

高效毛细管电泳分离测定颠茄制剂中莨菪类生物碱

中国药科大学药物分析室(南京 210009)

林 梅*

张正行 安登魁

上海长海医院临床药理学室

范国荣

胡晋红

摘 要 选择毛细管区带电泳分离模式,以麻黄素为内标建立了适合莨菪类生物碱阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、樟柳碱优化分离与颠茄酞剂及片剂定量分析的高效毛细管电泳方法。电泳分离条件:毛细管 $40\text{ cm} \times 50\text{ }\mu\text{m}$,运行缓冲液(pH 8.0)50 mmol/L 磷酸盐溶液-四氢呋喃(9:1),电迁移进样 $5\text{ kV} \times 5\text{ s}$,运行电压 $11\text{ kV}(+) \rightarrow (-)$,柱上检测 UV 200 nm,0.02 AUFS,毛细管柱温 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。本法简便、快速、重现性好,可用于含莨菪类生物碱中药制剂的质量控制。

关键词 高效毛细管电泳 阿托品 东莨菪碱 山莨菪碱 樟柳碱 颠茄

莨菪类生物碱种类繁多,广泛存在于茄科植物莨菪 *Hyoscyamus niger* L. 种子(天仙子)、东莨菪 *Scopolia japonica* Maxim. 根、颠茄 *Atropa belladonna* L. 叶、白花曼陀罗 *Datura metel* L. 花(洋金花)及唐古特山莨菪 *Anisodus tanguticus* Pascher 根、种子中,阿托品(DL-莨菪碱)、东莨菪碱、山莨菪碱及樟柳碱是其中 4 种主要的莨菪类生物碱,具有重要的医疗用途^[1,2]。目前其分析的方法有薄层扫描法、气相色谱法和高效液相色谱法^[3~5],高效毛细管电泳(HPCE)在一些中药有效成分分离分析方面获得了成功的应用^[6,7]。我们将高效毛细管电泳应用于莨菪类生物碱阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、樟柳碱的系统分离及颠茄酞剂及片剂的定量分析。

1 仪器与试药

BioFocus 3000 高效毛细管电泳仪(Bio-Rad, USA),pHs-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。标准对照品阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱由中国药品生物制品检定所提供,樟柳碱由解放军总医院制剂室提供。颠茄酞剂为上

海美优制药厂产品,颠茄片剂为上海黄河制药厂产品。

2 方法与结果

2.1 电泳分离条件:毛细管 $40\text{ cm} \times 50\text{ }\mu\text{m}$,缓冲液 50 mmol/L 磷酸盐溶液(pH 8.0)-四氢呋喃(9:1),电迁移进样 $5\text{ kV} \times 5\text{ s}$,运行电压 $11\text{ kV}(+) \rightarrow (-)$,柱上检测 UV200 nm,0.02 AUFS,毛细管柱温 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

麻黄素为内标,在优选的电泳分离条件下,阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、樟柳碱系统分离的电泳谱图见图 1A,其中麻黄素 t_m 4.62 min,阿托品 t_m 4.91 min,东莨菪碱 t_m 5.51 min,山莨菪碱 t_m 5.13 min,樟柳碱 t_m 5.66 min。

2.2 标准曲线制备:精密称取阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱及内标麻黄素适量(5 mg~10 mg),用重蒸水溶解定容至 10 mL 量瓶中,作为标准对照品贮备液和内标贮备液。精密吸取各贮备液一定量,置于同一 5 mL 量瓶中,配制成含阿托品 $600\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、山莨菪碱 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、东莨菪碱 $90\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合标准

* Address: Lin Mei, Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing

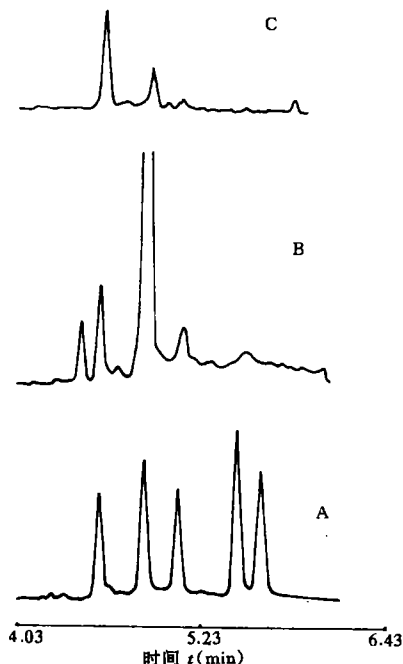
林 梅 女,讲师。1993 年毕业于中国药科大学获药物分析学硕士学位,留校从事药物分析的教学与科研工作。现在攻读中国药科大学博士学位,开展中药质量控制与体内动态分析的毛细管电泳研究。近年来在药物代谢动力学与中药毛细管电泳分离分析方面做了一些工作,发表论文十余篇。

