

# Simultaneous Determination of Protopine and Palmatine Chloride in Qingnaozhitong Capsule by HPLC

Zhengming Hu<sup>1</sup>, Yan Zhang<sup>2</sup>, Jing Ji<sup>2</sup>, Jianming Chen<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmacy Department, Chuzhou Hospital of Huaian, Huaian Jiangsu

<sup>2</sup>College of Pharmaceutical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu

Email: \*cjm7895@163.com

Received: Nov. 8<sup>th</sup>, 2017; accepted: Nov. 22<sup>nd</sup>, 2017; published: Nov. 29<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

Qingnaozhitong Capsule is mainly composed with Radix Paeoniae Alba, *Ligusticum wallichii*, Radices Paeoniae Alba, Rhizoma Corydalis, *Tribulus terrestris*, *Angelica dahurica*, Acanthopanax Senticosus and Corydalis Amabilis which are processed by steam distillation, water extraction and alcohol extraction. They have the effect of activating blood, relieving pain and calming the nerves. The content of paeoniflorin in Radix Paeoniae Alba was determined by the existing quality standards. Radices Paeoniae Alba, Corydalis Amabilis, Rhizoma Corydalis and Acanthopanax Senticosus were identified by TLC. Paeoniflorin is from water extraction, in order to control the quality of products further. HPLC was used to determinate protopine hydrochloride and Pakistan Martin, which is extracted by ethanol from Rhizoma Corydalis. The results show that the method is sensitive, rapid and reliable, and can be used for quality control of Qingnaozhitong capsule.

## Keywords

Qingnaozhitong, HPLC, Protopine, Palmatine Chloride

# HPLC法同时测定清脑止痛胶囊中原阿片碱和盐酸巴马汀含量

胡正明<sup>1</sup>, 张焱<sup>2</sup>, 嵇晶<sup>2</sup>, 程建明<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>江苏省淮安市淮安医院药剂科, 江苏 淮安

<sup>2</sup>南京中医药大学药学院, 江苏 南京

\*通讯作者。

Email: \*cjm7895@163.com

收稿日期: 2017年11月8日; 录用日期: 2017年11月22日; 发布日期: 2017年11月29日

## 摘要

清脑止痛胶囊主要由白芍、川芎、葛根、延胡索、蒺藜、白芷、刺五加、夏天无八味药经过水蒸气蒸馏、水提、醇提三种工艺制备, 具有祛风活血、止痛安神的功效。现有质量标准对君药白芍所含芍药苷进行了含量测定, 并对葛根、夏天无、延胡索、刺五加的薄层进行了鉴别, 方法稳定可行[1] [2]。白芍为水提药材, 为进一步控制产品质量, 本文采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定清脑止痛胶囊中醇提部位夏天无中原阿片碱和盐酸巴马汀的含量[1]-[10], 研究结果表明, 本方法灵敏、快速、可靠, 可用于清脑止痛胶囊的质量控制。

## 关键词

清脑止痛, 液相色谱, 原阿片碱, 盐酸巴马汀

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 仪器与试剂

### 1.1. 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2489 UV 检测器, TGL-16G 型高速离心机, KQ-500DE 型数控超声波清洗器, BP-211D 型电子天平, LD-UPW 理化分析型超纯水机。

### 1.2. 试剂

清脑止痛胶囊, 江苏康缘药业股份有限公司, 批号: 20161029、20161030、20161102。对照品盐酸巴马汀(批号 110732-201309 纯度 86.6%)和原阿片碱(批号 110853-201404, 纯度 99.7%)均购自中国食品药品检定研究院。仪器用甲醇、乙腈均为色谱纯产自美国 TEDIA 公司。屈臣氏饮用水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司, 批号: 20170105。冰乙酸, 南京晚晴化玻仪器有限公司, 批号: C1717067。三乙胺, 天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20060830。分析纯甲醇, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20170117。

