

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.034

高效液相色谱法测定复方夏天无片中原阿片碱和苯甲酰乌头原碱含量

陈芳, 李倩, 李学英

(山东省德州市中医院脑病科, 山东 德州 253000)

摘要:目的 建立同时测定复方夏天无片中原阿片碱和苯甲酰乌头原碱含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为 1% 冰乙酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min 时 94% A, 5~27 min 时 94% A→58% A, 27~30 min 时 58% A→94% A, 30~35 min 时 94% A), 柱温为 30℃, 测定波长为 265 nm, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 25 μL, 外标法定量。结果 原阿片碱和苯甲酰乌头原碱质量浓度在 0.25~10.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r>0.995$, $n=6$); 平均加样回收率分别为 97.47% 和 100.50%, RSD 分别为 4.37% 和 4.31% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、快速、准确、重复性好, 可用于同时测定复方夏天无片中原阿片碱和苯甲酰乌头原碱的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 复方夏天无片; 原阿片碱; 苯甲酰乌头原碱; 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)05-0130-03

Content Determination of Protopine and Benzoyl Aconitine in Compound Xiatianwu Tablets by HPLC

CHEN Fang, LI Qian, LI Xueying

(Department of Encephalology, Dezhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Dezhou, Shandong, China 253000)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination contents of protopine and benzoylaconitine in Compound Xiatianwu Tablets. **Methods** Samples were separated in Agilent Zorbax Eclipse SB-C₁₈ column with column temperature 30℃ and detected at 265 nm wave length. The flowing rate was 1.0 mL/min, with injection volume of 25 μL. Gradient elution program(0-5 min 94% A, 5-27 min 94% A→58% A, 27-30 min 58% A→94% A, 30-35 min 94% A), external standard method was selected as quantitative. **Results** protopine and benzoylaconitine showed good linear relationships in the concentration range 0.25-10.0 μg/mL($r>0.995$, $n=6$). Average recoveries of protopine and benzoylaconitine were 97.47% and 100.50%, respectively. RSDs of repeatability, precision and stability tests were 4.37% and 4.31%, respectively($n=6$). **Conclusion** This method has the advantages of simple operation, rapid, accurate and good repeatability, which can be used for the simultaneous determination of contents of protopine and benzoylaconitine in Compound Xiatianwu Tablets.

Key words: high performance liquid chromatography; Compound Xiatianwu Tablets; protopine; benzoylaconitine; content determination

复方夏天无片是由夏天无、夏天无总碱、制草乌、人工麝香等中药组方,具有祛风逐湿、舒筋活络等功效,可用于风湿瘀血阻滞、经络不通引起的关节肿痛、肢体麻木、屈伸不利、步履艰难,临床常用于治疗风湿性关节炎、坐骨神经痛、脑血栓形成后遗症及小儿麻痹后遗症见上述证候者^[1-6]。2015年版《中国药典(一部)》中复方夏天无片含量测定仅检测原阿片碱的含量^[7],用于表征夏天无和夏天无总碱的量,缺少制草乌中苯甲酰乌头原碱的含量测定,不能较好地控制制剂质量。本研究建立了检测复方夏天无片中的原阿片碱和苯甲酰乌头原碱含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,包括 Waters 2998 DAD 型检测器(美国沃特世科技公司);Agilent Zorbax Eclipse SB-C₁₈ 色谱柱(美国安捷伦科技公司);XS 204ME 型电子天平(瑞士梅特勒科技公司);Milli-Q IQ

