

HPLC 法测定蒙药制剂奥奇日阿勇嘎丸中 2 种生物碱成分

杨景奇¹ 吴海² 韩清¹ 嵇增云¹ 郝俊生¹ 王燕燕^{1*} 包红英³

(1.通辽市市场检验检测中心 内蒙古通辽;

2.科尔沁右翼中旗蒙医医院 内蒙古兴安盟; 3.内蒙古民族大学蒙医药学院 内蒙古通辽)

【摘要】目的: 建立HPLC法测定奥奇日阿勇嘎丸中2种生物碱成分方法。方法: 采用Agilent Eclipse Plus C₁₈ (4.6x250mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为0.1mol/L醋酸铵 (每1000mL加冰醋酸0.5mL) (A)-乙腈: 四氢呋喃 (25: 15) (B), 梯度洗脱 (0~50min, 18%B→28%B), 检测波长为235nm, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 柱温为40℃。结果: 奥奇日阿勇嘎丸中苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱分别在0.0065~0.0979、0.0009~0.0136 mg·mL⁻¹范围内与峰面积线性关系良好 (R=0.9995), 平均回收率分别在104.2%和96.8%, RSD分别为1.1%和0.8%。结论: 该方法简便、稳定、重复性良好, 可用于奥奇日阿勇嘎丸中生物碱成分的质量控制。

【关键词】蒙成药; 奥奇日阿勇嘎丸; HPLC; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱

HPLC method for the determination of two alkaloids in the Mongolian drug preparation

Yang Jingqi¹ Wu Hai² Han Qing¹ Ji Zengyun¹ Hao Junsheng¹ Wang Yanyan^{1*} Bao Hongying³

(1. Tongliao Market Inspection and Testing Center, Tongliao, Inner Mongolia;

2. Mongolian Medical Hospital, Horqin Right Wing Middle Banner, Xingan League, Inner Mongolia;

3. School of Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia)

[Abstract] Objective: To establish HPLC method for the composition of two alkaloids in Ochi. Method: Agilent Eclipse Plus C₁₈ (4.6x250mm, 5 μm) column, mobile phase of 0.1 mol/L ammonium acetate (0.5 mL per 1000 mL) (A) -acetonitrile: tetrahydrofuran (25: 15) (B), gradient elution (0-50 min, 18%B 28%B), detection wavelength of 235nm, flow rate of 1.0 mL min⁻¹, and column temperature of 40℃. Results: The linear relationship and the peak area were in the range of 0.0065~0.0979 and 0.0009~0.0136 mg mL⁻¹ (R=0.9995), with the average recovery rate of 104.2% and 96.8%, and RSD of 1.1% and 0.8%, respectively. Conclusion: The method is simple, stable and reproducible, and can be used for the quality control of the alkaloids in the pills.

[Key words] Mongolian medicine; Ochiri Ayongga pill; HPLC; benzoyl new aconitine; benzoyl subaconitine

蒙药奥奇日阿勇嘎丸现收载于《内蒙古蒙药制剂规范 (第三册)》^[1], 由制草乌、诃子、方海、黑云香、甘松、木香、制五灵脂、石膏、刀豆、石菖蒲、红花、多叶棘豆、人工牛黄等十三味药配伍而成, 具有杀“粘”, 消肿, 止痛等功效; 主治“粘”热, 白喉, 炭疽, “粘”刺痛, “巴木”病, 风湿病, 腰膝疼痛等。随着蒙药市场的推广, 常有一些含草乌制剂使用不当造成患者中毒的案例发生, 为此临床中已高度重视, 而此现象产生的原因可能是蒙医药标准滞后, 未及时研究更新标准也有关^[2, 3]。查阅相关文献未发现对奥奇日阿勇嘎丸生物碱的含量测定研究, 故本研究采用固相萃取-高效液相色谱法[4]对奥奇日阿勇嘎丸中 2 种生物碱进行含量测定, 建立有效的质量控制方法, 为该制剂临床用药提供保障, 为监管提供技术支撑, 也为后续的其他含草乌蒙药制剂的标准提升具有借鉴作用。

1 实验仪器与试剂

LC-16A 型高效液相色谱仪 (日本岛津), SPD-16 检测器; Agilent Eclipse Plus C₁₈ (4.6x250mm, 5 μm) 色谱柱; AE-100 电子天平 (瑞士梅特勒); XS3DU 电子天平 (百万分之一, 瑞士梅特勒-托利多); KQ-200VDE 型三频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); MH-500 调温型电热套 (北京科伟永兴仪器有限公司); HC-3018R 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); 混合型阳离子交换反相萃取柱 (北京纳欧科技有限公司), 苯甲酰新乌头原碱 (批号: 111795-202106; 含量: 96.3%)、苯甲酰次乌头原碱 (批号: 111796-202207; 含量: 96.4%) 购自中国食品药品鉴定研究院; 色谱乙腈、色谱四氢呋喃 (国药集团

