

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.08

兽用原料药博普总碱的 HPLC 特征谱图的建立

陈燕乐¹, 唐昭山^{1,2}, 杨广民¹, 曾建国^{3,4*}

(1. 湖南美可达生物资源股份有限公司, 长沙 410331; 2. 湖南省中药提取工程研究中心, 长沙 410329;

3. 湖南农业大学湖南省中兽药重点实验室, 长沙 410128; 4. 湖南省兽用中药资源与中兽药创制国家地方联合工程研究中心, 长沙 410128)

[收稿日期] 2021-12-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 04-0047-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立 HPLC 特征谱图控制兽用原料药博普总碱的质量。HPLC 特征谱图包含 4 个特征峰, 用对照品定性鉴别 4 个特征峰分别为原阿片碱、别隐品碱、血根碱和白屈菜红碱。考察检测波长、流动相条件、柱温、流速、色谱柱品牌对各特征峰相对保留时间的影响, 确定优化后的高效液相条件, 并具有良好的精密度、稳定性和重复性。分析 15 批博普总碱原料药的液相图谱, 样品的相似度均大于 0.95, 并对特征峰的相对保留时间进行了规定, 为原料药博普总碱质量控制提供了依据。

[关键词] 博普总碱; 特征图谱; 质量控制

Establishment of HPLC Characteristic Chromatogram for Veterinary Material Drug of Bopu Zongjian

CHEN Yan-le¹, TANG Zhao-shan^{1,2}, YANG Guang-min¹, ZENG Jian-guo^{3,4*}

(1. Hunan Micolta Biresource Co., Ltd., Changsha 410331, China; 2. Hunan Engineering Research Center of Chinese Materia Medica Extracts, Changsha 410329, China; 3. Hunan Key Laboratory of Veterinary Drugs, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

4. National and Local Union Engineering Research Center of Veterinary Herbal Medicine Resources and Initiative, Changsha 410128, China)

Corresponding author: ZENG Jian-guo, E-mail: ginkgo@world-way.net

Abstract: The HPLC characteristic chromatogram was established to control the quality of Bopu Zongjian. The HPLC characteristic chromatogram contains four characteristic peaks, and the four peaks identified by the reference substance are protopine, allocryptopine, sanguinarine and chelerythrine. Investigated the effects of detection wavelength, mobile phase conditions, column temperature, flow rate and column brand on the relative retention time of each characteristic peak, and the optimized HPLC conditions were determined to have good precision, stability and repeatability. Analyzed the HPLC characteristic chromatogram of 15 batches of Bopu Zongjian, the similarity of samples were greater than 0.95. Specified the relative retention time of characteristic peaks, which provided a reliable basis for the quality control of veterinary material drug of Bopu Zongjian.

基金项目: 湘产特色药材饲用替抗关键技术及产品开发(2020NK2031)经费资助

作者简介: 陈燕乐, 硕士, 从事中兽药及饲料添加剂产品研发及申报工作。

通讯作者: 曾建国。E-mail: ginkgo@world-way.net

Key words: Bopu Zongjian; characteristic chromatogram; quality control

罂粟科博落回属的博落回 (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.) 是一种多年生直立草本植物。湖南美可达生物资源股份有限公司专业从事博落回药用植物的种植、生产、销售以及相关的研究工作。博落回植株中富含生物碱, 在各个部位中果实含量最高^[1], 是主要的生产原料。生物碱中主要包括血根碱, 白屈菜红碱, 原阿片碱, 别隐品碱^[2-3], 另外还含有微量的二氢白屈菜红碱等生物碱等^[4]。美可达公司经过多年的生产实践, 不断的优化和研究, 对博落回药用植物资源进行全面开发。博落回果提取苯并菲啶类生物碱后产生的废弃的滤残液和残渣中, 有着大量的普托类生物碱, 具有显著的抗炎活性, 公司将包含普托类生物碱的滤残液部分开发成治疗大肠杆菌性腹泻的博普总碱国家二类新药^[5]。本实验拟对该兽药进行特征谱图研究, 用对照品定性鉴别博普总碱的特征峰, 并对特征峰的相对保留时间进行规定, 建立简便快速的方法, 为全面控制博普总碱原料药的质量提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 岛津 20A 型高效液相色谱仪 (SPD - 20A 检测器和 LC solution B. 1. 24 色谱工作站); 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 电子天平 (梅特勒 - 托利仪器 (上海) 有限公司)。