## 2. 方法与结果

### 色谱条件

色谱柱: Hedera ODS-2 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈(A)-三乙胺醋酸溶液(取三乙胺 8 ml, 冰醋酸 30 ml, 加水稀释至 1000 ml) (B)为流动相梯度洗脱, 流速为 1 ml/min, 检测波长分别为 289 nm、345 nm [1] [2], 柱温为 30℃, 进样量 10 μL。梯度洗脱条件见表 1。

**Table 1.** Gradient elution conditions**表 1.** 梯度洗脱条件

时间(min)	A%	B%
0	23	77
30	40	60

### 3. 溶液制备

#### 3.1. 对照品溶液制备

精密称取原阿片碱对照品 11.46 mg, 置 50 ml 容量瓶中, 加 1% 盐酸溶液 5 ml 使溶解, 再加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。另精密称定盐酸巴马汀对照品 9.52 mg, 置 100 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述两种溶液各 5 ml, 置同一 25 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成每 1 ml 分别含原阿片碱 45.84  $\mu\text{g}$ 、盐酸巴马汀 19.04  $\mu\text{g}$  的对照品溶液。

#### 3.2. 供试品溶液制备

取清脑止痛胶囊约 0.8 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇 50 ml, 称定重量, 摇匀, 密塞, 超声提取 30 分钟(功率 500 W, 频率 24 KHz), 静置放冷, 用 70% 甲醇溶液补减失的重量, 以 12,000 r/min 离心 10 分钟, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 取续滤液进样分析。

### 4. 系统适应性考察

#### 4.1. 线性关系考察

精密称取原阿片碱 5.18 mg, 用 1% 盐酸 2.5 ml 溶解, 置 25ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成浓度 207.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的母液, 采用逐级稀释法用甲醇分别配成含原阿片碱 6.475  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.95  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、51.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、103.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  对照品系列溶液。各取 10  $\mu\text{l}$  进样分析, 记录峰面积。以峰面积 Y 对进样浓度 X( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 进行线性回归, 求得原阿片碱回归方程为:  $Y = 12993X - 7280.1$  ( $R^2 = 0.9999$ ), 线性范围: 6.475~103.6。

精密称取盐酸巴马汀 5.13 mg, 置于 50 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成浓度为 102.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的母液, 采用逐级稀释法用甲醇分别配成含盐酸巴马汀 3.20625  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6.4125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.825  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25.65  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、51.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  对照品系列溶液。各取 10  $\mu\text{l}$  进样分析, 记录峰面积。以峰面积 Y 对进样浓度 X( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 进行线性回归, 求得盐酸巴马汀的回归方程为:  $Y = 37067X + 13277$  ( $R^2 = 0.9999$ ), 线性范围: 3.2065~51.3。

#### 4.2. 精密度试验

取混合对照品溶液, 按上述色谱条件连续测定 6 次, 记录原阿片碱和盐酸巴马汀的峰面积和 RSD, 结果原阿片碱、盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 2.03% 和 2.94%, 说明本方法精密度良好。

#### 4.3. 重复性试验

取清脑止痛胶囊样品 6 份, 每份约 0.8 g, 按照供试品溶液的制备方法制备, 各进样 10  $\mu\text{l}$  进样, 按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积。结果样品中原阿片碱和盐酸巴马汀峰面积的 RSD 分别为 1.69%、0.91%, 表明该方法重复性良好。

#### 4.4. 稳定性试验

取清脑止痛胶囊样品 1 份, 按照供试品溶液的制备方法制备, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 测定样品中各组分的峰面积, 10 小时内原阿片碱和盐酸巴马汀峰面积相对标准偏差分别为 1.72%、0.94%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

#### 4.5. 加样回收率试验

##### 4.5.1. 原阿片碱的加样回收试验

称取原阿片碱对照品适量, 精密称定置 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成每 1 ml 含原阿片碱 95.6  $\mu\text{g}$  的对照品溶液。