7000 型超纯水仪(德国默克密理博科技公司);KQ-300TDE 型超声波清洗机(昆山舒美超声设备公司)。

1.2 试剂

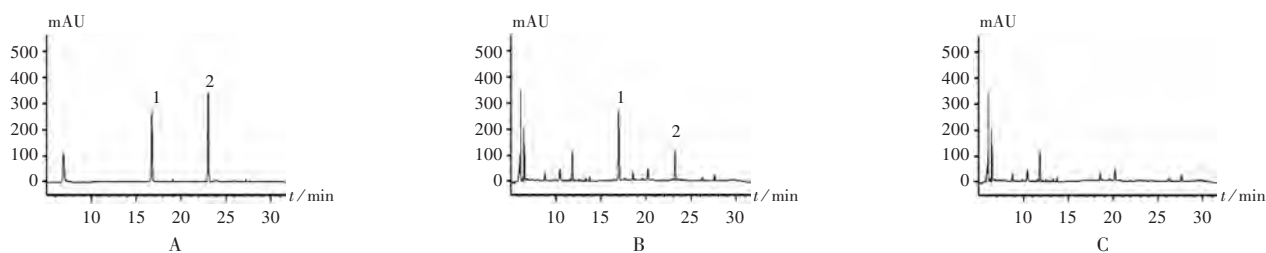
复方夏天无片(江西天施康中药股份有限公司,批号分别为 190405,180721,181215,规格为每片 0.32 g)原阿片碱对照品(批号为 110853-201805,含量为 99.6%),苯甲酰乌头原碱对照品(批号为 111794-201705,含量为 99.1%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇(美国 Fisher 集团)均为色谱纯;乙酸铵、冰乙酸、磷酸(上海化学试剂厂)均为分析纯;超纯水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm);流动相:0.1% 冰乙酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min 时 94% A, 5~27 min 时 94% A→58% A, 27~30 min 58% A→94% A, 30~35 min 94% A);柱温:30℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:264 nm;

第一作者:陈芳,女,大学本科,主治医师,研究方向为神经内科学,(电子信箱)944485661@qq.com。



1. 原阿片碱 2. 苯甲酰乌头原碱
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

进样量:25 μL 。

2.2 溶液制备

取原阿片碱和苯甲酰乌头原碱标准品各 25.0 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加 1% 盐酸溶液 5.0 mL 及甲醇溶液 12.0 mL,超声溶解,取出,放冷,加 70% 甲醇至刻度(每 1 mL 含原阿片碱和苯甲酰乌头原碱均为 0.5 mg),摇匀,即得混合对照品溶液。取复方夏天无片样品 10 片,研细,取约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加 70% 甲醇约 40 mL,超声提取(功率为 300 W,频率为 60 Hz)约 25 min;取出,放冷,加 70% 甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。按处方和工艺制备缺夏天无、夏天无总碱和制草乌的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取 2.2 项下 3 种溶液和试剂空白溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录色谱图,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,且阴性对照无干扰,方法专属性良好。

线性关系考察:取混合对照品溶液适量,制成质量浓度为 0.25,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,加 70% 甲醇至刻度,摇匀,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图。以原阿片碱和苯甲酰乌头原碱的质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得原阿片碱和苯甲酰乌头原碱的回归方程分别为 $Y_{\text{原}} = 16.109X + 8.763$ ($r = 0.9995$) 和 $Y_{\text{苯}} = 212.095X + 11.689$ ($r = 0.9996$)。结果表明,原阿片碱和苯甲酰乌

头原碱质量浓度均在 0.25 ~ 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取混合对照品溶液(质量浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$),按拟订色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果原阿片碱和苯甲酰乌头原碱峰面积的 RSD 分别为 2.08% 和 2.41% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试样品(批号为 180721)溶液,室温下放置 0,3,6,9,12,24 h,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果原阿片碱和苯甲酰乌头原碱峰面积的 RSD 分别为 2.33% 和 2.97% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品(批号为 180721)10 片,研细,取约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,分别精密称取 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果原阿片碱和苯甲酰乌头原碱峰面积的 RSD 分别为 2.63% 和 3.65% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为 180721)10 片,研细,取约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,分别取 6 份,精密称定,分别加入混合对照品溶液适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取复方夏天无片(批号分别为 190405,180721,181215),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定峰面积,并计算样品含量。结果见表 2。

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.014	1.014	0.472	0.101	0.5	0.5	0.929	0.635	91.40	106.80				
1.089	1.089	0.455	0.114	0.5	0.5	0.939	0.606	96.80	98.40				
1.076	1.076	0.516	0.097	0.5	0.5	0.997	0.588	96.20	98.20				
0.994	0.994	0.483	0.089	0.5	0.5	1.004	0.615	104.20	105.20	97.47	100.50	4.37	4.31
1.010	1.010	0.447	0.106	0.5	0.5	0.946	0.595	99.80	97.80				
0.983	0.983	0.491	0.099	0.5	0.5	0.973	0.582	96.40	96.60				

注:A 为原阿片碱,B 为苯甲酰乌头原碱。