液。用重蒸水稀释内标贮备液,配制成 140 $\mu\text{g/mL}$ 的麻黄素内标溶液。分别准确吸取混合标准液 50、100、150、200、250 μL ,加内标液 100 μL ,用重蒸水稀释定容至 1 mL,混匀。取 50 μL 以 2000 r/min 离心 5 min 后,置电泳仪中进样分析。以莨菪类生物碱峰面积与内标峰面积比(Y)对相应的浓度(C)进行线性回归,计算回归方程,即阿托品(DL-莨菪碱) $Y_1=0.03220+0.07003C, r=0.9992$,定量线性范围 30 $\mu\text{g/mL}$ ~150 $\mu\text{g/mL}$;山莨菪碱 $Y_2=0.03040+0.07827C, r=0.9999$,定量线性范围 5.0 $\mu\text{g/mL}$ ~25 $\mu\text{g/mL}$;东莨菪碱 $Y_3=0.07470+0.04609C, r=0.9999$,定量线性范围 4.5 $\mu\text{g/mL}$ ~22.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 颠茄酊含量测定:准确吸取颠茄酊 400 μL ,加 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0) 100 μL ,加内标液 100 μL ,用重蒸水定容至 1 mL,混匀,以 2000 r/min 离心 5 min。准确吸取上清液 50 μL ,置于电泳仪中进样分析。图 1B 为颠茄酊 HPCE 电泳谱图,其中 t_m 4.65 min 为内标电泳峰, t_m 4.90 min 为阿托品(DL-莨菪碱)电泳峰, t_m 5.16 min 为山莨菪碱电泳峰, t_m 5.56 min 为东莨菪碱电泳峰,颠茄酊中未检出樟柳碱电泳峰。以标准曲线法计算颠茄酊中阿托品(DL-莨菪碱)浓度为 301.5 $\mu\text{g/mL}$,山莨菪碱的浓度为 14.32 $\mu\text{g/mL}$,东莨菪碱的浓度为 12.94 $\mu\text{g/mL}$ 。3 种莨菪碱总浓度为 328.8 $\mu\text{g/mL}$,即颠茄酊总生物碱含量为 0.03288%(g/mL),基本接近药典规定总生物碱含量应为:0.028%~0.032%(g/mL)的上限值。

2.4 颠茄片含量测定:随机取颠茄片 10 片,称量,求出平均片重,研细后称取相当于 1 片重粉末,加乙醇 5 mL,涡旋振荡 2 min,超声提取 5 min,4000 r/min 离心 5 min,取上清液转移至具塞刻度试管中备用。准确吸取颠茄片乙醇提取液 400 μL ,加 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0) 100 μL ,加麻黄素内标液 100 μL ,用重蒸水稀释定容至 1 mL,混匀,2000 r/min 离心 5 min。准确吸取 50 μL 上

清液,置电泳仪样品盘中进样分析。图 1C 为颠茄片 HPCE 电泳谱图,其中 t_m 4.68 min 为麻黄素内标峰, t_m 4.97 min 为阿托品(DL-莨菪碱)峰, t_m 5.16 min 为微量山莨菪碱峰。颠茄片中阿托品(DL-莨菪碱)含量 73.98 μg ,检出的山莨菪碱含量约为 8.63 μg (峰面积比较估算),即每片颠茄片中含总生物碱为 0.08261 mg,与颠茄片标示量每片 0.08 mg 基本一致。



A-标准对照品 B-颠茄酊样品 C-颠茄片样品

图1 莨菪类生物碱毛细管电泳分离谱图

2.5 精密度试验:标准对照品混合液,在上述电泳分离条件下,按“标准曲线制备”项下配制进样溶液,连续进样 6 次,结果求得阿托品浓度 RSD 2.4%,迁移时间 RSD 1.1%;山莨菪碱浓度 RSD 1.8%,迁移时间 RSD 1.5%,东莨菪碱浓度 RSD 2.6%,迁移时间 RSD 0.97%。

