋除痹、清热排脓等功效, 为常用利水渗湿药^[1]。同科属植物草珠子种仁的形态与薏苡仁相似, 为常见伪品^[2]。

傅里叶变换红外光谱(FTIR)法由于能给出复合体系的所有物质的信息, 因而在中药鉴别方面得到了较多的应用^[3-7]。由于同科属植物种子所含化学成分也较为相近, 采用一维红外光谱分析法较难得到理想的效果^[8]。本研究采用衰减全反射傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)法测定了中药材薏苡仁及其伪品草珠子种仁的红外光谱, 并尝试选择特征吸收峰所对应的吸光度构建特征矢量, 然后运用反向传播人工神经网络(ANN)进行分类, 以达到薏苡仁与草珠子种仁鉴别之目的。

1 材料

1.1 仪器

NEXUS 670 型 ATR-FTIR 仪, 包括 DTGS 检测器、金刚石

ATR、OMNIC E.S.P.5.1 智能操作软件(美国 Nicolet 公司)。

1.2 药材

所有样品均由浙江省金华市食品药品检定所中药科提供, 并经过该所李冰岚主任中药师及浙江师范大学生物系陈建华教授鉴定。薏苡仁为禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. 的干燥成熟种仁; 草珠子种仁为禾本科植物草珠子 *C. lachrymal-jobi* L. 的干燥成熟种仁。

2 方法

在采集数据前, 按仪器测试要求把金刚石 ATR 附件水平放置于 FTIR 仪的样品仓中, 分别取种仁样品适量在粉碎机中粉碎后, 混合均匀后再从中取少量置于玛瑙研钵上磨成细小均匀的粉末, 过 200 目筛, 测定样品的 FTIR。为了降低测定误差, 图谱基线采用自动校正法进行校正。光谱范围为 4 000~650 cm^{-1} , 分辨率为 2 cm^{-1} , 扫描累加次数为 32 次。从样品的 FTIR 图谱中选择 4 个特征吸收峰对应的吸光度值作为特征向量。在进行 ANN 识别时, 以薏苡仁和草珠子种仁的 FTIR 作为样本, 薏苡仁和草珠子种仁的训练数及预测样本数各选择

究近况[J]. 药学进展, 2009, 33(12):542.

[6] 杜薇, 邹巧根, 孙莉莉, 等. 色谱及其联用技术在药物杂质

* 中药师。研究方向: 中药质量分析。E-mail: 416078926@qq.com

分析中的应用[J]. 海峡药学, 2013, 25(5):1.

[7] 张立峰, 刘灿仿. 离子对 RP-HPLC 法测定利塞膦酸钠原料药及其制剂的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(41):3 912.

(收稿日期: 2014-07-25 修回日期: 2014-11-28)

(编辑: 陈宏)