

不同盐酸青藤碱制剂的毛细管电泳分析方法

吴红根^{1,2}, 仇萍³, 彭晓珊³, 彭祖仁³, 李正^{1,2}, 李文龙^{1,2,3*}

(1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 300193; 2. 省部共建组分中药国家重点实验室, 天津 300193; 3. 湖南正清制药集团股份有限公司, 湖南 怀化 418000)

摘要: 目的 探究不同盐酸青藤碱制剂的毛细管电泳分析方法。方法 采用未涂层毛细管柱 (50.2 cm×50 μm, 有效长度 40 cm); 分离电压为 15 kV; 温度 25 ℃; 检测波长 262 nm; 缓冲体系 H₃BO₃-Tris, pH 6.5。结果 盐酸青藤碱在 15.625~500.000 μg/mL 范围内线性关系良好 ($r=0.9988$), 加样回收率 95.32%~104.89%, RSD 3.50%。3种盐酸青藤碱制剂的峰面积 RSD 均小于 4%。结论 该方法准确稳定, 快速高效、绿色环保, 可用于盐酸青藤碱制剂的质量控制。

关键词: 正清风痛宁片; 正清风痛宁缓释片; 正清风痛宁注射液; 盐酸青藤碱; 毛细管电泳

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)04-1100-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.050

盐酸青藤碱是从防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 或毛青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. var. *cinereum* Rehd. et Wils. 的干燥藤茎中提取制备的一种生物碱单体^[1], 是青藤碱的盐酸盐形式, 具有广泛的药理活性, 在抗炎、抗免疫、抗肿瘤等方面具有显著作用^[2-4]。在治疗过程中, 青藤碱多种制剂联用的效果要优于单一制剂, 由湖南正清制药集团股份有限公司提出的“正清风痛宁风湿与疼痛‘金三角’特色疗法”对风湿类风湿性关节炎等风湿病的疗效确切, 该疗法以正清风痛宁注射剂电致孔透皮给药、局部注射, 正清风痛宁片剂口服联合用药进行风湿与疼痛的治疗, 经国内多家医院使用验证具有良好的治疗效果^[5]。国内报道的测定盐酸青藤碱制剂的方法多数为 HPLC 法^[6-12], 但该方法具有分离时间长、流动相的消耗大、易造成污染等缺点, 且色谱峰不规则, 存在拖尾现象。也有研究人员使用其他方法分析盐酸青藤碱制剂, 包括毛细管电泳法^[13-14]、电化学法^[15]、拉曼和近红外分析方法^[16], 但是这些分析盐酸青藤碱制剂的方法往往是对单一剂型进行分析, 适用范围有限, 尚未见采用毛细管电泳技术分析多种盐酸青藤碱制剂的普适性方法报道。毛细管电泳法具有分离效率高、检测速度快、样品量小、操作简便、成本低等优点, 在中药分析中有较好的应用前景。本研究建立了测定正清风痛宁片、正清风痛宁缓释片、正清风痛宁注射液 3 种制剂中盐酸青藤碱含量的普适性毛细管电泳方法, 该方法具有快速高效、绿色环保的特点, 实用性较好, 可用于不同剂型的盐酸青藤碱制剂的含量测定。

1 材料

P/ACE™ MDQ Plus 毛细管电泳仪, 配备二极管阵列检测器, 32 Karat software 工作站 (美国 Beckman 公司); 未涂层石英毛细管柱 (50.2 cm×50 μm, 有效长度 40 cm, 美国 Beckman 公司); 针头式滤膜 (0.22 μm, 迈博瑞生物膜技术有限公司); AE240 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); SB-5200DTD 型号超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); FE 20 PH 计 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

盐酸青藤碱对照品 (上海源叶生物科技有限公司)。样品由湖南正清制药集团股份有限公司生产, 包括正清风痛宁片 (每片含盐酸青藤碱 20 mg)、正清风痛宁缓释片 (每片含盐酸青藤碱 60 mg) 和正清风痛宁注射液 (2 mL: 50 mg)。硼酸 (天津索罗门生物科技有限公司); Tris (北京索莱宝科技有限公司); 纯水 (屈臣氏商标有限公司); 氢氧化钠 (分析纯, 凯玛特天津化工科技有限公司); 甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取盐酸青藤碱对照品 2.50 mg 于 10 mL 棕色量瓶中, 适量纯水超声溶解, 冷却, 放至室温后定容, 配制成质量浓度为 0.25 mg/mL 的对照品溶液, 在 4 ℃ 下贮存备用, 进样前过 0.22 μm 微孔滤膜。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 片剂 取正清风痛宁片 (批号 1809103) 20 片, 用小刀除去包衣, 研磨成粉末, 精密称取 32.94 mg 于 25 mL 量瓶中, 加入适量纯水超声溶解, 冷却, 待放至室温后定容, 即得质量浓度为 1.317 6 mg/mL 的供试品溶液, 4 ℃

收稿日期: 2020-01-21

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2018ZX09201011)