2.6 重现性试验:按样品测定方法,对颠茄制剂进行 5 次平行试验,结果颠茄酊中阿托品浓度 RSD 1.8%,山莨菪碱浓度 RSD 2.4%,东莨菪碱浓度 RSD 2.1%;颠茄片中阿托品浓度 RSD 2.2%,山莨菪碱浓度 RSD 3.6%。

2.7. 加样回收率试验:准确吸取已知含量的颠茄酊 200 μL ;加入一定量的标准对照品阿托品溶液 100 μL (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、山莨菪碱溶液 100 μL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、东莨菪碱溶液 100 μL (90 $\mu\text{g}/\text{mL}$),按颠茄酊含量测定方法处理,计算颠茄酊的加样回收率,结果阿托品为 98.78%($n=3$), RSD 2.1%;山莨菪碱为 101.4%($n=3$), RSD 1.6%;东莨菪碱为 98.61%($n=3$), RSD 1.9%。精密称取相当于 1 片重量的已知含量的颠茄片粉,加入一定量的标准对照品阿托品溶液 1 mL(600 $\mu\text{g}/\text{mL}$),按颠茄片含量测定方法处理,计算颠茄片加样回收率,结果阿托品为 97.25%($n=3$), RSD 2.5%。

3 讨论

3.1 考察了 HPCE 各种操作参数如缓冲液 pH、运行电压及有机溶剂添加剂对莨菪类生物碱电泳分离的影响,其中 10%四氢呋喃的加入,明显地改善了较难分离的东莨菪碱与樟柳碱的分离度。在兼顾分离效率和分析速度的前提下,优选电泳分离条件为:运行电压 11 kV(+)→(-),缓冲液 50 mmol/L 磷酸

盐(pH8.0)-四氢呋喃(9:1)。

3.2 颠茄酊样品分析,仅为缓冲液稀释,简便快速。颠茄片样品处理,以乙醇直接提取,回收率高,重现性好。实验还考察了涡旋振荡 5 min、超声提取 5 min 和涡旋振荡 2 min 后再超声提取 5 min,测定结果后者提取颠茄片中阿托品(DL-莨菪碱)峰面积最高,且 3 次重现性较好。

3.3 HPCE 在莨菪类生物碱系统分离和颠茄制剂含量测定方面的成功应用,为中药质量控制提供了一种新型的检测工具。

参考文献

- 1 国家医药管理局中草药情报中心站编. 植物药有效成分手册. 北京:人民卫生出版社,1986;59,60,101,941
- 2 王 朴,等. 药学通报,1988;23(9):515
- 3 沙世炎,等. 中草药有效成分分析法(上册). 北京:人民卫生出版社,1982;11,220,245
- 4 李海生,等. 药物分析杂志,1990;10(6):324
- 5 Kuhr W G. Anal Chem,1990;62:403R
- 6 靳朝东,等. 国外医药·植物药分册,1995;10(5):201
- 7 宗玉英,等. 药学学报,1995;30(8):594

(1997-09-18 收稿)

Systematic Separation and Quantitative Analysis of Tropane Alkaloids in Belladonna Preparation by High Performance Capillary Electrophoresis

Lin Mei, Fan Guorong, Zhang Zhengxing, *et al* (Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

Abstract A high performance capillary electrophoresis (HPCE) method was established for the systematic separation of tropane alkaloids, i. e., atropine, scopolamine, anisodamine and anisodine, and quantitative analysis of Tincture and Tablet Belladonna, based on the mode of capillary zone electrophoresis. A buffer solution composed of 50 mmol/L sodium dihydrogenphosphate at pH8.0 containing 10% tetrahydrofuran was found to be the most suitable electrolyte for this separation. The electromigration was performed on the 40 cm $\times$ 50 μm uncoated capillary with a 11 kV running voltage. The analytes were monitored by on-line ultraviolet (UV) detection at 200 nm and ephedrine was selected as internal standard. The analytical results demonstrated the method was simple, rapid and well reproducible and could be used as a reliable tool for the quality control of Chinese medicines containing tropane alkaloids.

Key words High performance capillary electrophoresis belladonna tropane alkaloids