

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.027

高效液相色谱法测定胃痛宁片中天仙子浸膏含量

马丽¹, 杨甲忠^{1△}, 孟珊², 张征¹, 杨爽¹

(1. 河北省承德市食品药品检验检测中心, 河北 承德 067101; 2. 河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 建立测定胃痛宁片中天仙子浸膏含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 SunFire C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B, 含0.02%的三乙胺), 梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 柱温为35℃, 检测波长为210 nm。结果 氢溴酸东莨菪碱和硫酸阿托品与相邻杂质峰均可以完全分离; 氢溴酸东莨菪碱和硫酸阿托品质量浓度分别在0.002 146~0.107 29 mg/mL和0.002 071~0.103 54 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为100.04%和98.91%, RSD分别为5.86%和5.54% (n=9)。结论 该法可有效测定胃痛宁片中天仙子浸膏的含量, 可为完善胃痛宁片质量标准提供参考。

关键词: 高效液相色谱法; 胃痛宁片; 天仙子浸膏; 氢溴酸东莨菪碱; 硫酸阿托品; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)05-0105-03

Content Determination of Hyoscyamus Niger Extract in Weitongning Tablets by HPLC

MA Li¹, YANG Jiazhong¹, MENG Shan², ZHANG Zheng¹, YANG Shuang¹

(1. Chengde Institute for Food and Drug Control, Chengde, Hebei, China 067101; 2. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050011)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the determination of Hyoscyamus Niger Extract in Weitongning Tablets. **Methods** SunFire C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used; mobile phase A was acetonitrile, mobile phase B was 0.1% phosphoric acid solution(containing 0.02% triethylamine), gradient elution; the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35℃ and the detection wavelength was 210 nm. **Results** Scopolamine hydrobromide and atropine sulfate were completely separated from adjacent impurity peaks; scopolamine hydrobromide showed a good linear relationship in the range of 0.002 146~0.107 29 mg/mL; atropine sulfate showed good linearity in the range of 0.002 071~0.103 54 mg/mL. The average recoveries were 100.04% and 98.91%, RSDs were 5.86% and 5.54% (n=9). **Conclusion** This method can effectively determine the content of Hyoscyamus Niger Extract in Weitongning Tablets, which provides a reference for the quality control of Weitongning Tablets.

Key words: high performance liquid chromatography; Weitongning Tablets; Hyoscyamus Niger Extract; scopolamine hydrobromide; atropine sulfate; content determination

天仙子为茄科 *Solanaceae* 植物莨菪 *Hyoscyamus-niger* L. 的干燥成熟种子, 最早收载于《神农本草经》, 性温, 味苦、辛, 有毒, 具有定痛、止痛功效, 常用于治疗癫狂、风痹厥痛、恶疮等症^[1]。从天仙子中分离出的托烷类生物碱(主要为莨菪碱和东莨菪碱)被认为是天仙子发挥治疗神经系统相关疾病的有效成分^[2-3], 但天仙子有毒, 属于慎用药物, 天仙子浸膏在该处方中每1 000片投料量较低(25 g), 又因其投料量少和主成分难分离提取等原因, 对天仙子主成分的含量测定一直是难点。本研究中参考文献[4-7], 采用75%乙醇多次超声提取、浓氨溶液转移、三氯甲烷超声提取后, 采用高效液相色谱(HPLC)梯度洗脱法成功建立了胃痛宁片中天仙子浸膏中主成分氢溴酸东莨菪碱和硫酸阿托品的含量测定方法^[8-12], 旨在为胃痛宁片质量标准的提升提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

Waters e2695型高效液相色谱仪(Waters 2489检测器, Empower 色谱工作站, 进样精度≤0.5% RSD, 波长准确度±1 nm, 美国沃特斯公司); Moli-Q Integral 水纯化系统(美国 Millipore 公司); XS105DU 电子天平(梅特勒-托利多公司, 感量0.01 mg); C9860A型超声

波清洗仪(天津科贝尔光电技术有限公司, 功率500 W, 40 kHz)。氢溴酸东莨菪碱对照品(批号为100049-201009, 供含量测定用, 含量91.7%), 硫酸阿托品对照品(批号为100040-201011, 供含量测定用, 含量96.5%), 均购自中国食品药品检定研究院; 胃痛宁(市售, 购于3个不同厂家, 共14批)。乙腈、甲醇均为色谱纯(德国默克 MERCK); 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

