

RP-HPLC 法测定热感赛比斯坦颗粒中 3 种生物碱成分的含量*

刘新豫¹, 司晓萍², 唐辉^{1**}, 庞克坚³, 翟欣¹, 孙小雅¹, 王亚乔¹

(1. 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 石河子大学药学院, 石河子 832002;

2. 新疆第八师石河子市药品检验所, 石河子 832000; 3. 和田维吾尔药业有限责任公司, 和田 848200)

摘要 目的: 建立热感赛比斯坦颗粒中吗啡、可待因和罂粟碱 3 种生物碱成分的含量测定方法。方法: 采用高效液相法进行定量分析。吗啡含量测定选用 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾和 0.05 mol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠混合水溶液 (pH 3.1) (2:98) 为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm; 柱温 28 °C。可待因和罂粟碱含量测定选用 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A)-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾和 0.05 mol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠混合水溶液 (pH 3.8) (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~18 min, 2%A→40%A; 18~25 min, 40%A→52%A), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长分别为 220 nm 和 257 nm, 柱温 28 °C。结果: 吗啡、磷酸可待因和盐酸罂粟碱进样量分别在 0.119~23.760、0.057~3.983 和 0.022~3.906 μg 范围内, 与峰面积线性关系良好 ($r=0.999\ 2\sim0.999\ 9$), 平均回收率 ($n=6$) 分别为 100.2%、100.0% 和 100.2%。3 批样品中吗啡、可待因和罂粟碱的含量分别为 0.030~0.031、0.440~0.444 和 0.011~0.012 mg·g⁻¹。结论: 该方法可用于热感赛比斯坦颗粒中 3 种生物碱的含量测定。

关键词: 维吾尔药; 感冒验方; 民族药; 热感赛比斯坦颗粒; 罂粟壳; 生物碱; 吗啡; 可待因; 罂粟碱; 高效液相色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 05-0897-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.05.22

Determination of 3 alkaloids in Regan Saibisitan granules by RP-HPLC method*

LIU Xin-yu¹, SI Xiao-ping², TANG Hui^{1**}, PANG Ke-jian³,
ZHAI Xin¹, SUN Xiao-ya¹, WANG Ya-qiao¹(1. Key Laboratory of the Ministry of Education of Xinjiang Special Plant Medicinal Resources,
Pharmacy School of Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. Xinjiang Eighth Division of the Shihezi Institute of Drug Inspection, Shihezi 832000, China;

3. Hotan Uygur Pharmaceutical Co., Ltd., Hotan 848200, China)

Abstract **Objective:** To establish the method for determination of morphine, codeine and papaverine in Regan Saibisitan granules. **Methods:** High performance liquid chromatography method was employed for the analyses of three alkaloids in Regan Saibisitan granules. Morphine analysis was carried out on C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ monopotassium phosphate and 0.05 mol·L⁻¹

* 国家自然科学基金 (81260627); 八师石河子市科技计划项目 (2016HZ32)

** 通信作者 Tel: 13909938508; E-mail: Tanghuishz@qq.com

第一作者 Tel: 18799751191; E-mail: 1123241947@qq.com

sodium heptanesulfonate solution (pH 3.1) (2:98). The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the detection wavelength was 220 nm. The column temperature was maintained at 28°C . Analyses of codeine and papaverine were carried out on C_{18} column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of acetonitrile (A) – 0.01 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ monopotassium phosphate and 0.05 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ sodium heptanesulfonate solution (pH 3.8) (B) by gradient elution (0–18 min, 2%A $\rightarrow$ 40%A; 18–25 min, 40%A $\rightarrow$ 52%A). The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the detection wavelengths were 220 nm and 257 nm. The column temperature was maintained at 28°C . **Results:** The linear ranges of morphine, codeine phosphate and papaverine hydrochloride were 0.119–23.760 μg ($r=0.999\ 8$), 0.057–3.983 μg ($r=0.999\ 9$) and 0.022–3.906 μg ($r=0.999\ 2$), respectively. The average recoveries ($n=6$) were 100.2%, 100.0% and 100.2%, respectively. The contents of morphine, codeine and papaverine in 3 samples were 0.030–0.031 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 0.440–0.444 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and 0.011–0.012 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The established determination method is proved by methodology validation that it can be used for the detection of 3 alkaloids of opium poppy shell and seed in Regan Saibisitan granules.