1.2 材料 原阿片碱 (批号: 110853 - 201003, 纯度: 99.9%, 中国药品生物制品检定所); 别隐品碱 (批号: 17101504, 纯度: 99.9%, 湖南美可达生物资源股份有限公司自制); 盐酸血根碱 (批号: 510001 - 201101, 纯度: 99.3%, 中国药品生物制品检定所); 白屈菜红碱 (批号: 111718 - 201402, 纯度: 80.5%, 中国药品生物制品检定所); 博普总碱原料药 (湖南美可达生物资源股份有限公司生产); 乙腈为色谱纯; 水为纯化水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取对照品原阿片碱、别隐品碱、盐酸血根碱和白屈菜红碱适量, 精密称定,

加甲醇 - 1.0% 盐酸 (50: 50) 100 mL 溶解, 制成每 1 mL 含原阿片碱 0.095 mg、别隐品碱 0.049 mg、盐酸血根碱 0.021 mg、白屈菜红碱 0.012 mg 的溶液即得。

2.2 供试品溶液的制备 取博普总碱粉末约 20 mg, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 - 1.0% 盐酸水 (50: 50) 50 mL, 称定重量, 超声 (功率 250 W, 33 KHz) 处理 30 min, 取出, 放冷, 称定重量, 用甲醇 - 1.0% 盐酸水补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件 根据公司博落回系列产品的内部高效液相分析方法及相关的文献报道^[6-8], 确定的高效液相色谱条件: 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (优化使用 Agilent TC 柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm)); 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 磷酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱: 0 ~ 14 min, 25% A; 14 ~ 27 min, 25% ~ 60% A; 27 ~ 29 min, 60% ~ 25% A; 29 ~ 35 min, 25% A; 流速为 0.8 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长为 287 nm。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 记录色谱图, 即得。

2.4 检测波长的选择 液相特征图谱中呈现的 4 个特征峰分别为原阿片碱峰、别隐品碱峰、盐酸血根碱峰和白屈菜红碱峰, 使用全波长扫描发现 4 个成份在 270 ~ 290 nm 波长范围内均有较好吸收, 这 4 个成份的紫外最大吸收波长分别为 289、285、274 及 269 nm, 因为博普总碱中原阿片碱和别隐品碱峰为主要成份, 故其检测波长确定为 287 nm。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度考察 取同一份供试品溶液, 按照上述色谱条件进行连续进样 6 次, 每次 5 μL。供试品特征图谱中应有 4 个特征峰, 以原阿片碱参照物峰为 S 峰, 计算特征峰 2、特征峰 3、特征峰 4 的相对保留时间, 如表 1 所示, 结果表明该方法的仪器精密度良好。

表 1 精密度考察结果

Tab 1 Precision test results

试验次数	特征峰 1 相对保留时间	特征峰 2 相对保留时间	特征峰 3 相对保留时间	特征峰 4 相对保留时间
1	1.000	1.192	1.907	2.425
2	1.000	1.193	1.914	2.419
3	1.000	1.194	1.916	2.416
4	1.000	1.193	1.916	2.414
5	1.000	1.194	1.918	2.415
6	1.000	1.194	1.920	2.413
平均值	1.000	1.193	1.915	2.417
RSD(%)	—	0.06	0.24	0.18

2.5.2 稳定性考察 取同一份供试品溶液,按照上述色谱条件进行下分别于 0、4、8、12、18、24 h 进样,供试品特征图谱中应有 4 个特征峰,以原阿片碱参照物峰为 S 峰,计算特征峰 2、特征峰 3、特征峰 4 的相对保留时间,如表 2 所示,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 2 稳定性考察结果

Tab 2 Stability test results

进样时间/h	特征峰 1 相对保留时间	特征峰 2 相对保留时间	特征峰 3 相对保留时间	特征峰 4 相对保留时间
0	1.000	1.192	1.907	2.425
4	1.000	1.194	1.919	2.409
8	1.000	1.194	1.920	2.408
12	1.000	1.194	1.923	2.402
18	1.000	1.195	1.925	2.400
24	1.000	1.195	1.926	2.396
平均值	1.000	1.194	1.920	2.407
RSD(%)	—	0.08	0.37	0.42

2.5.3 重复性考察 取同一批次样品制备供试品溶液,按照上述色谱条件进行下平行进样 6 份,结果见表 3。试验结果表明,供试品的重复性良好。

表 3 重复性考察结果

Tab 3 Repeatability test results

序号	特征峰 1 相对保留时间	特征峰 2 相对保留时间	特征峰 3 相对保留时间	特征峰 4 相对保留时间
1	1.000	1.196	1.931	2.392
2	1.000	1.196	1.932	2.390
3	1.000	1.196	1.932	2.393
4	1.000	1.196	1.934	2.393
5	1.000	1.196	1.934	2.393
6	1.000	1.195	1.933	2.392
平均值	1.000	1.196	1.932	2.392
RSD(%)	—	0.027	0.053	0.046