作者简介: 吴红根 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药注射剂再评价相关技术研究。E-mail: 1518579842@qq.com

* 通信作者: 李文龙 (1980—), 男, 博士, 副研究员, 博士生导师, 从事中药质量控制和制药过程分析技术研究。E-mail: wshliwenlong@126.com

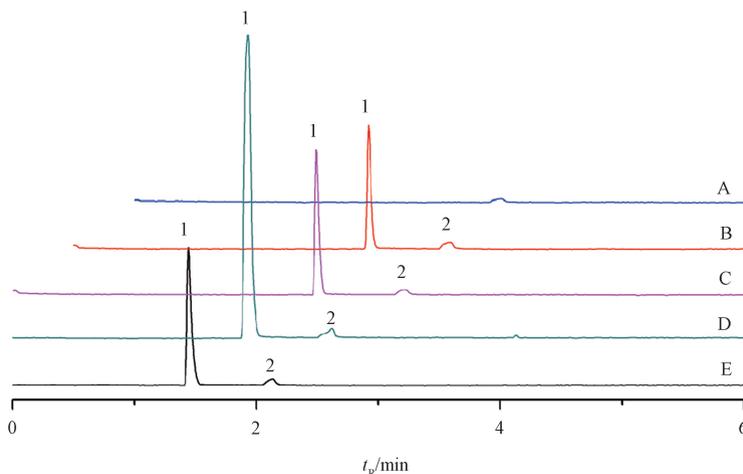
下贮存备用, 进样前过 0.22 μm 微孔滤膜。

2.2.2 缓释片 取正清风痛宁缓释片(批号 1809101) 20 片, 研磨成粉末, 精密称取 32.99 mg 于 25 mL 量瓶中, 加入适量纯水超声溶解, 冷却, 放至室温后定容, 即得质量浓度为 1.319 6 mg/mL 的供试品溶液, 在 4 °C 下贮存备用, 进样前过 0.22 μm 微孔滤膜。

2.2.3 注射剂 精密量取正清风痛宁注射液(批号 1806401) 1 mL (相当于盐酸青藤碱 25 mg), 置于 25 mL 量瓶中, 加入适量纯水稀释超声, 冷却, 放至室温后定容, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液, 在 4 °C 下贮存备

用, 进样前过 0.22 μm 微孔滤膜。

2.3 电泳条件 采用未涂层石英毛细管色谱柱(50.2 cm×50 μm, 有效长度 40 cm); 缓冲液 H₃BO₃-Tris (0.2 mol/L); 进样方式电动进样; 电压 10 kV; 进样时间 5 s; 分离电压 15 kV; 在 262 nm 波长下进行检测。新的毛细管柱在首次使用时需做活化处理, 分别用甲醇 10 min、纯水 10 min、1 mol/L NaOH 20 min、纯水 20 min, 运行缓冲液冲洗 15 min。样品运行前依次用 NaOH、水、缓冲液各冲洗 5 min, 所有溶液进毛细管之前均经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤。电泳色谱图见图 1。



注: A 为空白, B 为对照品溶液, C 为正清风痛宁缓释片, D 为正清风痛宁注射液, E 为正清风痛宁片。1 为盐酸青藤碱, 2 为杂质。

图 1 不同样品毛细管电泳色谱图

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密称取盐酸青藤碱对照品 0.5 mg, 按“2.1”项下方法制备质量浓度为 0.5 mg/mL 的盐酸青藤碱对照品溶液, 精密量取适量, 置于不同的 10 mL 棕色量瓶中, 加纯水稀释并定容, 得到盐酸青藤碱质量浓度分别为 15.625、31.25、62.5、125、250、500 mg/mL 的溶液, 在“2.3”项电泳条件下进行测定, 记录盐酸青藤碱的色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $Y = 6.50 \times 10^4 X + 541.57$ ($r = 0.9988$), 在 15.625~500 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取同一质量浓度的盐酸青藤碱对照品溶液, 在“2.3”项条件下连续进样 6 次。结果显示, 盐酸青藤碱峰面积和迁移时间的 RSD 分别为 1.82%、0.45%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密称取片剂粉末, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项条件下于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样, 测得盐酸青藤碱的峰面积和迁移时间的 RSD 分别为 1.34%、1.25%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取片剂粉末, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项条件下连续进样 6 次, 测得盐酸青藤碱峰面积、迁移时间 RSD 分别为 1.80%、0.86%, 表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取片剂粉末 32.9 mg, 平行 6 份, 分别加入盐酸青藤碱质量相当于 0.491 mg 的对照品溶液, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项条件下进样, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 盐酸青藤碱加样回收率试验 (n=6)

取样量/mg	原有量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
32.94	545.549	491	1 013.583	95.32	100.30	3.50
32.94	512.493	491	1 027.523	104.89		
32.95	488.509	491	978.734	99.84		
32.96	547.125	491	1 053.481	103.13		
32.96	532.442	491	1 011.943	97.66		
32.99	485.664	491	981.220	100.93		

