

多波长 HPLC 同时测定痛安注射液中 4 种有效成分

林夏¹, 崔培超², 仲艳¹, 胡军华¹, 李家春¹, 黄文哲¹, 王振中¹, 萧伟^{1*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001;
2. 江苏康缘生态农业发展有限公司, 江苏连云港 222001)

[摘要] **目的:**建立同时测定痛安注射液中木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱含量的 HPLC 方法。**方法:**采用 Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(B)梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm(木兰花碱), 290 nm(原阿片碱、白屈菜碱), 360 nm(黄连碱), 柱温 30 ℃。**结果:**木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱分别在 10.856 ~ 108.560 ($r = 0.999\ 8$), 24.712 ~ 247.120 ($r = 0.999\ 6$), 3.464 ~ 34.640 ($r = 0.999\ 6$), 39.296 ~ 392.960 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$) 线性关系良好, 回收率在 97.5% ~ 101.8%。**结论:**建立的方法准确可靠, 可以用于测定痛安注射液中木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱的含量。

[关键词] 痛安注射液; 木兰花碱; 原阿片碱; 黄连碱; 白屈菜碱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0050-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090050

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150317.1053.013.html>

[网络出版时间] 2015-03-17 10:53

Simultaneous Determination of Four Active Components in Tong'an Injection by HPLC Under Multiple UV Wavelengths LIN Xia¹, CUI Pei-chao³, ZHONG Yan¹, HU Jun-hua¹, LI Jia-chun¹, HUANG Wen-zhe¹, WANG Zhen-zhong¹, XIAO Wei^{1*} (1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China; 2. Jiangsu Kanion Ecological Agriculture Development Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for content determination of magnoflorine, protopine, coptisine and chelidone in Tong'an injection. **Method:** Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ monopotassium phosphate at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 230 nm for magnoflorine, 290 nm for protopine and chelidone, 360 nm for coptisine, and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** Calibration curves of the magnoflorine, protopine, chelidone and coptisine in Tong'an injection showed good linear relationship: 10.856-108.560 ($r = 0.999\ 8$), 24.712-247.120 ($r = 0.999\ 6$), 3.464-34.640 ($r = 0.999\ 6$), 39.296-392.960 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$). The average recoveries of the components above were between 97.5%-101.8%. **Conclusion:** The method was feasible, accurate and stable, which could be used for determination of magnoflorine, protopine, coptisine and chelidone in Tong'an injection.

[Key words] Tong'an injection; magnoflorine; protopine; coptisine; chelidone; HPLC

痛安注射液是由白屈菜、青风藤、汉桃叶 3 味中药组成, 具有通络止痛功效, 主要用于肺癌、肝癌、胃癌等肿瘤化疗期间血瘀引发的癌性中度疼痛

等^[1-2]。白屈菜主要含白屈菜碱、木兰花碱、原阿片碱、黄连碱等多种生物碱成分, 具有抗肿瘤、镇痛、抗菌、抗炎等作用^[3-6]。青风藤主要含青藤碱、双青藤

[收稿日期] 20140826(013)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 林夏, 中级工程师, 从事中药质量标准研究, Tel: 15105130710, E-mail: linxia297125856@163.com

[通讯作者] * 萧伟, 研究员级高级工程师, 博士, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 0518-81152367, E-mail: kanionlunwen@163.com, Fax: 0518-81152327

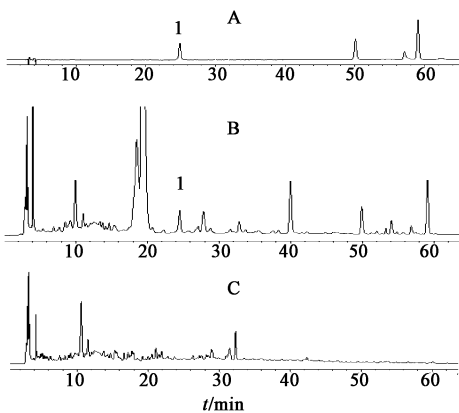
碱、木兰花碱等生物碱类成分,有抗炎、免疫抑制、镇痛、降血压、抗心律失常等药理作用^[7-10]。汉桃叶主要含有机酸类成分。该制剂质量标准中已有青藤碱、白屈菜碱含量测定方法,为了更加有效的控制药品质量,本文参照文献[11]方法,采用多波长 HPLC 同时测定痛安注射液中木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱 4 个有效成分的含量。

1 仪器与试剂

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent), BP-211D 型电子天平(德国 Sartorius)。原阿片碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110853-200402),木兰花碱、黄连碱对照品(成都曼斯特,批号 MUST-12022901, MUST-12040903,纯度均为 98%),白屈菜碱对照品(BioChemika, Lo&t Filling 批号 450411/1, 54904193,纯度 98%),痛安注射液(江苏康缘药业股份有限公司生产,批号 120301, 120501, 120601),乙腈(色谱纯,上海星可生化有限公司),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 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄(B)梯度洗脱(0~15 min, 6%~10% A; 15~43 min, 10%~18% A; 43~60 min, 18%~25% A; 60~65 min, 25% A),柱温 30℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 230(木兰花碱),290(原阿片碱、白屈菜碱),360 nm(黄连碱);进样量 10 μL。对照品与样品的色谱图见图 1~3。