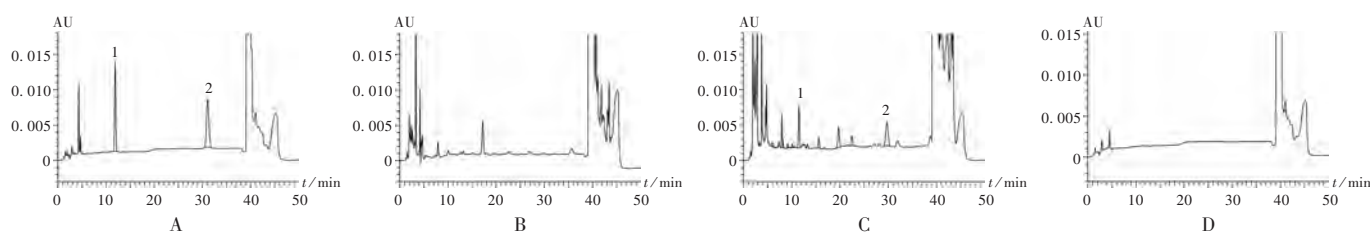
色谱柱: SunFire C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B, 含0.02%的三乙胺), 梯度洗脱(0~35 min时流动相A 6%, 35~40 min时流动相A 6%~30%, 40~50 min时流动相A 30%~6%, 50~55 min时流动相A 6%); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 35℃。在此条件下的色谱图见图1。氢溴酸东莨菪碱和硫酸阿托品与相邻杂质峰的分度分离度均大于1.5(东莨菪碱质量=氢溴酸东莨菪碱质量×0.7894; 莨菪碱质量=硫酸阿托品质量×0.8551)。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 分别取氢溴酸东莨菪碱对照品

第一作者: 马丽, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品、食品检验检测, (电子信箱)335643989@qq.com。

△通信作者: 杨甲忠, 男, 大学本科, 高级工程师, 研究方向为药品、食品检验检测, (电子信箱)41389619@qq.com。



1. 氢溴酸东莨菪碱 2. 硫酸阿托品
A. 混合对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 供试品溶液 D. 空白溶液

图1 高效液相色谱图

11.70 mg、硫酸阿托品对照品 10.73 mg,精密称定,置同一 100 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇 70 mL,超声使溶解,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,即得对照品贮备液。取对照品贮备液 5 mL,置 25 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液(每 1 mL 中含 0.02 mg 的混合溶液)。

供试品溶液:取本品 20 片,除去包衣,研细,取细粉(5 片量),精密称定,置具塞锥形瓶中,加 75% 乙醇 40 mL,超声提取 3 次(功率 250 W,40 kHz),每次 30 min(冰盒降温),离心,合并上清液,蒸干,残渣用浓氨溶液(8→100)20 mL 转移至分液漏斗中,用三氯甲烷超声提取 1 min,提取 5 次,每次 15 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣用 50% 甲醇 5 mL 分次超声转移至 5 mL 容量瓶中,放至室温,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按处方制备不含天仙子浸膏的阴性样品,按供试品溶液方法制备,即得。

2.3 方法学考察

专属性考察:分别取上述 3 种溶液,按拟定色谱条件进样分析,记录色谱图,详见图 1。结果表明,在该色谱条件下,供试品溶液色谱中各被测组分峰分离良好,且阴性对照品溶液对各被测组分无干扰。

线性关系考察:精密吸取混合对照品溶液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀。以峰面积(Y)对质量浓度(X , mg/mL)进行线性回归,得回归方程分别为 $Y_{\text{氢}} = 4957316.3X + 1583.7$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{硫}} = 8371107.0X - 1137.0$ ($r = 0.9999$)。结果表明,氢溴酸东莨菪碱和硫酸阿托品质量浓度分别在 0.002146 ~ 0.10729 mg/mL 和 0.002071 ~ 0.10354 mg/mL 范围内线性关系良好。