化学试剂有限公司); 乙酸铵、盐酸、氨水、甲醇、异丙醇、三氯甲烷、磷酸均为分析纯, 水为超纯水; 奥奇日阿勇嘎丸信息见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse Plus C₁₈ (4.6x250mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1mol/L 醋酸铵 (每 1000mL 加冰醋酸 0.5mL) (A) - 乙腈: 四氢呋喃 (25: 15) (B), 梯度洗脱, 0~50min: 18% → 28% (B); 检测波长: 235 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取苯甲酰新乌头原碱 9.414mg、苯甲酰次乌头原碱 5.882mg 分别置 50mL 容量瓶中, 加异丙醇: 三氯甲烷 (1: 1) 混合溶液, 即得; 分别精密量取苯甲酰新乌头原碱 0.9mL、苯甲酰次乌头原碱 0.2mL 置同一 25mL 容量瓶中, 加异丙醇:

三氯甲烷 (1: 1) 混合溶液, 即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备^[4]

取样品粉末 0.5g, 精密称定, 精密加入 0.1mol/L 盐酸溶液 25mL, 称重, 加热回流 60min, 取出, 冷却, 以 0.1mol/L 盐酸溶液补足减失的重量, 摇匀, 离心 (转速为每分钟 5000 转) 30 分钟, 滤过, 精密量取续滤液 15mL, 加在固相萃取柱 (以混合型阳离子交换反相吸附剂为填充剂, 200mg, 容量为 6mL, 预先依次用乙腈、水各 6mL 洗脱) 上, 依次以水 3mL、氨溶液 (5→100)、水、甲醇、乙腈各 5mL 洗脱, 待洗脱液流尽后, 放置 5 分钟, 继用乙腈-浓氨试液 (90: 10) 的混合溶液 10mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 40℃ 以下减压回收溶剂至干, 残渣精密加入异丙醇: 三氯甲烷 (1: 1) 的混合溶液使溶解, 置 5mL 容量瓶至刻度, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性供试品溶液的制备

按照处方比例制成缺制草乌的阴性样品, 按“2.3”项下方法制备, 即得。

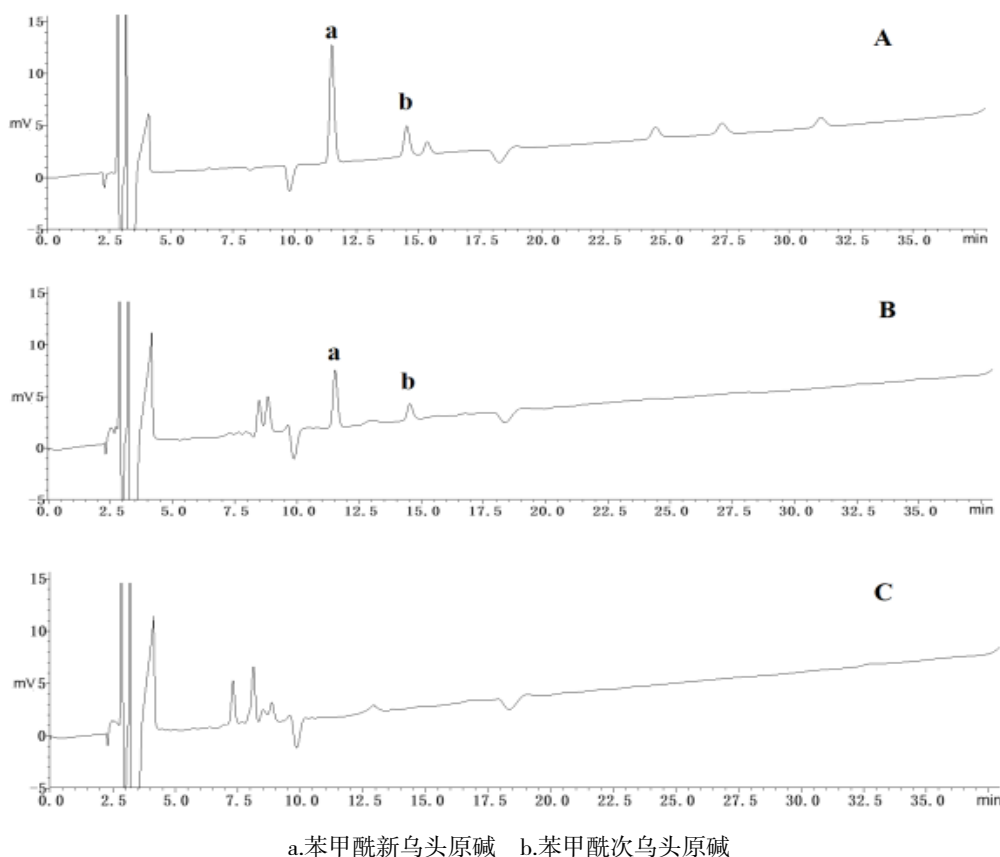


图1 奥奇日阿勇嘎丸混合对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性对照 (C) 色谱图

2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2”对照品溶液 1、3、5、7、10、12、15 μL, 注入液相色谱仪, 测定其峰面积。以对

