

HPLC 测定痛风清洗液中苦参碱和氧化苦参碱的含量*

李艳¹, 张贵华^{2△}, 张玲忠², 王剑², 刘维超², 和明伟²

(1. 成都军区昆明总医院, 云南 昆明 650032; 2. 云南中医学院第一附属医院, 云南 昆明 650032)

摘要: 目的 建立痛风清洗液中苦参碱和氧化苦参碱的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, Dikma Platisil NH₂ 柱(250mm×4.6mm, 5μm), 流动相为乙腈-无水乙醇-2%磷酸(75:12.5:12.5, v/v), 流速 1.0mL·min⁻¹, 检测波长 220nm, 进样量 10μL, 柱温 30℃。结果 苦参碱、氧化苦参碱的线性范围分别为 0.784~9.408μg(r=1.0000), 0.484~5.808μg(r=0.9999)。苦参碱的平均加样回收率为 100.99%, RSD=1.63%(n=9); 氧化苦参碱的平均加样回收率为 99.08%, RSD=1.89%(n=9)。结论 本方法操作简便、快速、准确, 灵敏度高, 可用于该制剂的质量控制, 同时完善并提高了原有的药品质量标准。

关键词: 高效液相色谱法; 痛风清洗液; 苦参碱; 氧化苦参碱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2016)06-0032-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.06.008

痛风清洗液为云南省中医医院研制的院内制剂, 处方由苦参、金荞麦、虎杖、透骨草等十味药组成, 具有清热祛湿、消肿止痛的功效。临床主要用于急性痛风性关节炎, 疗效显著。苦参为该制剂的君药, 苦参碱和氧化苦参碱为苦参药材的主要成分^[1-2], 具有抗炎抑菌、抗病毒、免疫抑制, 镇痛, 抗肿瘤等作用^[3-5]。有文献报道二者在一定条件下可以相互转化^[6-7], 影响含苦参的复方制剂的质量标准研究, 单独测定苦参碱或氧化苦参碱难以有效控制制剂质量。部颁标准采用酸碱滴定法测定复方苦参注射液中总生物碱的含量^[8], 痛风清洗液目前仅以薄层色谱法定性检查质量, 而目前关于苦参及其制剂中生物碱类成分含量测定仅见薄层色谱扫描法^[9]、HPLC 测定苦参碱的报道^[10-15]。为了有效控制药品质量, 保证疗效, 本研究建立了同时测定制剂中 2 种主要生物碱含量的 HPLC 分析方法, 该法操作简便、灵敏度高、分离度好, 可用于痛风清洗液的质量控制, 同时为本课题痛风清洗液开发成巴布剂, 建立痛风清巴布剂质量控制方法提供技术支持。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪、Agilent 系列波长检测器、四元泵、化学工作站(安捷伦公司); 苦参碱(批号 110805-200508)及氧化苦参碱对照品(批号 110780-201007)均购自中国药品生物制品检定所, 乙腈、无水乙醇为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯; 痛风清洗液(云南省中医医院制剂室配制, 批号 20150701, 20150702, 20151119, 20151120, 20160329, 20160330, 20160609, 20160610)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Dikma Platisil NH₂ 柱(250mm×4.6mm, 5μm), 流动相为乙腈-无水乙醇-2%磷酸(75:12.5:12.5, v/v), 流速 1.0mL·min⁻¹, 检测波长 220nm, 进样量 10μL, 柱温 30℃。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的苦参碱对照品 3.92mg 和氧化苦参碱 2.42mg, 置同一 5mL 容量瓶中, 加乙腈-无水乙醇(80:20, v/v)溶解并稀释至刻度线, 制成每 1mL 含苦参碱 0.784mg, 氧化苦参碱 0.484mg 的混合对照品溶液, 即得。

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2015Y318)

收稿日期: 2016-10-10

作者简介: 李艳(1986-), 女, 云南禄丰人, 中药师, 主要从事中药调剂工作。

△通信作者: 张贵华, Email: napln@163.com

2.3 供试品溶液的制备

精密量取痛风清洗液 10mL,置分液漏斗中,加入浓氨试液 2mL,充分振摇,用 60mL 氯仿分 3 次萃取(20mL,20mL,20mL),收集氯仿液,水浴蒸干,残渣加适量乙腈-无水乙醇(80:20,v/v)使溶解,并转移至 10mL 量瓶中加乙腈-无水乙醇(80:20,v/v)稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方比例取除苦参以外的各味药材,按痛风清洗液的制备工艺制成阴性样品,再按“2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