Keywords: Uygur medicine; cold prescription; ethnodrug; Regan Saibisitan granules; poppy shell; alkaloid compounds; morphine; codeine; papaverine; high performance liquid chromatography

热感赛比斯坦颗粒是维吾尔民族治疗感冒的传统验方,处方由破布木果、罂粟壳、罂粟籽、大枣、甘草等 12 味药组成,收载于 1998 年版《中华人民共和国卫生部药品标准 维吾尔药分册》^[1],其处方中有毒药材罂粟壳和罂粟籽,主要药效成分是生物碱类,分别为吗啡、可待因、罂粟碱,具有显著的镇痛、镇咳作用^[2-3]。在现有部颁标准中只对罂粟壳与罂粟籽进行了定性鉴别,而关于热感赛比斯坦颗粒的含量测定未列入标准。贺金华等^[4]对热感赛比斯坦颗粒中的吗啡进行了定量分析,其样品提取方法比较繁杂,本研究对其进行简化并对流动相以及溶剂进行了优化,能够同时对热感赛比斯坦颗粒中另外 2 种生物碱可待因、罂粟碱进行 HPLC 测定。

1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪,配有 Waters e2695 分离单元、2998 二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站和打印机 (Waters 公司); xBridge[®] Shield RP18 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶; Waters 公司); 雷磁 PHS-3C 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); 移液枪 (Eppendorf 公司); AR124CN 电子天平 (OHAUS 公司)。

热感赛比斯坦颗粒 (批号 20150602、20150711、20150910) 由新疆和田维吾尔药业有限责任公司提供; 对照品吗啡 (批号 171201–201123)、磷酸可待因 (批号 171203–201005) 和盐酸罂粟碱 (批号 171214–201205) 均购于中国食品药品检定研究院,甲

醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取吗啡对照品 5.85 mg, 用含 5% 醋酸的 20% 甲醇水溶液定容至 25 mL 量瓶中,制成 0.237 6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的吗啡对照品储备液。精密称取对照品磷酸可待因 5.69 mg、盐酸罂粟碱 5.58 mg, 分别用乙腈定容至 25 mL 量瓶中,制成 0.227 6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的磷酸可待因对照品储备液和 0.223 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸罂粟碱对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液 取本品约 4.0 g, 精密称定,置具塞锥形瓶中,加氨水 4 mL, 充分湿润,放置 10 min, 加三氯甲烷 30 mL 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取 20 mL 蒸干浓缩, 加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得吗啡供试品溶液。取本品约 5.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 75% 乙醇 20 mL 超声 30 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 即得可待因、罂粟碱供试品溶液。

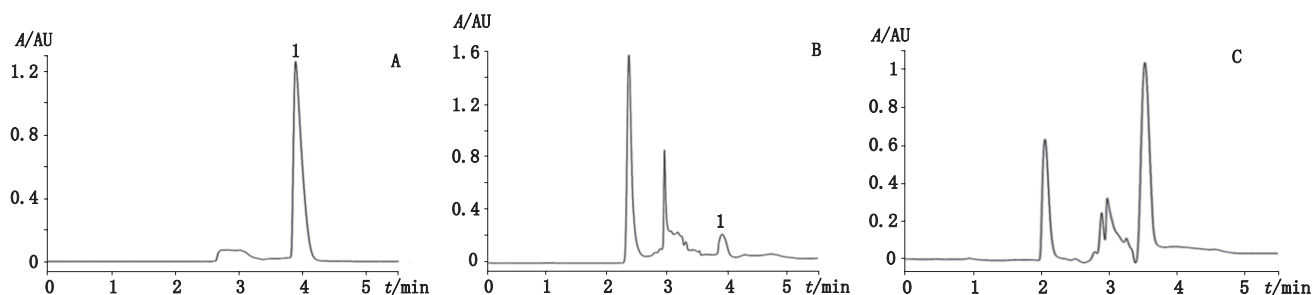
2.1.3 阴性对照品溶液 按处方比例及工艺自制不含罂粟壳、罂粟籽的阴性制剂。取阴性制剂约 4.5 g, 按“2.1.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2 色谱条件

