

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.07.05

# 高效液相色谱法同时测定博落回注射液中 血根碱和白屈菜红碱的含量

赵有轩,张传津\*,张志民,章安源

(山东省兽药质量检验所,济南 250022)

[收稿日期] 2019-04-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 07-0030-06 [中图分类号] S853.7

**[摘要]** 建立了高效液相色谱法测定博落回注射液中血根碱和白屈菜红碱含量的方法。采用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(PDA),色谱柱为 waters Symmetry C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温:35 ℃,流速为:1.0 mL/min,流动相:乙腈-三乙胺溶液=25:75 (磷酸调 pH 值至 2.5),检测波长 270 nm。结果表明:血根碱在 0.5~100 μg/mL 范围内线性关系良好( $R^2=1.000$ ),平均回收率( $n=6$ )为 98.21%, $RSD$  为 1.76%;白屈菜红碱在 0.25~50 μg/mL 范围内线性关系良好( $R^2=1.000$ ),平均回收率( $n=5$ )为 98.77%, $RSD$  为 0.83%。本方法简便快捷,可用于博落回注射液中血根碱和白屈菜红碱的含量测定。

**[关键词]** 高效液相色谱法;博落回注射液;血根碱;白屈菜红碱

## Simultaneous Determination of Sanguinarine and Chelerythrine in Macleaya Cordata Injection by HPLC-PDA

ZHAO You-xuan, ZHANG Chuan-jin\*, ZHANG Zhi-min, ZHANG An-yuan

(Institute of veterinary drug quality inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China)

Corresponding author: ZHANG Chuan-jin, E-mail: 1153702137@qq.com

**Abstract:** This study was aimed to establish a high performance liquid chromatography-diode array (HPLC-PDA) test method for determination of Sanguinarine and Chelerythrine in macleaya cordata injection. Chromatographic conditions are as follows: separate column is Waters Symmetry C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the column temperature is 35 ℃, the flow rate is 1.0 mL/min, mobile phase consists of acetonitrile and triethylamine, volume ratio is 25:75, adjust pH to 2.5 with phosphoric acid, and the detection wavelength is 270 nm. The results show that, the linearity of the method for sanguinarine detection complies with the requirement at the range of 0.5~100 μg/mL ( $R^2=1.000$ ), the average recovery rate is 98.21%,  $RSD=1.76\%$ . The linearity of the method for chelerythrine detection complies with the requirement at the range of 0.25

作者简介: 赵有轩,硕士,从事兽药、畜产品的监督抽检和检验。

通讯作者: 张传津。Email: 1153702137@qq.com

~50  $\mu\text{g/mL}$  ( $R^2 = 1.000$ ), the average recovery rate is 98.77%,  $RSD = 0.83\%$ . This method is simple, quick, and it can be used for determination of sanguinarine and chelerythrine in *Macleaya cordata* injection.

**Key words:** HPLC; *Macleaya cordata* injection; sanguinarine; chelerythrine

博落回注射液主要含有血根碱和白屈菜红碱等生物碱,具有抗菌消炎、润肠止泻的功能,主要用于仔猪黄白痢的防治<sup>[1-3]</sup>。博落回注射液现收载于《兽药质量标准》(2017 年版<sup>[4]</sup>)中药卷中,质量控制主要是采用薄层色谱法对其中的血根碱和白屈菜红碱进行鉴别,结合紫外-可见分光光度法测定吸光度值作限度检查,未对这两种有效成分进行含量测定。该制剂为罂粟科博落回(*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.)的果实经提取分离制成的生物碱硫酸盐水溶液。因博落回果原料稀缺,制剂工艺相对复杂,导致该产品质量参差不齐。为有效控制该产品质量,本文经过探索尝试,建立了高效液相色谱法同时测定博落回注射液中血根碱和白屈菜红碱含量的方法<sup>[4-11]</sup>。结果显示:本方法具有操作简单、分离迅速、灵敏度高等特点,可以用于博落回注射液中血根碱和白屈菜红碱的测定。

## 1 材料与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪,配 PDA 检测器(安捷伦,美国);U-3900 紫外分光光度计(日立,日本);BP211D 分析天平(赛多利斯,德国);PB-10 酸度计(赛多利斯,德国);Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(密理博,美国)。