精密称取 9 份已知含量的供试品约 0.4 g, 置于 100 ml 锥形瓶中, 分成三份, 每份分别精密加入 2.5 ml、5 ml、7.5 ml 的原阿片碱对照品溶液以及 70% 甲醇 47.5 ml、45 ml、42.5 ml, 称重, 超声 30 分钟, 放冷补足重量, 以 10,000 r/min 离心 10 分钟, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 按上述液相方法取续滤液进样分析, 记录峰面积, 计算含量。按照药典规定, 加样回收率范围为 90%~108%。结果加样回收率在 93%~102%, 说明本方法可行。

##### 4.5.2. 盐酸巴马汀加样回收率

称取盐酸巴马汀对照品适量, 精密称定置 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成每 1 ml 含盐酸巴马汀 33.5  $\mu\text{g}$ 。

精密称取 9 份已知含量的供试品约 0.4 g, 置于 100 ml 锥形瓶中, 分成三份, 每份分别精密加入 2.5 ml、5 ml、7.5 ml 的盐酸巴马汀对照品溶液以及 70% 甲醇 47.5 ml、45 ml、42.5 ml, 称重, 超声 30 分钟, 放冷补足重量, 以 12,000 r/min 离心 10 分钟, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 取续滤液按上述液相方法进行进样分析。记录峰面积, 计算结果。按照药典规定, 加样回收率范围为 85%~110%。结果加样回收率结果 87%~110%, 说明本方法可行。