照品溶液的进样量质量浓度 C (X) 为横坐标, 峰面积积分值 A (Y) 为纵坐标进行线性分析, 结果苯甲酰新乌头原碱

和苯甲酰次乌头原碱线性方程分别为 $Y=1408146.6849x-743.1874$ ($r=0.9995$), $Y=3085251.0187x+227.6723$ ($r=0.9995$); 在 $0.0065\sim0.0979$ 、 $0.0009\sim0.0136$ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液, “2.1”色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱峰面积的 RSD 分别为 0.15%、0.08%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取样品 S1, 按“2.3”制备供试品溶液, “2.1”色谱条件下分别于制备后 0、2、4、6、8、12 h 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积的 RSD 值分别为 0.26%、0.25%, 表明供试品溶液在 12h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 取样品 S1, 按“2.3”平行制备 6 份, 注入液相色谱仪, 记录峰面积计算含量。结果苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱含量分别为 0.0059% 和 0.0004%, RSD 分别为 0.15% 和 6.31%, 表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的 S1 号样品约 0.25 g, 精密加入适量苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱, 按供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 测定回收率。结果苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱的加样回收率分别为 104.2% 和 96.8%, RSD 分别为 1.1% 和 0.8%。

2.10 样品含量测定 取 3 批奥奇日阿勇嘎丸各约 0.5g, 精密称定, 按“2.3”方法制备, 注入液相色谱仪, 计算含量。结果见表 1。

表 1 3 批奥奇日阿勇嘎丸信息及 2 种生物碱含量

编号	批号	苯甲酰新乌头原碱含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	苯甲酰次乌头原碱含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
S1	20201216	0.0593	0.0024
S2	20221026	0.0460	0.0017
S3	20221202	0.0587	0.0035

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察 本实验以奥奇日阿勇嘎丸中 2 种生物碱提取率为指标, 考察样品取样量 (0.5g、0.7g、1.0g、2.0g、2.5g), 提取方法 (超声处理 30 min、40 min、60 min, 加热回流 30 min、60 min、90 min), 结果样品取样量为 0.5g、加热回流 60 min 时 2 种生物碱提取率最高。

3.2 色谱条件的选择 本实验以奥奇日阿勇嘎丸中 2 种生物碱的分离度为指标, 考察了 0.1mol/L 醋酸铵 (每 1000mL 加冰醋酸 0.5mL) - 乙腈: 四氢呋喃 (25: 15)、0.2% 磷酸水 - 乙腈、0.2% 冰醋酸 - 乙腈、0.2% 磷酸水 - 甲醇等不同流动相

的梯度洗脱, 结果流动相为 0.1mol/L 醋酸铵 (每 1000mL 加冰醋酸 0.5mL) - 乙腈: 四氢呋喃 (25: 15) 时, 各成分分离度均大于 1.5, 不同色谱柱 (Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ; Agela Promosil C18 色谱柱 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ; Mars 120 ODS-3 色谱柱 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、不同流速 (0.9、1.0、1.1mL $\cdot$ min $^{-1}$)、不同柱温 (30、35、40 $^{\circ}\text{C}$) 时 R 影响较小, 故本研究流动相选择为 0.1mol/L 醋酸铵 (每 1000mL 加冰醋酸 0.5mL) - 乙腈: 四氢呋喃 (25: 15), 流速 1.0mL $\cdot$ min $^{-1}$ 、柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 、检测波长参考《中国药典》2020 版一部制草乌含量测定项下检测波长 235 nm。

参考文献:

- [1]内蒙古自治区药品监督管理局.内蒙古蒙药制剂规范 (第三册) [M].赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2021: 233-234.
 - [2]乌日汉, 孟香花, 宝乐尔, 等.蒙药草乌毒性研究概况[J].中华中医药杂志, 2021, 36 (07): 4159-4162.
 - [3]田友清, 丁平, 支荣荣.《中国药典》2020 年版一部含乌头碱制剂质量控制探讨 [J]. 中国药品标准, 2023, 24 (02): 122-129.
 - [4]中国药典委员会.中华人民共和国药典: 一部[M].北京: 中国医学科技出版社, 2020: 1088.
- 第一作者简介: 杨景奇 (1968-), 男, 满族, 大学本科, 高级工程师, 主要从事产品检验及质量标准提升研究。
通讯作者简介: 王燕燕 (1984-), 女, 蒙古族, 大学本科, 产品质量工程师, 主要从事食品药品检验及质量标准提升研究。
基金项目: 内蒙古自治区药品监督管理局药品安全监管科研项目-常用含草乌蒙药医疗机构制剂质量标准提升研究 [NMYJ-KJ-202308];