

# RP-HPLC同时测定华山参滴丸中 3种有效成分的含量

董林毅<sup>1,2b</sup>, 张韻慧<sup>1</sup>, 李若洁<sup>2a</sup>, 侯媛媛<sup>2bf</sup> (1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 南开大学, a. 生命科学学院, b. 药学院, 天津 300071)

**摘要:**目的 建立反相高效液相色谱法同时测定华山参滴丸中 3种有效成分的含量。方法 采用 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 20 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液-甲醇 (70/30), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 215 nm, 进样量 20 μL。结果 硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱和消旋山莨菪碱的线性范围分别为 1.444~28.88 μg (r = 0.999 9), 0.891~17.82 μg (r = 0.999 9), 2.196~43.92 μg (r = 0.999 9); 平均回收率 (n = 6) 分别为 101.82% (RSD = 2.89%), 100.17% (RSD = 2.49%), 98.68% (RSD = 2.33%)。结论 所建立的 RP-HPLC 方法简便、准确、快速、重复性好, 可用于华山参滴丸中硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱和消旋山莨菪碱 3 个有效成分的含量测定。

**关键词:** 华山参滴丸; 硫酸阿托品; 氢溴酸东莨菪碱; 消旋山莨菪碱; 反相高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)05-0385-03

## Determination of Three Active Components in Huashanshen Dripping Pills by RP-HPLC

DONG Lin-yi<sup>1,2b</sup>, ZHANG Yun-hui<sup>1</sup>, LI Ruojie<sup>2a</sup>, HOU Yuan-yuan<sup>2bf</sup> (1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Nankai University, a. College of Life Sciences, b. College of Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300071, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a RP-HPLC method for determination of three components (atropine sulfate, scopolamine hydrobromide and racemanisodamine) in Huashanshen dripping pills. **METHODS** The analysis was performed on a Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mixture of methanol and 20 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate buffer solution (30/70) as mobile phase, and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 215 nm. The column temperature was room temperature (25 °C). **RESULTS** The calibration curves of atropine sulfate, scopolamine hydrobromide and racemanisodamine were linear in the ranges of 1.444–28.88 μg (r = 0.999 9), 0.891–17.82 μg (r = 0.999 9), 2.196–43.92 μg (r = 0.999 9), respectively. The average recoveries (n = 6) of the three components in samples were 101.82% (RSD = 2.89%), 100.17% (RSD = 2.49%), 98.68% (RSD = 2.33%), respectively. **CONCLUSION** This method was simple, accurate and reliable to determine the contents of atropine sulfate, scopolamine hydrobromide and racemanisodamine in Huashanshen dripping pills for the quality control.

**KEY WORDS** Huashanshen dripping pills; atropine sulfate; scopolamine hydrobromide; racemanisodamine; RP-HPLC; content determination

华山参滴丸是在原制剂“华山参片”基础上改进的新剂型, 具有定喘, 止咳, 祛痰等功效<sup>[1]</sup>, 主治慢性支气管炎, 喘息性气管炎, 临床上取得了良好的治疗效果。其中含有的主要活性成分为阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱等托烷类生物碱。《中国药典》(2010年版)一部收载有华山参、华山参片<sup>[2]</sup>, 含量测定项均采用以硫酸阿托品为对照的紫外-可见分光光度法。华山参滴丸如采用同样方法, 取样量较大, 且灵敏度较差。近年来, 随着 HPLC 的广泛应用, 用 HPLC 测定华山参制剂含量的报道<sup>[3-6]</sup> 日趋增多, 但山莨菪碱和东莨菪碱也是其中的主要有效成

分, 因此宜采用简便、准确的方法同时加以控制。为了提高检测速度及更好地控制华山参滴丸的质量, 本实验建立了一种 RP-HPLC 用来同时测定华山参滴丸中主要有效成分 (阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱) 的含量, 本方法具有准确、快速、精密度高、重现性好等特点, 为该制剂的质量控制提供了一种简单可行的定量方法。

### 1 仪器与试剂

SHIMADZU 高效液相色谱仪: LC-20AT 泵, SIL-20A 自动进样器, SPD-20A 紫外可见光检测

作者简介: 董林毅, 男, 博士研究生 研究方向: 应用化学 \* 通讯作者: 侯媛媛, 女, 博士, 讲师 研究方向: 复方药物分析及作用机制研究 Tel: (022) 23506930 E-mail: houyy@nankai.edu.cn

器, LC- solution 色谱工作站(日本岛津); Millipore 纯水仪, Mettler AB104型电子分析天平(上海 Mettler-Toledo 有限公司), KQ3200型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司), MKRO 220R 高速离心机(德国 Hettich-Zentrifugen 有限公司)。