精密度试验:吸取混合对照品 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,连续进样 10 次。结果氢溴酸东莨菪碱的 RSD 为 1.0%,硫酸阿托品的 RSD 为 0.8%,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一份供试品溶液(批号为 141004),室温放置 0,4,8,16,24 h 后依法测定,结果见

表 1。可见,供试品溶液中 2 种成分 24 h 内稳定性良好。

表1 稳定性试验结果

项目	含量(μg/片)					RSD(%)
	0 h	4 h	8 h	16 h	24 h	
氢溴酸东莨菪碱	6.19	6.38	6.30	6.29	6.01	2.3
硫酸阿托品	8.16	8.48	8.00	8.26	8.12	2.2
总量	14.35	14.86	14.30	14.65	14.13	2.0

重复性试验:取样品(批号为 141004)6 份,精密称定,平行制备 6 份供试品溶液,按拟定色谱条件测定。结果见表 2,可见方法重复性良好。

表2 重复性试验结果

项目	含量(μg/片)						RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	
氢溴酸东莨菪碱	6.19	6.31	5.97	5.59	5.95	5.98	3.75
硫酸阿托品	7.97	8.32	8.32	8.12	8.41	8.43	2.00
总量	13.94	14.63	14.29	13.71	14.36	14.41	2.16

加样回收试验:取已知含量的同一批供试品(批号为 141004)9 份,精密称定,平均分为 3 组,分别加入混合对照品溶液 1.0,1.5,2.0 mL,依法制备供试品溶液,按拟定色谱条件进样分析。结果见表 3。

2.4 样品含量测定

取 14 批样品,依法制备供试品溶液,按拟定色谱条件进样测定,以外标法进行计算。结果见表 4。

3 讨论

3.1 提取方法选择

取样量确定:因天仙子浸膏在该处方中投料量较低,试验过程中分别取 1 片、约 1 g、约 2 g、5 片分别进行比较,5 片量提取出的目标物成分在液相色谱中能达到被检出的要求,故确定取样量为 5 片量。

提取溶剂选择:分别采用甲醇、乙醇、水、75% 的乙醇对样品进行超声提取,提取率最好的为 75% 乙醇,结合天仙子浸膏由 70% 乙醇浸出而得,故确定以 75% 乙醇作为提取溶剂。

提取次数确定:分别采用加 75% 乙醇溶液 40 mL 超声提取 2,3,4 次,其中 3 次提取与 4 次提取无明显差异。

表3 加样回收试验结果($n=9$)

取样量(g)	样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.606 6	22.499 2	28.635 5	16.200 4	18.054 7	37.642 1	46.898 5	93.47	101.15				
1.605 3	22.480 9	28.101 3	16.200 4	18.054 7	39.354 9	45.642 2	104.15	97.15				
1.606 1	22.492 2	28.626 5	16.200 4	18.054 7	39.354 9	45.642 2	104.08	94.24				
1.602 9	22.447 4	28.569 4	24.300 6	27.082 1	45.275 3	57.709 4	93.93	107.59				
1.603 2	22.451 6	28.574 7	24.300 6	27.082 1	48.461 4	54.409 7	107.03	95.39	100.04	98.91	5.86	5.54
1.603 0	22.448 8	28.571 2	24.300 6	27.082 1	46.906 3	54.656 8	100.64	96.32				
1.605 2	22.479 6	28.610 4	32.400 8	36.109 5	53.207 7	65.695 5	94.83	102.70				
1.601 4	22.426 4	28.542 7	32.400 8	36.109 5	53.120 7	66.413 7	94.73	104.87				
1.600 8	22.418 1	28.532 1	32.400 8	36.109 5	57.274 4	61.317 4	107.57	90.78				

注:A 为氢溴酸东莨菪碱,B 为硫酸阿托品。下表同。

表4 14批胃痛宁片中天仙子浸膏含量测定结果($\mu\text{g}/\text{片}$)

批号	A	B	批号	A	B
140701	7.206 0	8.494 3	141003	6.081 0	5.525 0
140702	6.649 7	6.682 4	141004	5.032 5	5.197 0
140703	5.214 1	6.283 2	140901	6.676 1	5.860 9
140704	7.036 4	9.420 5	130602	5.788 6	7.255 4
140705	8.433 9	8.519 5	140201	0.440 7	1.744 4
141001	6.175 7	6.307 1	140202	1.787 2	0.865 0
141002	4.787 6	4.535 3	20140601	0.833 2	0.509 8