2.6 博普总碱特征图谱的建立及相关数值的规定

2.6.1 特征图谱的建立和特征峰的定性鉴别 取 15 个不同批次的博普总碱原料药,批号分别为 100701、100702、100703、110901、110902、110903、140501、140502、140503、180401、180402、180403、200501、200502 及 200503,按已确定的色谱条件进行测定,记录色谱图,以半峰宽为 20,斜率为 1000,最小峰高为最高峰的 1.5% 进行积分。将所有批次样品色谱图数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以 S1(100702)样品色谱图为参照图谱,时间窗宽度 0.10S,进行多点校正,得到 15 批样品叠加图,并建立博普总碱特征图谱的对照图谱,详见图 1 和图 2,各批次样品的相似度结果均大于 0.95。

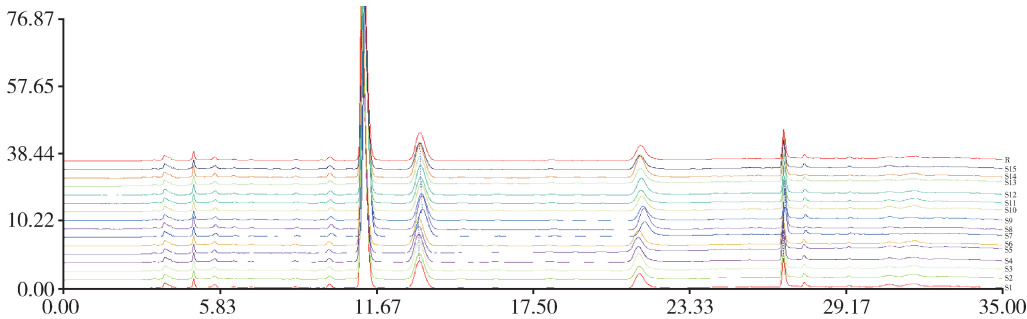


图 1 15 个批次博普总碱原料药的对照图谱

Fig 1 HPLC characteristic chromatogram of 15 batches of Bopu Zongjian

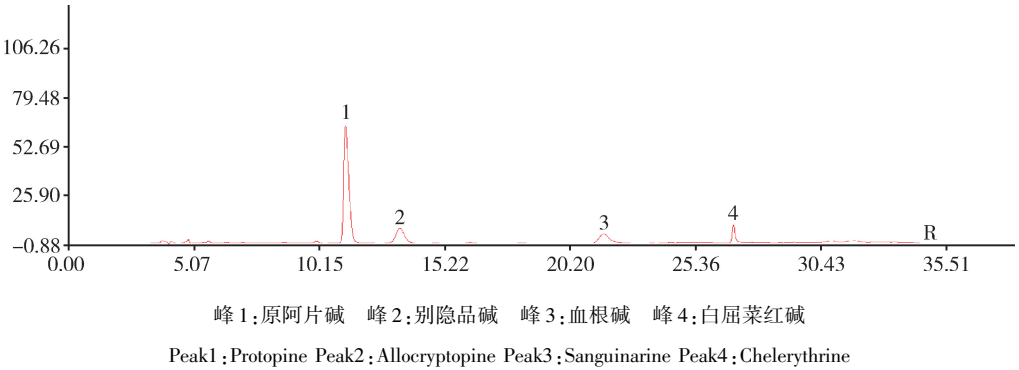


图 2 系统生成的对照特征图谱

Fig 2 Reference characteristic chromatogram generated by the system

将含有原阿片碱、别隐品碱、血根碱和白屈菜红碱的混合对照品溶液,以及博普总碱供试品溶液按已确定的色谱条件测定,记录色谱图,见图 3。

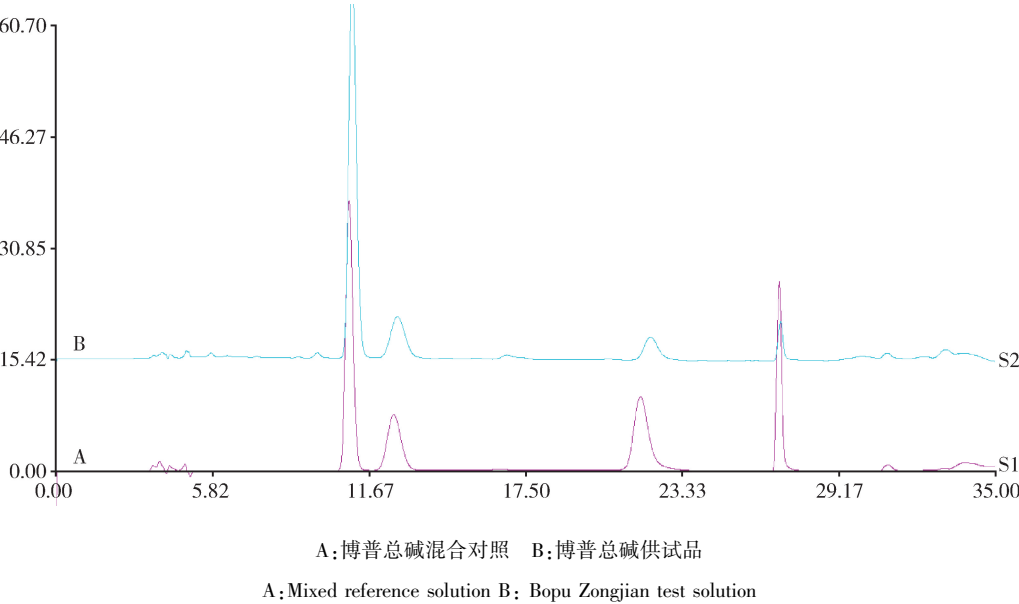


图 3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC characteristic chromatogram

2.6.2 特征图谱内容的规定 按上述的色谱条件测定,记录 15 个不同批次博普总碱原料药各特征峰的保留时间,计算各特征峰和参照物峰 S 的相对保留时间(表 4),所有特征峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 5%。故应规定各供试品溶液的色谱图中应有 4 个特征峰,其原阿片碱峰为 S 峰,计算特征峰 2、峰 3 和峰 4 与 S 峰的相对保留时间,其相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 之内。规定值为:1.19 $\pm$ 0.06(峰 2),1.92 $\pm$ 0.10(峰 3),2.41 $\pm$ 0.12(峰 4)。

3 讨论与结论