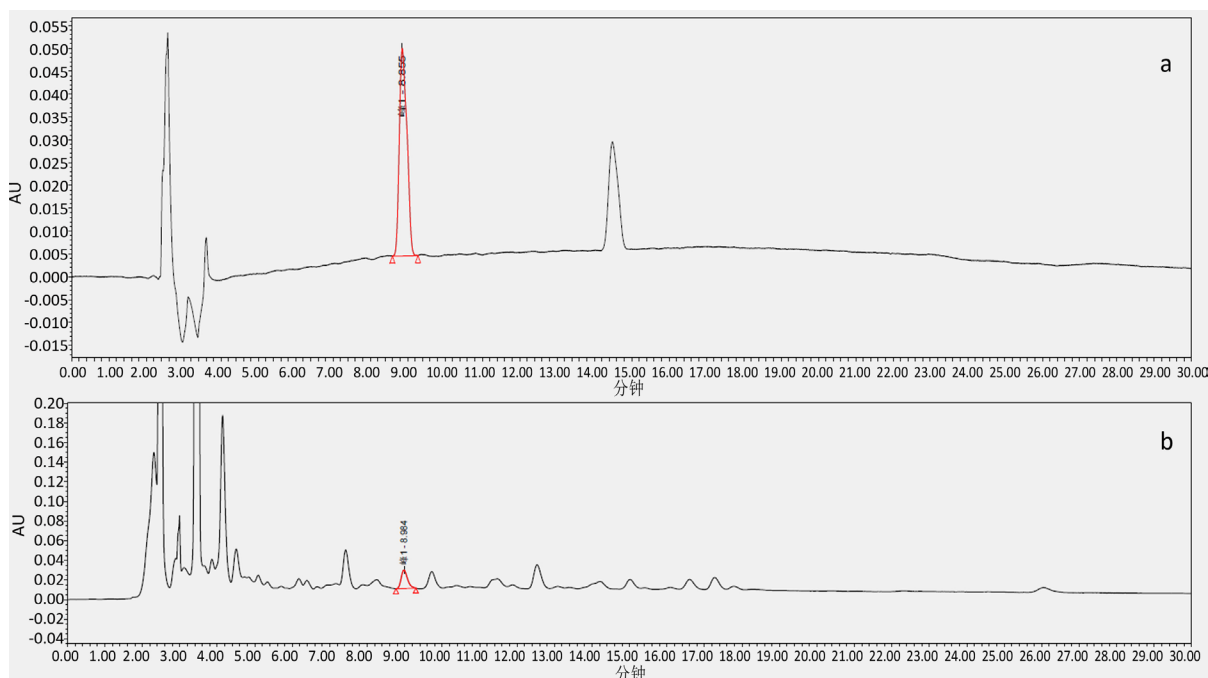
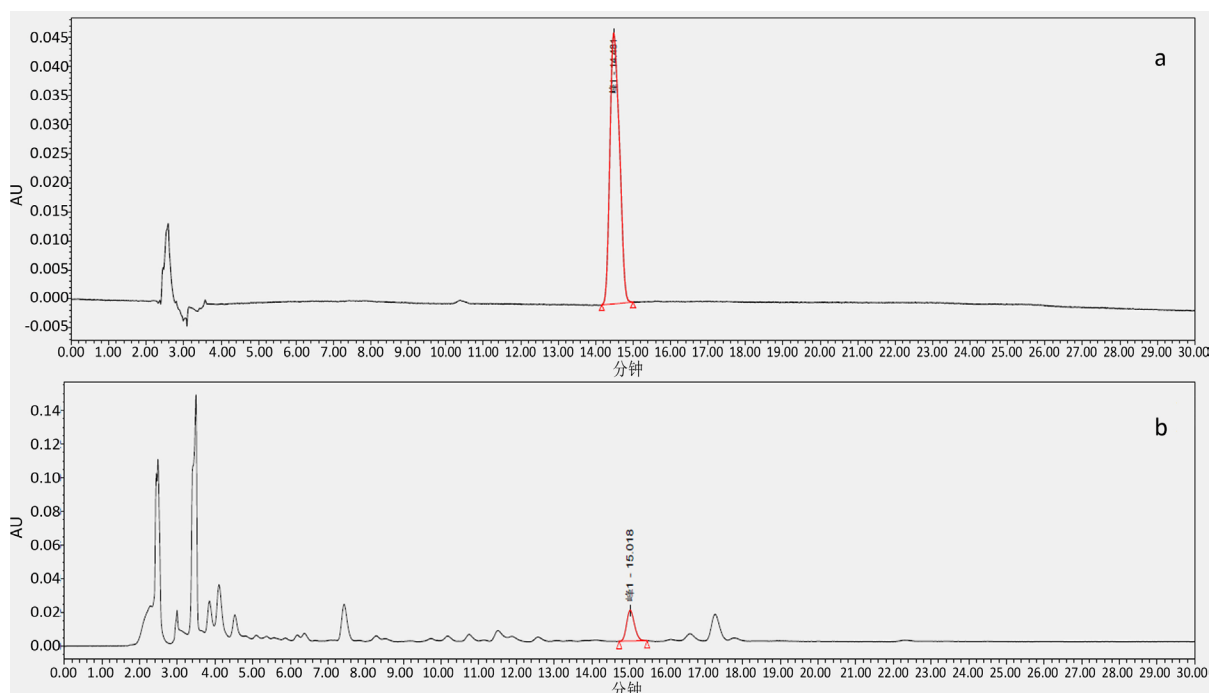


Figure 1. (a) Chromatogram of reference substance at 289nm; (b) Sample solution

图 1. (a) 混合对照品 289 nm 色谱图: 原阿片碱 (45.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); (b) 为样品色谱图



**Figure 2.** (a) Chromatogram of reference substance at 345 nm; (b) Sample solution  
**图 2.** (a) 混合对照品 345 nm 色谱图: 盐酸巴马汀(19.04  $\mu\text{g/mL}$ ); (b) 为样品色谱图