吗啡: 采用 xBridge[®] Shield RP18 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 – 0.01 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾和 0.05 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 庚烷磺酸钠混合水溶液 (pH 3.1) (2:98) 为流动相, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 220 nm, 柱温 28°C , 进样量 20 μL ; 可待因、罂粟碱: 采用

xBridge® Shield RP18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)–0.01 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾和 0.05 mol · L⁻¹ 庚烷磺酸钠混合水溶液 (pH 3.8) (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~18 min, 2%A → 40%A; 18~25 min,

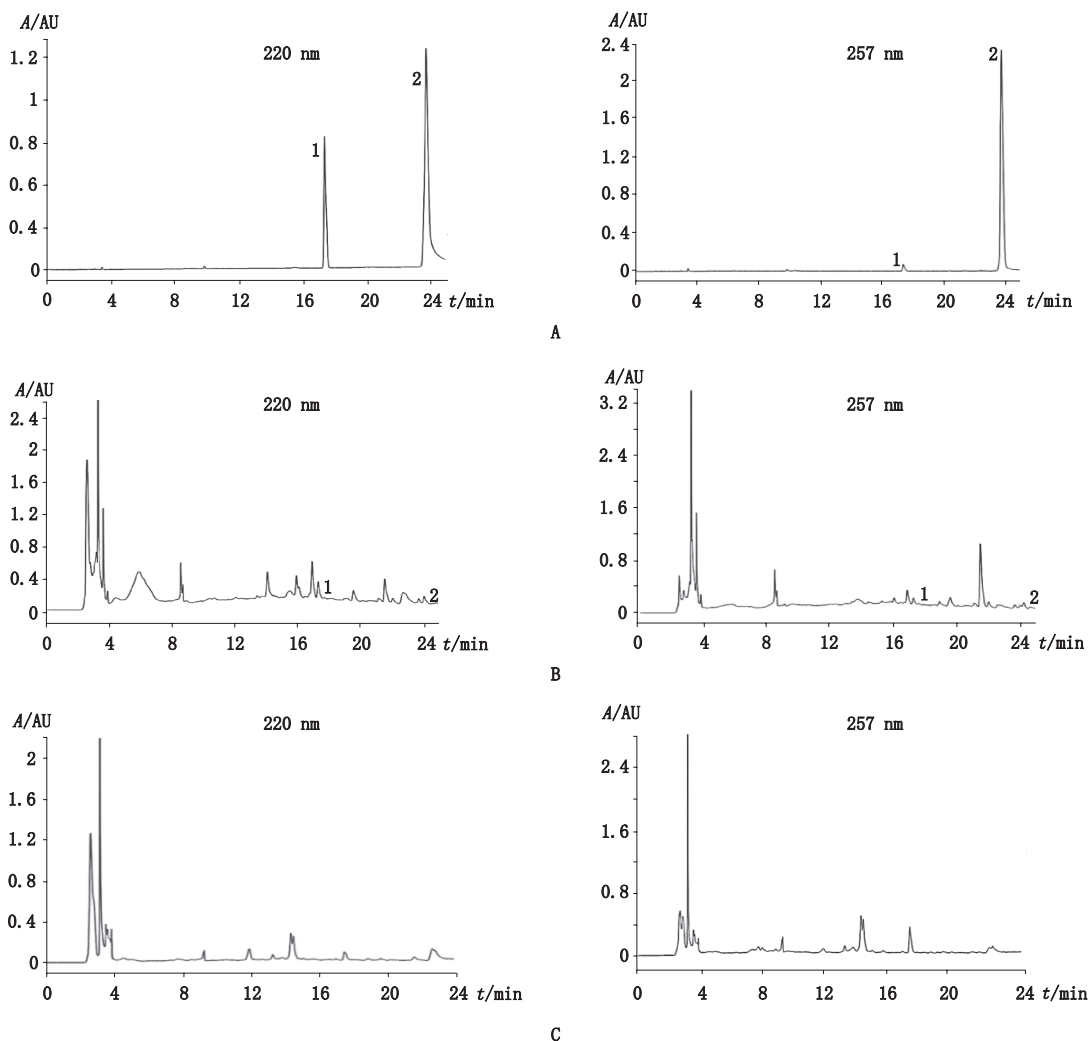
40%A → 52%A), 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 28 °C, 可待因的检测波长 220 nm, 罂粟碱的检测波长 257 nm, 进样量 20 μL。在上述色谱条件下, 吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱的对照品、样品及阴性样品色谱图见图 1、2。