1.2 药品与试剂 盐酸血根碱,批号:510001-201101,含量:99.3%,来源:中国食品药品检定研究院;白屈菜红碱,批号:111718-200501,含量:100%,来源:中国药品生物制品检定所。甲醇,乙腈均为色谱纯;三乙胺、磷酸和盐酸均为分析纯;水为超纯水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Waters Symmetry C18 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流速:1.0 mL/min;流动相:乙腈-0.2% 三乙胺溶液(磷酸调节 pH 至 2.5),二极管阵列检测器,检测波长:270 nm;柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积:10  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液制备 称取盐酸血根碱 100 mg,置于 10 mL 容量瓶中,称取白屈菜红碱 100 mg,置于另一 10 mL 容量瓶中,分别加甲醇-1.0% 盐酸溶液(50 : 50)溶解,稀释至刻度,即分别得血根碱和白屈菜红碱对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液制备 博落回注射液三批,分别为:批号-2018122411,来源:山东华尔康兽药有限公司;批号-20180901,来源:山东圣旺药业股份有限公司;批号-20180201,来源:山西省芮城科龙兽药有限公司。分别精密量取博落回注射液 5 mL,加甲醇-1.0% 盐酸溶液(50 : 50)稀释至 100 mL,摇匀,即得。

2.3 专属性试验色谱图 在上述色谱条件下,确定阴性对照色谱图,血根碱和白屈菜红碱的色谱图以及博落回注射液色谱图,如下图 1,图 2,图 3 所示。

2.4 线性关系考察 吸取上述对照品溶液逐级稀释,分别制成 0.5、1、5、10、100  $\mu\text{g/mL}$  的血根碱溶液和 0.25、0.5、2.5、5、50  $\mu\text{g/mL}$  的白屈菜红碱溶液,分别取 10  $\mu\text{L}$  进样,以峰面积  $Y$  为纵坐标,血根碱、白屈菜红碱浓度  $X$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标建立标准曲线。血根碱的回归方程为  $Y = 33.932X - 2.512$ ,  $R^2 = 1.000$ ;白屈菜红碱的回归方程为  $Y = 69.419X - 7.380$ ,  $R^2 = 1.000$ ,相关系数良好。(见图 4、图 5)

2.5 添加回收试验 精密量取博落回注射液 1 mL,置 20 mL 容量瓶中,分别加 2 mL 血根碱对照品贮备液和 1 mL 白屈菜红碱对照品贮备液,加甲醇-1.0% 盐酸溶液(50 : 50)稀释至刻度,取 10  $\mu\text{L}$  上机检测,血根碱的回收率在 95% ~ 100% 之间,见表 1;白屈菜红碱的回收率在 97% ~ 99% 之间,见表 2,均满足准确度的要求。