提取时间确定:分别采用三氯甲烷超声提取 20 s, 30 s, 1 min, 1.5 min, 1 min 与 1.5 min, 结果无明显差异。

三氯甲烷提取次数确定:分别采用三氯甲烷 10, 15, 20 mL 分别提取 5 次, 15 mL 与 20 mL 无明显差异。

3.2 色谱条件选择

流动相选择:分别采用甲醇-乙腈-30 mmol/L 醋酸钠缓冲液(含 0.02% 三乙胺、0.3% 四氢呋喃,用冰醋酸调节 pH 至 6.0)(10:5:85, V/V/V)为流动相;甲醇为流动相 A,乙腈为流动相 B,0.1% 磷酸溶液为流动相 C 进行梯度洗脱;乙腈为流动相 A,0.1% 磷酸溶液(含 0.02% 的三乙胺)为流动相 B 进行梯度洗脱。结果以乙腈为流动相 A,0.1% 磷酸溶液(含 0.02% 的三乙胺)为流动相 B 进行梯度洗脱对各成分的分离效果最好。

色谱柱选择:选用 Diamonsil(钻石)200 mm, Agilent Zorax SB, SunFire C₁₈ 柱 3 根色谱柱进行试验,结果各组分出峰顺序一致,分离度均达到要求,相较 SunFire 色谱柱分离效果更好。

峰纯度测定:采用 Waters e2998 DAD 检测器对目标峰进行了峰纯度测定,结果纯度角度均小于纯度阈值,证明峰纯。

3.3 含量测定结果分析

采用该方法对 14 批次样品中天仙子的含量测定结果显示,11 批次检出的氢溴酸东莨菪碱和硫酸阿托品含量较高,但各批次之间含量有差异。其中有 3 批次来

源于 2 个厂家测得的含量较低。分析可能原因:因天仙子为毒性成分,厂家在投料时对其有宁少投而不多投之疑;天仙子浸膏含量本身较低,且目前现有标准对天仙子的含量测定指标监控还是盲点;由于胃痛宁的生产工艺等原因(如生产过程中混料不均),可能导致天仙子含量偏低。因此,对胃痛宁片中天仙子浸膏的含量监控很有必要,应督促生产厂家购买药材或投料时提前对天仙子浸膏的含量测定进行监控,从而保证药品质量。

参考文献:

- [1] 李 岩,孟庆勇,赵 欣,等. HPLC 法测定天仙子东莨菪碱和莨菪碱的含量[J]. 新疆医科大学学报,2015,38(1):64-66.
- [2] 邓晓玲. 高效液相色谱法测定硫酸阿托品滴眼液的含量[J]. 中国药业,2017,26(17):23.
- [3] 李 军,门启鸣,刘进朋,等. 天仙子研究概况[J]. 中华中医药学刊,2012,30(3):615-617.
- [4] WS₃-B-3287-2002, 中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂第十七册[S].
- [5] YBZ00612005, 国家食品药品监督管理局标准(试行)[S].
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:51.
- [7] 周 军,赵 晨,张 洋,等. 天仙子中消旋山莨菪碱、东莨菪碱和阿托品的含量测定及 HPLC 特征图谱研究[J]. 天津药学,2013,25(2):4-7.
- [8] 毛谊平,任荣军,吴 高. 芬苍术中非法添加硫酸阿托品及氢溴酸东莨菪碱的检测方法[J]. 中国药业,2010,19(14):47.
- [9] 李德潮. 高效液相色谱法测定胃乐胶囊中硫酸阿托品含量[J]. 中国药业,2016,25(2):68-69.
- [10] 孔 泉,石国明,李志红. 高效液相色谱法测定颠茄草中硫酸阿托品含量[J]. 中国药业,2011,20(19):38.
- [11] 王太亮,王 旭,裴 璐. 维 U 颠茄铝胶囊中硫酸阿托品含量测定方法改进[J]. 中国药业,2009,18(16):30.
- [12] 李惠芬,卢继新,张晓梅. 五种不同产地天仙子总生物碱的含量分析[J]. 中草药,1999,30(8):582-583.

(收稿日期:2019-07-02)