对照品: 硫酸阿托品(纯度 > 99%, 批号 100040-200510)、氢溴酸东莨菪碱(纯度 > 99%, 批号 100049-200308)、消旋山莨菪碱(纯度 > 99%, 批号 100249-199501)均购于中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。华山参滴丸(天津中新药业股份有限公司第六中药厂提供, 每丸重约 20 mg)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为 20 mmol L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液-甲醇(70:30); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 215 nm; 柱温: 室温(25℃); 进样量: 20 μL; 理论塔板数按硫酸阿托品峰计算应不低于 4000。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、消旋山莨菪碱适量, 加甲醇溶解, 制成每 1 mL 含硫酸阿托品 72.2 mg、氢溴酸东莨菪碱 44.6 mg、消旋山莨菪碱 109.8 mg 的混合溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 10 丸, 精密称定, 计算平均丸重, 研磨成粉末, 取约 0.1 g 精密称定, 置于 1.5 mL 离心管中, 精密加入甲醇溶液 0.5 mL, 再加入 10 μL 浓氨水(pH 值调为 9.0), 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min(超声频率 40 kHz, 功率 150 W), 放置至室温, 再称定质量, 用甲醇补足失去质量, 摇匀, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后, 取上清液经 0.22 μm 过滤膜过滤, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方工艺制备不含华山参浸膏的辅料滴丸阴性样品, 按“2.2.2”项下方法操作, 即得。

### 2.3 专属性实验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。阴性样品在硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、消旋山莨菪碱(215 nm)出峰处无干扰(图 1), 表明处方中的其他成分对测定结果无影响。

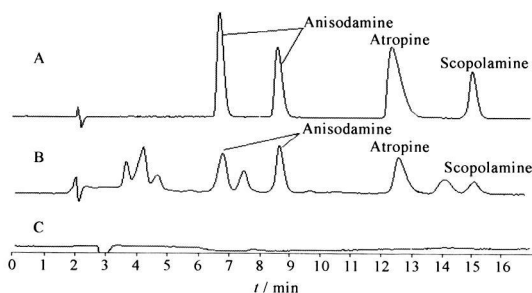


图 1 混合对照品(A)、供试品(B)、阴性样品(C)的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A), sample (B) and negative sample (C)

### 2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2 mL, 分别置 7 个 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成系列浓度对照品混合溶液, 分别吸取 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。以进样量(μg)为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、消旋山莨菪碱回归方程分别为:  $Y = 308.253X - 3894.7 (r = 0.9999)$ ;  $Y = 184.160X - 467.48 (r = 0.9999)$ ;  $Y = 565.386X + 40477 (r = 0.9999)$ 。结果表明, 硫酸阿托品进样量在 1.444~28.88 μg, 氢溴酸东莨菪碱进样量在 0.891~17.82 μg, 消旋山莨菪碱进样量在 2.196~43.92 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.5 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL, 重复进样 6 次, 依法测定, 计算硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、消旋山莨菪碱的峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 2.06%, 1.52%, 1.97%。结果表明精密度良好。

### 2.6 重复性实验

精密称取华山参滴丸粉末 0.1 g, 共 6 份(批号 100214), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 依“2.1”项下色谱条件进行测定, 测得硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、消旋山莨菪碱的含量平均值分别为 4.296, 1.985, 4.093 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.86%, 1.64%, 2.40%。

### 2.7 稳定性实验

精密吸取同一份供试品溶液(批号 100214) 20 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样测定。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内基本稳定, 硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、消旋山莨菪碱的峰面积的 RSD (n=8) 分别为 2.58%, 2.32%, 2.28%。

## 2.8 加样回收率实验

取已知含量的供试品(批号 100214)粉末约 0.1 g 共 6 份,精密称定,每份样品分别精密加入对照品溶液 5  $\mu$ L(硫酸阿托品 0.361 mg, 氢溴酸东莨菪碱 0.223 mg 和消旋山莨菪碱 0.549 mg),按“2.2.2”项下方法制备溶液,分别进样测定,结果见表 1。

## 2.9 样品含量测定

分别取华山参滴丸 3 批样品,按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别测定,用外标法计算含量,结果见表 2。

## 3 讨论

### 3.1 测定方法的选择

经文献查阅,目前尚未见用高效液相色谱法同时测定中药华山参及其制剂中阿托品、东莨菪碱和山莨菪碱这 3 种主要有效成分的报道,并且所建立的含量测定方法与药典收载的紫外分光光度法相比较,具有准确、快速、样品用量少、精密度高等优点;与文献<sup>[7-9]</sup>所报道的同属植物及含有相关成分的制剂含量测定方法相比较,具有样品处理方法简便、重现性好和切实可行等特点,因此此含量测定方法为药品生产中质量控制提供了重要的参考依据。