3.1 流动相的优化 采用 4 个不同液相流动相系统对博普总碱原料药进行洗脱:(I)甲醇(A) - 0.1% 磷酸水(B);(II)甲醇(A) - 0.2% 三乙胺 - 0.1% 磷酸水(B);(III)乙腈(A) - 0.1% 磷酸水(B);(IV)乙腈(A) - 0.2% 三乙胺(磷酸调 pH = 2.5)(B)。

其中流动相系统 III 和 IV,效果较好,即乙腈水系统分离洗脱效果比甲醇水系统好;其中三乙胺磷酸属于缓冲盐,对液相设备损害较大,操作较为复

杂,最终选择流动相乙腈(A) -0.1% 磷酸水(B)。

表 4 样品测定结果

Tab 4 Samples test results

批号	特征峰 1 相对保留时间	特征峰 2 相对保留时间	特征峰 3 相对保留时间	特征峰 4 相对保留时间
100701	1.000	1.190	1.927	2.410
100702	1.000	1.189	1.925	2.408
100703	1.000	1.190	1.927	2.412
110901	1.000	1.190	1.927	2.413
110902	1.000	1.189	1.926	2.412
110903	1.000	1.189	1.926	2.412
140501	1.000	1.191	1.929	2.396
140502	1.000	1.193	1.933	2.403
140503	1.000	1.190	1.928	2.400
180401	1.000	1.190	1.927	2.402
180402	1.000	1.190	1.926	2.404
180403	1.000	1.191	1.928	2.406
200501	1.000	1.190	1.927	2.406
200502	1.000	1.192	1.931	2.412
200503	1.000	1.189	1.926	2.406
平均值	1.000	1.190	1.928	2.407
RSD(%)	-	0.09%	0.11%	0.21%

3.2 检测波长对相对保留时间的影响 使用同一供试品溶液,选择不同检测波长 282、285、287、289 和 292 nm 进行检测,并计算相对保留时间,结果显示各特征峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 1%,故检测波长对特征峰的相对保留时间影响很小。

3.3 柱温对相对保留时间的影响 使用同一供试品溶液,选择不同柱温 25、30、35、40 ℃ 进行检测,并计算相对保留时间,结果显示特征峰 2 和特征峰 3 的相对保留时间 *RSD* 均小于 5%,但特征峰 4 相对保留时间 *RSD* 为 5.41%。可见不同柱温对特征峰的相对保留时间影响较大,尤其是特征峰 4(白屈菜红碱峰)。