**Table 2.** Determination result of sample

**表 2.** 清脑止痛胶囊样品含量检测结果

批次	样品重/g	峰面积		含量 mg/g		平均含量 mg/g	
		原阿片碱	盐酸巴马汀	原阿片碱	盐酸巴马汀	原阿片碱	盐酸巴马汀
1	0.7996	176919	166557	0.89	0.26		
2	0.7999	172922	172104	0.87	0.27	0.87	0.26
3	0.8003	170031	172088	0.85	0.27		

#### 4.6. 样品含量测定结果

此清脑止痛方中白芍为君药, 工艺流程分为水提和醇提两部分, 原质量标准中以君药白芍苷为定量检测对象。现根据工艺路线增加醇提药材的定量检查。醇提药材中因为延胡索乙素有阴性干扰, 故选择夏天无中的原阿片碱和盐酸巴马汀为定量检测对象。本文采用 HPLC 法测定清脑止痛胶囊中主要原阿片碱和盐酸巴马汀的含量(如图 1、图 2)。取 2 批制剂, 按照上述供试品溶液的制备方法制备供试品, 依上述色谱条件测定含量, 每批制剂平行三次测定。计算制剂中原阿片碱和盐酸巴马汀的含量(结果见表 2)。该方法简便、易操作, 结果准确、重现性好, 可作为今后清脑止痛胶囊的质量控制方法。

### 5. 结果及讨论

清脑止痛胶囊中醇提部位有延胡索和夏天无两种药材, 因两种药材都含有延胡索乙素, 故选择没有阴性干扰的盐酸巴马汀和阿片碱为测定对象。根据所测 2 批样品的含量结果, 清脑止痛胶囊中原阿片碱的平均含量为 0.80 mg/g, 盐酸巴马汀的平均含量为 0.23 mg/g。因此可规定清脑止痛胶囊中原阿片碱含量

不得少于 0.70 mg/g, 盐酸巴马汀的含量不得少于 0.20 mg/g。在提取溶剂相同情况下, 本实验比较超声提取、索氏提取、回流提取三种提取方法, 超声提取和回流提取的含量率高于索氏提取; 而与回流提取比较, 超声提取的效率更高, 操作更便捷, 故选用超声提取。

## 基金项目

“QNZT 胶囊”药学补充研究。

## 参考文献 (References)

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京中国医药出版社, 2015: 279.
- [2] National Pharmacopoeia Committee. (2015) The Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing Chinese Medicine Press, Beijing, 279.
- [3] 袁劲松, 古桂花, 曾薇, 等. HPLC 法同时测定夏天无中 11 种生物碱的含量[J]. 中药材, 2013, 36(8): 1283-1287.
- [4] Yuan, J.-S., Gu, G.-H., Ceng, W., *et al.* (2013) HPLC Method to Determine the Content of 11 Kinds of Alkaloids in Corydalis. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, **36**, 1283-1287.
- [5] 龙项, 胡还甫. 高效液相色谱法测定不同产地夏天无药材中 5 种生物碱的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(13): 1104-1106.
- [6] Xiang, L. and Hu, H.-F. (2013) High Performance Liquid Chromatography Determination of Different Origin No Medicinal Material Content of 5 Kinds of Alkaloids in Summer. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, **33**, 1104-1106.
- [7] 曾岗, 张洁. 高效液相色谱法测定夏天无胶囊中原阿片碱、盐酸巴马汀和比枯枯灵碱的含量[J]. 中南药学, 2014(6): 588-591.
- [8] Zeng, G. and Zhang, J. (2014) The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method Was Used to Determine the Content of Opioids in the Summer Capsules without Capsules, Bamadine Hydrochloride, and the Ratio of Paraquinine. *Chinese Medicine*, No. 6, 588-591.
- [9] 邵军. 夏天无提取物质量标准研究[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 南昌大学医学院, 2015.
- [10] Jun, S. (2015) Research on the Quality of Free Extract in Summer. Nanchang University Medical School, Nanchang.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-441X, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [pi@hanspub.org](mailto:pi@hanspub.org)