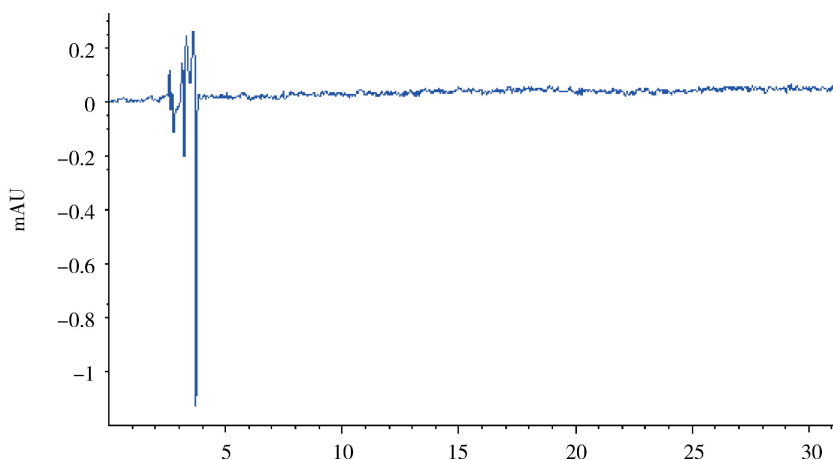


图 1 阴性对照色谱图

Fig 1 Chromatogram of negative control

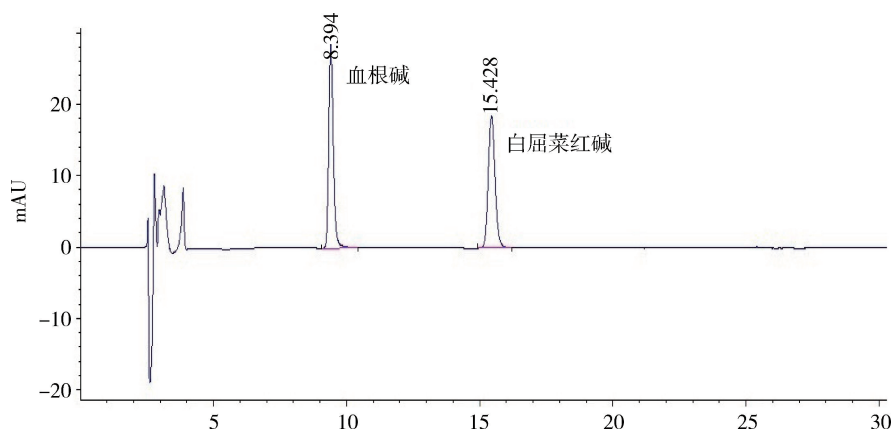


图 2 对照品中血根碱和白屈菜红碱色谱图

Fig 2 Chromatogram of sanguinarine and chelerythrine in reference solution

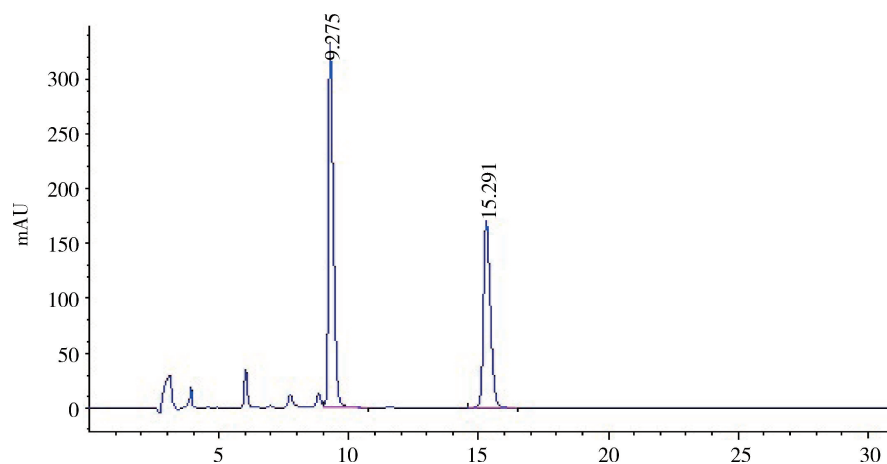


图 3 博落回注射液中的血根碱和白屈菜红碱色谱图

Fig 3 Chromatogram of sanguinarine and chelerythrine in Macleaya Cordata injection