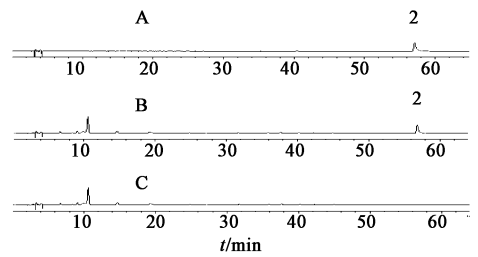


A. 对照品; B. 供试品; C. 青藤碱、白屈菜阴性品; 1. 木兰花碱

图 1 痛安注射液 230 nm HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Tong'an injection(230 nm)

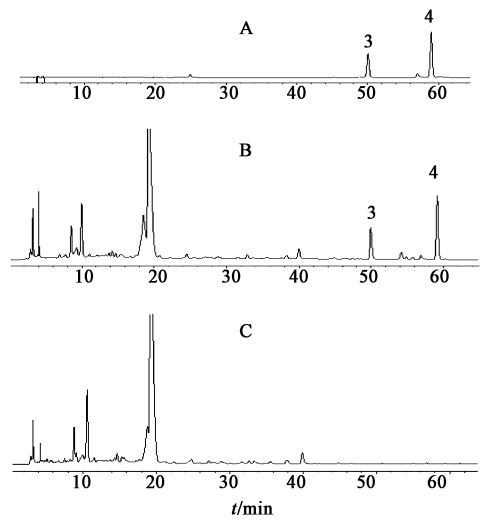
2.2 对照品储备溶液制备 分别取木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱对照品适量,精密称定,加甲



A. 对照品; B. 供试品; C. 白屈菜阴性品; 2. 黄连碱

图 2 痛安注射液 360 nm HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of Tong'an injection (360 nm)



A. 对照品; B. 供试品; C. 白屈菜阴性品; 3. 原阿片碱; 4. 白屈菜碱

图 3 痛安注射液 290 nm HPLC

Fig. 3 HPLC chromatograms of Tong'an injection(290 nm)

醇制成含木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱分别为 0.542 8, 1.235 6, 0.173 2, 1.964 8 g·L⁻¹ 的混合对照品储备溶液。

2.3 供试品溶液制备 取本品适量,精密量取 1 mL 置 5 mL 量瓶内,加甲醇定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 定量限 按上述色谱条件,用混合对照品储备溶液稀释进行试验,结果木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱的定量限分别为 11.2 (S/N = 10.2), 24.2 (S/N = 9.8), 26.3 (S/N = 10.3), 3.15 ng (S/N = 10.5)。

2.5 线性关系考察 精密量取上述混合对照品储备溶液 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 分别至 10 mL 量瓶内,加甲醇定容至刻度,得到系列混合对照品溶液,依次含木兰花碱 10.856, 21.712, 43.424, 65.136, 86.848, 108.560 mg·L⁻¹, 含原阿片碱 24.712, 49.424, 98.848, 148.272, 197.696, 247.120

mg · L⁻¹, 含黄连碱 3.464, 6.928, 13.856, 20.784, 27.712, 34.640 mg · L⁻¹, 含白屈菜碱 39.296, 78.592, 157.184, 235.776, 314.368, 39.960 mg · L⁻¹, 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录色谱图, 以色谱峰面积为纵坐标, 进样浓度为横坐标, 绘制标准曲线。结果表明各成分在相应浓度范围内呈良好线性关系, 线性范围、回归方程、相关系数见表 1。

表 1 4 种成分线性范围、回归方程和相关系数

Table 1 Linearity range, regression equation and correlation coefficient of four compounds

成分	线性范围/mg · L ⁻¹	回归方程	r
木兰花碱	10.856 ~ 108.560	Y = 37.681X - 12.178	0.999 8
原阿片碱	24.712 ~ 247.120	Y = 8.188 1X - 2.929	0.999 6
黄连碱	3.464 ~ 34.640	Y = 28.827X - 11.936	0.999 6
白屈菜碱	39.296 ~ 392.960	Y = 11.958X - 10.605	0.999 9

2.6 精密度试验 取混合对照品溶液(含木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱 43.424, 98.848, 3.856, 157.184 mg · L⁻¹), 按 2.1 项下色谱条件测定, 重复进样 6 次, 测定。木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 1.4%, 1.9%, 1.8%。表明仪器的精密度良好。

2.7 重复性 取痛安注射液(批号 120301)6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定。结果含木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱分别为 73.27, 208.86, 23.03, 350.37 mg · L⁻¹, RSD 分别为 2.3%, 1.7%, 2.9%, 1.6%。

2.8 稳定性 取痛安注射液供试品溶液(批号 120301), 在室温条件下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱的峰面积 RSD 分别为 1.3%, 1.1%, 1.7%, 0.5%。结果表明, 供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.9 回收率试验 精密量取本品(批号 120301, 木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱质量分数分别为 73.27, 208.86, 23.03, 350.37 mg · L⁻¹)0.5 mL, 置 5 mL 量瓶内, 再精密加入混合对照品溶液 0.08 mL, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得, 平行制备 6 份。按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 计算木兰花碱、原阿片碱、黄连碱、白屈菜碱的加样回收率, 结果见表 2。