### 3.2 流动相的选择

消旋山莨菪碱为消旋体,它是左旋体和右旋体的混合物。本实验中通过控制流动相中甲醇的比例,使得山莨菪碱左右消旋体能够完全分离,并且以左右消旋体保留面积的总和计算消旋山莨菪碱的含

表 1 华山参滴丸样品加样回收率结果,  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 6 \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Returns ratio in Huashan Shen dripping pills,  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 6 \bar{x} \pm s$

Compound	Quantity in sample	Added quantity	Determined quantity	Recovery %
Atropine sulfate	0.430 $\pm$ 0.015	0.361 $\pm$ 0.002	0.805 $\pm$ 0.023	101.82 $\pm$ 2.89
Scopolamine hydrobromide	0.199 $\pm$ 0.019	0.223 $\pm$ 0.002	0.423 $\pm$ 0.011	100.17 $\pm$ 2.47
Racanisodamine	0.409 $\pm$ 0.024	0.549 $\pm$ 0.002	0.945 $\pm$ 0.022	98.68 $\pm$ 2.33

表 2 华山参滴丸样品含量测定结果,  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 6 \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Determination results of atropine sulfate, scopolamine hydrobromide and racanisodamine in Huashan Shen dripping pills,  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 6 \bar{x} \pm s$

Lot No.	Atropine sulfate	Scopolamine hydrobromide	Racanisodamine
091223	4.312 $\pm$ 0.018	1.817 $\pm$ 0.020	4.031 $\pm$ 0.017
100214	4.296 $\pm$ 0.021	1.985 $\pm$ 0.017	4.093 $\pm$ 0.026
100107	4.193 $\pm$ 0.028	1.907 $\pm$ 0.024	4.095 $\pm$ 0.028

量。在实验过程中发现,随着甲醇比例的变化,在左右消旋体色谱峰间有一个小的干扰杂质峰使分离不太理想,最终在甲醇与醋酸铵水溶液比例在 30:70 时,获得了较满意的分离,保留时间也在合适范围。

### 3.3 样品前处理方法的选择

在供试品溶液制备方法考察时,本实验对比了用三氯甲烷<sup>[9]</sup>、乙醚<sup>[7]</sup>、醋酸乙酯、0.02  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 水溶液<sup>[10]</sup>和甲醇等多种提取处理方法,其中三氯甲烷、乙醚、醋酸乙酯萃取样品杂质峰较少,但提取回收率较低,且平行实验误差较大,重现性不好;用 0.02  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 水溶液提取的样品杂质峰过大,严重影响了样品峰出峰的效果,尤其影响了山莨菪碱左右消旋体的分离,对含量测定造成了困难。经过多次选择,用甲醇溶解,再经浓氨水调节 pH、超声、离心,取上清液过滤进样的效果最好,提取较完全。其中 pH 值调为 9.0 超声提取时间为 30 min 提取效果最佳。

## REFERENCES

- [1] ZHANG Q S, XUE L, XIE C X. Clinical observation on curing bronchial asthma by the dripping pills of *Physochlaina infundibularis* Kuang [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2001, 13(3): 61-62
- [2] *Ch. P* 2005. Vol I (中国药典 2005 年版. 一部) [S]. 2005: 94
- [3] LU C X, HU Y X, LIN N, et al. Isolation of scopoletin from *Physochlaina infundibularis* Kuang by high speed counter current chromatography [J]. *Chem Res* (化学研究), 2009, 20(2): 101-103.
- [4] LIS W, ZHAO Y R, QING W X, et al. Research development of *Physochlaina infundibularis* Kuang [J]. *J Jiyuan Coll Prof Tech* (济源职业技术学院学报), 2005, 4(2): 8-10
- [5] LIS W, QING W X, WANG W L, et al. A analysis of essential oil from *Physochlaina infundibularis* Kuang by GC/MS [J]. *J Henan Univ* (河南大学学报), 2005, 35(3): 34-36
- [6] WANG Y, QING W X, LIS W, et al. Determination of scopoletin in *Physochlaina infundibularis* Kuang by TLCs [J]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2005, 3(5): 42-45.
- [7] JIN B F, YANG X J, BISI L. Analysis of three active constituents in the preparations of Belladonna and Hyoscyamus by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(4): 26-28
- [8] ZHANG N, GUO X H, ZHANG Z Z. Determination of three main components in Belladonna Tablets by RP-HPLC [J]. *J Med Forum* (医药论坛杂志), 2005, 26(19): 21-23
- [9] WANG H, SHEN J W, ZHANG X F. Research on the relationship of elevation and four alkaloids content of *Anisodus tanguticus* [J]. *J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2002, 27(2): 151-152
- [10] LIX Y, FENG Z, WU Y H, et al. Determination of scopolamine in the Chuanping Dripping pills by RP-HPLC [J]. *Lishichen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2009, 20(6): 1377-1378.

(收稿日期: 2010-05-07)