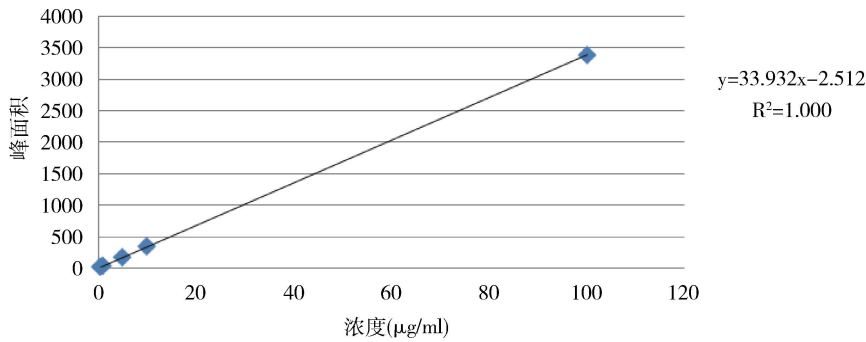


图 4 血根碱线性曲线

Fig 4 Standard curve of sanguinarine

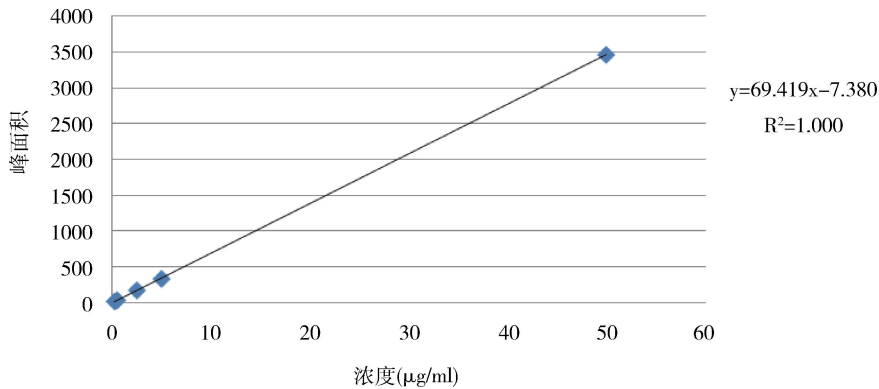


图 5 白屈菜红碱线性曲线

Fig 5 Standard curve of chelerythrine

表 1 血根碱添加回收结果

| Tab 1 Results of recovery for sanguinarine |        |        |        |        |         |       |
|--------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|---------|-------|
| 序号                                         | 原有量/mg | 加入量/mg | 测定量/mg | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD/% |
| 1                                          | 1.989  | 2.000  | 3.892  | 95.16  | 98.21   | 1.76  |
| 2                                          | 1.987  | 2.000  | 3.949  | 98.12  |         |       |
| 3                                          | 1.984  | 2.000  | 3.949  | 98.23  |         |       |
| 4                                          | 1.986  | 2.000  | 3.972  | 99.32  |         |       |
| 5                                          | 1.975  | 2.000  | 3.937  | 98.12  |         |       |
| 6                                          | 1.981  | 2.000  | 3.987  | 100.32 |         |       |

表 2 白屈菜红碱添加回收结果

| Tab 2 Results of recovery for chelerythrine |        |        |        |       |         |       |
|---------------------------------------------|--------|--------|--------|-------|---------|-------|
| 序号                                          | 原有量/mg | 加入量/mg | 测定量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
| 1                                           | 0.248  | 1.000  | 1.239  | 99.13 | 98.77   | 0.83  |
| 2                                           | 0.243  | 1.000  | 1.225  | 98.23 |         |       |
| 3                                           | 0.236  | 1.000  | 1.230  | 99.42 |         |       |
| 4                                           | 0.239  | 1.000  | 1.212  | 97.32 |         |       |
| 5                                           | 0.241  | 1.000  | 1.227  | 98.65 |         |       |
| 6                                           | 0.240  | 1.000  | 1.239  | 99.87 |         |       |

2.6 精密度试验 取 2.2.1 项下对照品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进样,连续进 6 针,计算血根碱和白屈菜红碱峰面积的 *RSD*,其中血根碱为 0.56%,白屈菜红碱为 0.22,精密度良好。如表 3,表 4 所示。

表 3 博落回注射液中血根碱精密度试验 (n = 6)

Tab 3 Precision test of sanguinarine in *Macleaya Cordata* injection (n = 6)

| 名称  | 次数 | 峰面积/mAU  | <i>RSD</i> /% |
|-----|----|----------|---------------|
| 血根碱 | 1  | 3376.265 | 0.56          |
|     | 2  | 3390.036 |               |
|     | 3  | 3394.552 |               |
|     | 4  | 3412.046 |               |
|     | 5  | 3424.741 |               |
|     | 6  | 3415.253 |               |

表 4 博落回注射液中血白屈菜红碱精密度试验 (n = 6)

Tab 4 Precision test of chelerythrine *Macleaya Cordata* injection (n = 6)

| 名称    | 次数 | 峰面积/mAU  | <i>RSD</i> /% |
|-------|----|----------|---------------|
| 白屈菜红碱 | 1  | 3466.726 | 0.22          |
|       | 2  | 3464.316 |               |
|       | 3  | 3460.425 |               |
|       | 4  | 3479.482 |               |
|       | 5  | 3461.931 |               |
|       | 6  | 3456.123 |               |

2.7 稳定性试验 取 2.2.1 项下对照品溶液,按照 2.1 项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 下进样,测定不同时间下的峰面积,*RSD* (n = 5),其中血根碱 0.52%,白屈菜红碱 0.23%,表明对照品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 样品测定 取 2.2.2 项下的 3 批博落回注射液,按照 2.1 项下的色谱条件进样,测定峰面积,计算血根碱和白屈菜红碱的含量,三批的血根碱含量分别是 97.65、100.32、100.96 μg/mL,白屈菜红碱含量分别是 50.99、49.03、48.53 μg/mL。

### 3 讨论与结论

3.1 流动相的选择 按照《兽药质量标准》(2003 年版<sup>[3]</sup>)上博落回提取物的液相标准选择梯度洗脱,流动相 A:乙腈,流动相 B:0.2% 三乙胺(磷酸调节 pH 至 2.5),发现在白屈菜红碱位置处基线漂移严重,影响了白屈菜红碱的峰形,根据参考文献<sup>[6]</sup>,改成等度洗脱,流动相乙腈 - 0.2% 三乙胺(磷酸调节 pH 至 2.5),洗脱效果良好。