2.4.6 检测限 将样品逐级稀释,在“2.3”项条件下计算峰面积响应值与基线噪音的强度,以S/N=3为检测限,测得结果为0.613 8 μg/mL。

2.5 样品含量测定 取盐酸青藤碱制剂3种剂型各3批,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项条件下进样,计算含量和迁移时间,结果见表2。

表2 3种盐酸青藤碱制剂含量测定结果 (n=9)

剂型	批号	含量	RSD/%	迁移时间/min	RSD/%
片剂	1807111	20.20 mg/片	0.83	2.450	1.05
	1809103	20.40 mg/片		2.454	
	1809104	20.50 mg/片		2.408	
缓释片	1801112	51.80 mg/片	3.9	2.471	2.40
	1809101	56.00 mg/片		2.417	
	1809102	54.60 mg/片		2.481	
注射液	1806401	48.90 mg/支	2.3	2.417	0.25
	1807404	47.25 mg/支		2.429	
	1809403	49.45 mg/支		2.421	

3 讨论与结论

缓冲液在毛细管电泳分析中起着决定性作用,本实验尝试了磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、硼砂-氢氧化钠缓冲液、硼酸-氢氧化钠缓冲液、硼酸-硼砂缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、硼酸-Tris缓冲液。通过比较发现只有硼酸能够将杂质峰与样品峰分开,而且Tris能够有效的改善拖尾。在选定了缓冲液种类之后,对缓冲液的pH进行优化,分别在pH 6.24、6.43、6.5、6.6、6.83下进行试验,发现只有在pH 6.5的时候分离效果最佳,在这个环境下杂质峰和样品峰能够完全基线分离,并且基线噪音干扰最小,且峰形最美观。电压的大小影响出峰速度,电压较大时出峰速度快,但易造成基线不稳,也可能使峰的分离效果不好,电压较小时,能实现峰的分离,但易造成拖尾,本实验在电压分别为10、15、20 kV的条件下进行试验,发现在电压为15 kV时,峰的分离效果最好。

通过建立毛细管电泳方法,在4 min内将盐酸青藤碱制剂中的物质完全分离,这种方法与现有的分离盐酸青藤碱的方法相比,明显缩短了分析时间,并且大大减少了有毒试剂的消耗。因此,该方法简便环保,稳定可靠,具有一定实用性,可快速鉴定盐酸青藤碱,以期为其制剂质量的进一步研究提供参考。

参考文献:

[1] 魏燕,张永生,郑杭生,等. 盐酸青藤碱传递体的制备及其对大鼠类风湿性关节炎的药效评价[J]. 中草药, 2017, 48(23): 4872-4879.

[2] Yan Y, Zhang H, Sun J, et al. Enhanced transdermal delivery of sinomenine hydrochloride by ethosomes for anti-inflammatory treatment[J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2016, 36: 201-207.

[3] 陈淑瑜,邹勇,黄轶群. 盐酸青藤碱对Jeko-1细胞增殖、

凋亡的影响及其作用机制研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(6): 1675-1679.

[4] 李晓娟,王培训,刘良,等. 青藤碱抗炎抗风湿作用机理研究[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(1): 34-36.

[5] 吴飞驰. 电致孔透入正清风痛宁技术在风湿病治疗中的应用[C] //全国第十届中国中西医结合风湿病学术会议论文集汇编. 成都: 中国中西医结合学会, 2012: 4.

[6] 马晓宇,王冲,莫颖宁. 两种方法测定盐酸青藤碱纯度及不确定度评定[J]. 海峡药学, 2014, 26(12): 46-49.

[7] 郭玉岩,李敏,史磊,等. HPLC法测定盐酸青藤碱外敷散中盐酸青藤碱含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(11): 42-43.

[8] 许乾丽,茅向军. HPLC法测定追风活络胶囊中青藤碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(6): 402-403.

[9] 阳勇,罗维早,梁旭明,等. HPLC法测定芪黄胶囊中青藤碱的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(30): 4243-4244.

[10] 黄海萍,李文莉. 正清风痛宁片含量测定方法改进[J]. 中国药师, 2007, 10(2): 142-144.

[11] 何晓艳,钟庆元. 正清风痛宁缓释片中盐酸青藤碱的含量测定[J]. 华夏医药, 2007, 2(1): 27-29.

[12] 袁涛,朱永波. 正清风痛宁注射液含量测定方法的改进[J]. 中国药师, 2011, 14(9): 1293-1295.

[13] 陈俊,赵亮,张海,等. 非水毛细管电泳法测定青藤碱中盐酸青藤碱的含量[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(6): 434-436.

[14] 翟海云,王峻梅,陈缵光,等. 毛细管电泳高频电导法测定青藤碱药材及制剂中青藤碱的含量[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(12): 2256-2258.

[15] 尚永辉,杨会议,毛茹,等. β-环糊精修饰碳糊电极测定盐酸青藤碱[J]. 化学分析计量, 2017, 26(3): 42-45.

[16] 高森. 青藤碱和盐酸青藤碱的红外和拉曼光谱研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2016.