3.4 流动相流速对相对保留时间的影响 使用同一供试品溶液,选择不同流速 0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL/min 进行检测,并计算相对保留时间,结果显示特征峰 2 和特征峰 3 的相对保留时间 *RSD* 均小于 5%,但特征峰 4 相对保留时间 *RSD* 为

8.48%。可见不同流速对特征峰的相对保留时间影响较大,尤其是特征峰 4(白屈菜红碱峰)。

3.5 不同品牌色谱柱对高效液相特征谱图的影响 使用同一供试品溶液,选择不同品牌 C₁₈ (250 × 4.6 mm,5 μm)液相色谱柱 Xunion、Welch Ultimate、ACE Excel、Agilent HC 和 Agilent TC,进行检测,并计算相对保留时间,结果显示除了特征峰 2 相对保留时间 *RSD* 小于 5% 外,特征峰 3 的相对保留时间 *RSD* 为 8.79%,特征峰 4 的相对保留时间 *RSD* 为 11.80%,故不同品牌色谱柱对特征峰的相对保留时间影响较大,最好固定色谱柱品牌进行使用,考虑市场上销售量较大和使用效果,优化使用 Agilent C₁₈ 系列色谱柱,尤其使用 Agilent TC 柱。

本研究对原料药博普总碱有效部位进行了特征图谱研究,可在含量测定的同时,进行特征图谱的测定,相较于博落回生物碱的薄层鉴别^[3]更为快速和方便。同时,应用特征图谱技术指认了 4 个特征峰并规定了相对保留时间。该方法具有良好的精密性、溶液稳定性和样品重复性,为全面控制博普总碱的质量提供了依据。

参考文献:

[1] 刘秀斌. 博落回属植物中生物碱代谢累积研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2012,47-48.

Liu X B. Study on cumulation of alkaloids metabolism in Macleaya R. Br. plants [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012,47-48.

[2] 胡之璧,徐垠,冯胜初,等. 博落回果实中有效成分的研究[J]. 药学报,1979,14(9):535-540.

Hu ZB,Xu Y, Feng S C, et al. Studies on the active principles of the fruits of macleaya cordata (Willd.) R. Br. [J]. Acta Pharmaceutica Sinica,1979,14(9):535-540.

[3] 陈燕乐,杨广民,唐昭山,等. 博落回中四种生物碱的薄层鉴别研究[J]. 中国兽药杂志,2020,54(4):30-35.

Chen Y L,Yang G M,Tang Z S, et al. Study on TLC Identification of 4 Alkaloids in Macleaya cordata and M. microcarpa[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2020,54(4):30-35.

[4] 王欣. 博落回中生物碱成分的研究Ⅱ[D]. 西北农林科技大学,2005:5-20.

Wang X. Study on alkaloids from Macleaya cordata Ⅱ [D]. North-

west A&F University,2005;5-20.

- [5] 中华人民共和国农业农村部公告第 214 号,批准湖南农业大学等 10 家单位申报的博普总碱等 3 种兽药产品为新兽药[S].

Announcement No. 214 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Approved three kinds of drugs including Bopu Zongjian as new veterinary drugs declared by 10 units such as Hunan Agricultural University. [S].

- [6] 中华人民共和国农业农村部公告第 246 号,兽药产品质量标准修订和批准文号变更等有关事项公告[S].

Announcement No. 246 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Announcement on the revision of veterinary drug quality standards and the change of registered number of approval[S].

- [7] 刘秀斌,黄嘉璐,郑亚杰,等. 博落回和小果博落回不同部位

中生物碱类成分的比较[J]. 中国现代中药,2017, 19(10): 1382-1386.

Liu X B,Huang J L,Zheng Y J,*et al.* Differentiation of Alkaloids in Different Parts between *Macleaya cordata* and *M. microcarpa* [J]. *Modern Chinese Medicine*,2017, 19(10):1382-1386.

- [8] 黄敬,曾建国,罗卫梅. HPLC 法同时测定博落回不同部位原阿片碱、别隐品碱的含量[J]. 湖南中医药大学学报,2010,30(1):41-42.

Huang J,Zeng J G,Luo W M. Determination of protopine and allocryptopine in diferent parts of *Macleaya cordata*(willd.) R. Br. by HPLC[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan*,2010,30(1):41-42.

(编辑:侯向辉)