3.2 pH 的选择 根据《兽药质量标准》(2003 年版<sup>[3]</sup>)和参考文献<sup>[6]</sup>,选择 pH2.0、2.5、3.0 几个值进行筛选,发现 pH 在 2.0 时,血根碱峰有拖尾,pH 在 3.0 时,基线不平稳,而 pH 在 2.5 时,分离效果好,峰形最好,基线平稳,可达到最佳分离效果。

3.3 波长选择 分别取血根碱和白屈菜红碱对照品溶液,经紫外 - 可见分光光度计法测定吸收波长,显示血根碱在 270 和 330 nm 处有最大吸收,白屈菜红碱在 270 和 320 nm 处有最大吸收,在 270 nm 下同时测定血根碱和白屈菜红碱,结果显示在 270 nm 下有较高吸收值,且分离度良好。所以选择 270 nm 作为检测波长。

《兽药质量标准》(2017 年版<sup>[4]</sup>)上只有鉴别的方法,能定性,但是无法定量。根据本方法建立的液相方法可以快速测定血根碱和白屈菜红碱,省去了薄层鉴别的繁琐处理过程,达到快速测定含量的目的。相对于参考文献<sup>[6,8]</sup>,优化了液相色谱条件,为了增加对照品的溶解性,改变了稀释剂,经过一系列优化和探索,回收率和精密度均有明显变好,峰形较之前有明显改善。

综上所述,本方法具有操作简单、分离迅速、灵敏度高等特点,可用于博落回注射液中血根碱和白屈菜红碱的测定。

### 参考文献:

[1] Lin L, Liu Y C, Huang J L, *et al.* Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology [J]. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(1), 19 - 48.

[2] 谢家声,李锦宇,王贵波,等. 三种兽用中药注射液后海穴注

- 射治疗仔猪黄痢的效果[J]. 中兽医医药杂志,2014,33(4): 48-49.
- Xie J S, Li J Y, Wang G B, *et al.* Treatment of yellow scour of newborn piglets by Acupoint Houhai injection with 3 Chinese herbal medicaments [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2014, 33(4):48-49.
- [3] 中华人民共和国农业部,兽药质量标准 2003 年版. Ministry of agriculture of the People's Republic of China, Veterinary drug quality standard 2003 edition[S].
- [4] 中华人民共和国农业部,兽药质量标准 2017 年版. Ministry of agriculture of the People's Republic of China, Veterinary drug quality standard 2017 edition[S].
- [5] 郁建生,杨 冰. 博落回注射液生产工艺及质量的研究[J]. 中兽医医药杂志,1998(06):11-13.
- Yu J S, Yang B. Study on production process and quality of Macleaya Cordata injection [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 1998, (6):11-13.
- [6] 许世富. 高效液相色谱法测定博落回注射液中血根碱和白屈菜红碱的含量[J]. 中国兽药杂志,2009,43(06):15-17.
- Xu S F. Simultaneous determination of sanguinarine and chelerythrine in Macleaya Cordata injection by HPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug[J]. 2009,43(6):15-17.
- [7] 郁建生. 兽用博落回注射液质量稳定性研究[A]. 中国药学会. 2013 年中国药学会大会暨第十三届中国药师周论文集 [C]. 中国药学会;中国药学会,2013:7.
- Yu J S. Study on quality stability of veterinary Macleaya Cordata injection [A]. Chinese Pharmaceutical Association. 2013 China Pharmaceutical Conference and the 13th China Pharmacist Week [C], 2013: 7.
- [8] Qing Z X, Cheng P, Liu X B, *et al.* Systematic identification of alkaloids in Macleaya microcarpa fruits by liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with the isoquinoline alkaloids biosynthetic pathway[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 103: 26-34.
- [9] Li O Y, Li X, Su D S, *et al.* A study on separation and extraction of four main alkaloids in Macleaya cordata (Willd) R. Br. with strip dispersion hybrid liquid membrane[J]. Journal of separation science,2010,33(13):2026-2034.
- [10] Jana Suchomelová. HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family Papaveraceae [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. 2007, 44(1):283-287.
- [11] Luo X B, Chen B, Yao S Z. Rapid determination of protopine, allocryptopine, sanguinarine and chelerythrine in fruits of Macleaya cordata by Microwave-assisted solvent extraction and HPLC-ESI/MS [J]. Phytochem Anal, 2010, 17(6):431-438.

(编辑:陈 希)