1. 吗啡 (morphine)

图 1 吗啡对照品 (A)、样品 (B) 及阴性样品 (C) 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance of morphine (A), sample (B) and negative control (C)



1. 可待因 (codeine) 2. 罂粟碱 (papaverine)

图 2 磷酸可待因和盐酸罂粟碱对照品 (A)、样品 (B) 及阴性样品 (C) 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substances of codeine phosphate and papaverine hydrochloride (A), sample (B) and negative control (C)

2.3 线性关系考察

取“2.1.1”项下对照品储备液适量,用乙腈定容至 10 mL 量瓶中,分别制得吗啡质量浓度为 $11.88 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,盐酸罂粟碱和磷酸可待因质量浓度分

别为 $11.38 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $22.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。在“2.2”项色谱条件下分别取不同体积上述溶液进样测定。以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X , μg)为横坐标进行线性回归,回归方程见表 1。

表 1 吗啡、磷酸可待因和盐酸罂粟碱的回归方程及线性范围

Tab. 1 The regression equations and linear ranges of morphine, codeine phosphate and papaverine hydrochloride

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/ μg
吗啡(morphine)	$Y=2.53 \times 10^6 X+5.50 \times 10^4$	0.999 8	0.119~23.760
磷酸可待因(codeine phosphate)	$Y=2.47 \times 10^6 X+6.78 \times 10^4$	0.999 9	0.057~3.983
盐酸罂粟碱(papaverine hydrochloride)	$Y=5.25 \times 10^6 X+7.50 \times 10^4$	0.999 2	0.022~3.906

2.4 精密度试验

取同一吗啡对照品溶液及磷酸可待因和盐酸罂粟碱混合对照品溶液,连续进样 6 次进行测定,记录峰面积,计算吗啡、可待因和罂粟碱峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.79%、0.77%、0.73%, $\text{RSD} \leq 2.5\%$, 表明方法精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批样品(批号 20150910)6 份,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱峰面积,计算样品中吗啡、可待因和罂粟碱平均含量($n=6$)分别为 0.038、0.389、0.227 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.2%、2.0%、0.82%。

2.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液,室温放置,分别在一天

内不同时间(0、2、4、6、8、12 h)以及分别在 0、1、2、3、4、5 d 进样测定,记录峰面积;计算 12 h 内吗啡、可待因和罂粟碱峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.32%、0.81%、0.34%, 5 d 内吗啡、可待因和罂粟碱峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 1.1%、2.3%、0.90%, $\text{RSD} \leq 2.5\%$,表明供试品溶液在日内、日间稳定性良好。

2.7 回收率试验

取同一批号热感赛比斯坦颗粒(20150602)6 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别精密加入“2.1.1”项下对照品储备液适量,按“2.1.2”项方法制备供试溶液,在“2.2”项色谱条件下进样测定,计算各成分的加样回收率和 RSD,结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery test

待测成分 (component)	原有量(original amount)/ μg	加入量(added amount)/ μg	实测量(detected amount)/ μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
吗啡(morphine)	15.630	11.88	27.695	101.6	100.2	0.93
	15.260		27.220	100.7		
	15.379		27.254	99.9		
	15.249		27.112	100.0		
	15.319		27.052	98.8		
	15.627		27.517	100.1		
可待因(codeine)	221.881	227.60	449.155	99.8	100.0	0.99
	223.316		453.522	101.1		
	204.381		432.840	100.4		
	213.985		438.612	98.7		
	222.987		452.785	101.0		
	226.720		452.264	99.1		
罂粟碱(papaverine)	5.761	5.58	11.413	101.5	100.2	1.1
	5.573		11.088	98.8		
	5.601		11.148	99.4		
	5.528		11.102	99.9		
	5.550		11.124	99.9		
	5.760		11.423	101.5		