2.10 样品测定 取痛安注射液(批号 120301, 120501, 120601)按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果见表 3。

表 2 痛安注射液中 4 个被测成分的加样回收率

Table 2 Recovery of four compounds of Tong'an injection

成分	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
木兰花碱	36.64	43.42	79.85	99.5	99.0	1.4
	36.64	43.42	78.98	97.5		
	36.64	43.42	80.12	100.1		
	36.64	43.42	80.25	100.4		
	36.64	43.42	79.66	99.1		
	36.64	43.42	78.79	97.1		
原阿片碱	104.43	98.85	199.82	96.5	97.5	1.5
	104.43	98.85	199.69	96.4		
	104.43	98.85	200.01	96.7		
	104.43	98.85	200.15	96.8		
	104.43	98.85	203.24	100.0		
	104.43	98.85	201.72	98.4		
黄连碱	11.52	13.86	25.54	101.2	101.8	1.2
	11.52	13.86	25.69	102.3		
	11.52	13.86	25.44	100.5		
	11.52	13.86	25.72	102.5		
	11.52	13.86	25.49	100.8		
	11.52	13.86	25.90	103.8		
白屈菜碱	175.19	157.18	336.93	102.9	101.4	1.4
	175.19	157.18	336.78	102.8		
	175.19	157.18	335.76	102.2		
	175.19	157.18	331.47	99.4		
	175.19	157.18	334.12	101.1		
	175.19	157.18	332.39	100.0		

表 3 痛安注射液中 4 种成分的含量测定

Table 3 Contents of four compounds in samples of Tong'an injection

批号	木兰花碱	原阿片碱	黄连碱	白屈菜碱
120301	73.27	208.86	23.03	350.37
120501	77.42	216.85	28.75	387.25
120601	84.98	224.46	26.98	398.52

3 讨论

3.1 检测波长的选择 为使各个待测成分得到较好分离, 且获得较高的灵敏度, 采用 DAD 检测器, 在 200 ~ 400 nm 扫描, 选择各待测成分最佳波长, 最终选择分别在 3 个波长处检测 4 个成分的含量, 解决了在同一波长下检测多个成分时, 色谱峰干扰严重, 灵敏度低等问题。

3.2 色谱条件的确定 比较了乙腈-磷酸盐、乙腈-0.1%三乙胺、甲醇-0.1%三乙胺水3种流动相系统,结果采用乙腈-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾系统色谱峰分离较好,并优化洗脱条件,最终确定梯度洗脱条件下完成4个待测成分的同时测定,解决了因待测成分极性差异大难以在同一色谱条件下检测的问题。同时考察了25,30,35℃不同柱温及0.8,1.0,1.2 mL·min⁻¹不同流速对各待测成分的影响,结果在柱温30℃,流速1.0 mL·min⁻¹时分离效果最佳。比较了Phenomenex Gemini C₁₈柱,Waters Xbridge C₁₈柱及Agilent Extend C₁₈柱,结果在本方法的色谱条件下,各待测成分以Phenomenex Gemini C₁₈柱分离效果最佳,分离度均>1.5。

4 结论

痛安注射液为复方制剂注射剂,主要含生物碱类成分。本方法采用同一色谱条件同时测定该注射液中4个有效成分的含量,该方法准确可靠,能更好地控制痛安注射液的整体质量。

[参考文献]

[1] 萧伟,尚强,孙兰,等.痛安注射液镇痛作用实验研

究[J].吉林中医药,2009,29(2):172-173.

[2] 关洁珊,景娇,林丽珠.痛安注射液对中度癌性疼痛的治疗作用[J].广州中医药大学学报,2013,30(1):12-15.

[3] 韦祖巧,邹翔,曲中原,等.白屈菜化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,2009,40(增):38-40.

[4] 赵宇新,李曼玲,罂粟科.白屈菜族的化学成分及植物化学分类依据的研究进展[J].湖南中医药导报,2002,8(10):582-584.

[5] 姜晓满,田卫,张海霞.中药白屈菜的研究概况[J].中国药学杂志,1994,29(3):138-140.

[6] 周金云,陈碧珠,佟晓杰,等.白屈菜生物碱的化学研究[J].中草药,1989,20(4):1-4.

[7] 吴宗群.中药青风藤的药理作用及临床应用[J].中国药师,2006,9(9):857-858.

[8] 宋永彬,程维明,曲戈霞.青风藤化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2007,24(2):79-81.

[9] 王岩,周莉玲,李锐.青风藤的研究进展[J].中药材,2002,25(3):209-211.

[10] 陈曦,王艳龙.青风藤研究现状及展望[J].江西中医药,2011,42(2):69-72.

[11] 霍翠翠,徐兰兰,尚强.痛安注射液HPLC指纹图谱的研究[J].中草药,2009,40(4):569-571.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,收取高额审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

②http://www.syfjxzz.com 为本刊唯一域名。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。