2.8 样品含量测定

取3批样品各3份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.2”色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算样品中吗啡、可待因、罂粟碱含量。结果见表3。

表3 3批样品含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 3 Results of content determination in three batches of samples

批号 (lot No.)	吗啡 (morphine)	可待因 (codeine)	罂粟碱 (papaverine)
20150602	0.031	0.441	0.011
20150711	0.030	0.440	0.011
20150910	0.031	0.444	0.012

3 讨论

3.1 建立方法的必要性

在《中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册》中,关于热感赛比斯坦颗粒标准仅对罂粟壳和罂粟籽进行定性鉴别,对于该制剂的药品质量和安全性难以进行有效控制,所以本实验采用高效液相色谱法测定了制剂中吗啡、可待因和罂粟碱的含量^[5-6],为该药临床使用安全有效提供理论依据。

3.2 样品处理方法的选择

查阅文献[7-9]测定吗啡、磷酸可待因和盐酸罂粟碱时选择含5%醋酸的20%甲醇水溶液、乙腈作为溶剂,结果表明以5%醋酸的20%甲醇水溶液作为溶剂时,溶剂对可待因和罂粟碱的出峰有影响,而吗啡峰形良好。而选择流动相乙腈作为溶剂时,发现可待因和罂粟碱峰形良好,故以5%醋酸的20%甲醇水溶液作为吗啡的溶剂,而乙腈作为磷酸可待因和盐酸罂粟碱的溶剂。在制备供试品溶液时,考察了75%乙醇和氨水湿润之后加三氯甲烷作为提取方法,结果表明以75%乙醇提取制得的供试品溶液的色谱图中吗啡的峰形不好,而氨水湿润之后加三氯甲烷制得的供试品溶液的色谱图中吗啡峰形良好且峰面积比前者的大,故后者作为吗啡供试品溶液的制备方法。

3.3 HPLC 流动相的选择

查阅文献[10-12],考察流动相乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液、乙腈(A)-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾和0.05 mol·L⁻¹庚烷磺酸钠混合水溶液(pH 3.8)

(B)、乙腈(A)-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾和0.05 mol·L⁻¹庚烷磺酸钠混合水溶液(pH 3.1)(B)。结果流动相为乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液时,可待因出现双峰,罂粟碱峰宽较宽,而吗啡峰形正常;流动相为乙腈(A)-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾和0.05 mol·L⁻¹庚烷磺酸钠混合水溶液(pH 3.8)(B),进行梯度洗脱时,可待因和罂粟碱峰分离度及峰形良好,而吗啡峰宽较宽(柱效不够高);流动相为乙腈(A)-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾和0.05 mol·L⁻¹庚烷磺酸钠混合水溶液(pH 3.1)(B)时,吗啡峰形良好,但可待因和罂粟碱的峰形及分离度不如pH=3.8时的好。故将吗啡与另外2个生物碱可待因、罂粟碱分别进行测定。

3.4 测定波长的选择

参考文献[13-15],吗啡和可待因大多选择检测波长为210 nm,本文发现吗啡和可待因在波长为220 nm处与210 nm处吸收度几乎相同,而溶剂甲醇在210 nm处也有吸收,为了避免甲醇的溶剂峰干扰影响,将吗啡、可待因的检测波长定为220 nm。罂粟碱最大吸收为257 nm,由于可待因与罂粟碱含量较低,为获得更大灵敏度,选择各自最大吸收波长处测定。

3.5 小结

本法经方法学验证,可以对热感赛比斯坦颗粒的有毒药材罂粟壳和罂粟籽进行含量测定,从而保证该制剂的安全性。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准. 维吾尔药分册[S]. 1998: 177
Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health. PR China. Uigher Medicine[S]. 1998: 177
- [2] 范蕾, 胡剑影, 王伟影. 汤料中罂粟壳成分的检测[J]. 海峡药学, 2012, 24(10): 65
FAN L, HU JY, WANG WY, et al. Determination of alkaloid of poppy shell in soup materials in chafing dish[J]. Strait Pharm J, 2012, 24(10): 65
- [3] 李雕, 李进瞳, 曾燕, 等. 不同等级罂粟壳有效成分含量的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2246
LI D, LI JT, ZENG Y, et al. Study on the content of effective components in different grades of poppy[J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(17): 2246
- [4] 贺金华, 薛桂蓬, 康雨彤, 等. 热感赛比斯坦颗粒定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 139
HE JH, XUE GP, KANG YT, et al. Study on qualitative and quantitative methods for the determination of Regansaisibitan granules[J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(1): 139

- [5] 中国药典 2010 年版. 二部[S]. 2010: 1153
ChP 2010. Vol II [S]. 2010: 1153
- [6] 刘永利, 袁浩, 李冬梅, 等. UPLC 法测定罂粟壳中 3 种生物碱类成分含量[J]. 中药材, 2011, 34(9): 1386
LIU YL, YUAN H, LI DM, *et al.* Determination of 3 alkaloids in the shell of opium poppy by UPLC [J]. J Chin Med Mater, 2011, 34(9): 1386
- [7] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 369
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 369
- [8] 刘永利, 李冬梅, 冯丽, 等. “一测多评”法测定咳喘宁片中 5 种生物碱类成分的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(4): 465
LIU YL, LI DM, FENG L, *et al.* Simultaneous assay of five kinds of alkaloids in Kechuanning tablets by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2012, 23(4): 465
- [9] 刘文炜, 高玉琼, 刘建华, 等. RP-HPLC 法同时测定哮喘片中吗啡、盐酸麻黄碱、磷酸可待因的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 731
LIU WW, GAO YQ, LIU JH, *et al.* RP-HPLC simultaneous determination of morphine, ephedrine hydrochloride and codeine phosphate in Xiaochuan tablets [J]. Chin J Pharm Anal, 2009, 29(5): 731
- [10] 张庆雷, 李雪君, 刘峰, 等. 反向离子对高效液相色谱法测定祖卡木颗粒中吗啡的含量[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(2): 112
ZHANG QL, LI XJ, LIU F, *et al.* Determination of morphine content in Zukamu granules by ion-pair RP-HPLC [J]. J Guangdong Med Coll, 2008, 24(2): 112
- [11] 孙晓霞, 郭凤霞, 李锦萍, 等. HPLC 同时测定复方磷酸可待因糖浆中的有关物质和防腐剂[J]. 华西药理学杂志, 2015, 30(5): 588
SUN XX, GUO FX, LI JP, *et al.* Simultaneous determination of the related substances and preservatives in compound codeine phosphate syrup by HPLC [J]. West China J Pharm Sci, 2015, 30(5): 588
- [12] 邱琳, 张媛媛, 刘莹. RP-HPLC 法同时测定人参保肺丸中吗啡、磷酸可待因的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(3): 591
QIU L, ZHANG YY, LIU Y, *et al.* Simultaneous determination of the content of morphine and codeine phosphate by RP-HPLC [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2014, 16(3): 591
- [13] 刘永利, 李冬梅, 袁浩, 等. 固相萃取-超高效液相色谱法同时测定肉蔻四神丸中 3 种有效成分含量[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(22): 1754
LIU YL, LI DM, YUAN H, *et al.* Simultaneous determination of three alkaloids in Roukousishen pills by SPE-UPLC [J]. Chin Pharm J, 2011, 46(22): 1754
- [14] 李娜, 赵斌, 黄文华, 等. 高效液相色谱法测定克咳胶囊中吗啡的含量[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(4): 321
LI N, ZHAO B, HUANG WH, *et al.* Determination of morphine in Keke cough capsules by HPLC [J]. Lisizhehn Med Mater Med Res, 2005, 16(4): 321
- [15] 刘永利, 李冬梅, 冯丽, 等. 固相萃取-多波长超高效液相色谱法同时测定咳喘宁中 5 种生物碱类成分的含量[J]. 药科学报, 2011, 46(5): 581
LIU YL, LI DM, FENG L, *et al.* Simultaneous determination of 5 kinds of alkaloids in Kechuanning tablets by SPE-UPLC under different UV-vis wavelength [J]. Acta Pharm Sin, 2011, 46(5): 581

(本文于 2016 年 6 月 23 日收到)