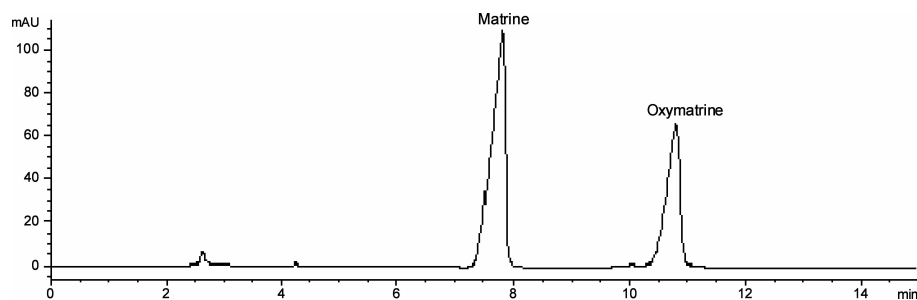
2.5 系统适应性试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性

对照溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定。结果阴性样品在相应的保留时间无吸收峰出现(见色谱图 1-3),按苦参碱计算。理论塔板数大于 4 000,在上述色谱条件下,其他成分对苦参碱和氧化苦参碱的含量测定无干扰,苦参碱、氧化苦参碱峰与其他峰分离较好。

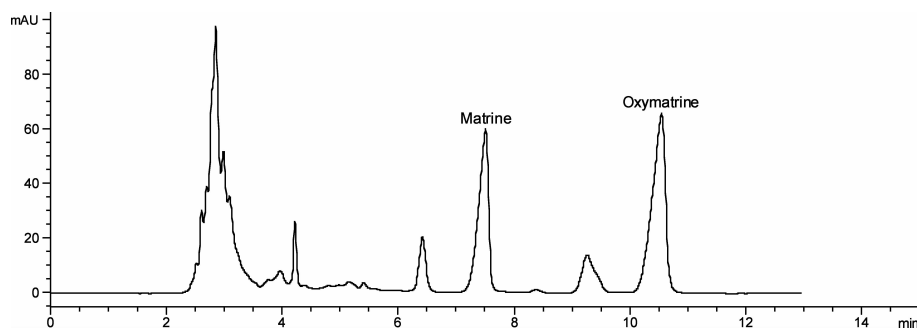
2.6 线性关系考察

分别精密吸取上述对照品溶液各 1、2、5、8、10、12 μ L 注入高效液相色谱仪,测定。以峰面积积分值 Y 对进样量 X(μ g),进行线性回归,计算回归方程。结果表明苦参碱在 0.784~9.408 μ g 范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=579.90X+1.47$ ($r=1.0000$);氧化苦参碱在 0.484~5.808 μ g 范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=587.74X+1.51$ ($r=0.9999$)。



(Matrine 为苦参碱, Oxymatrine 为氧化苦参碱)

图 1 对照品色谱图



(Matrine 为苦参碱, Oxymatrine 为氧化苦参碱)

图 2 样品色谱图

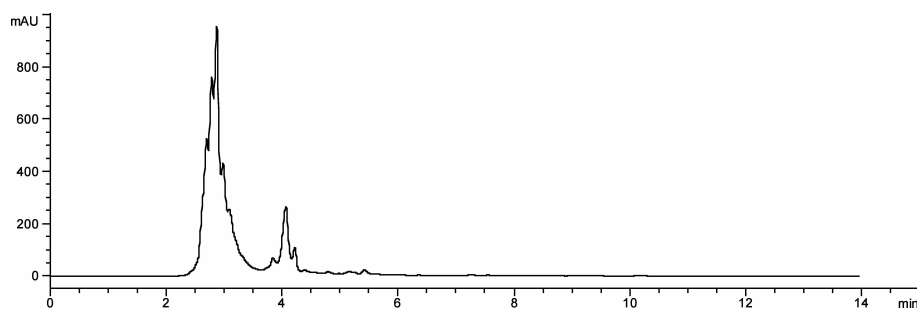


图 3 阴性对照色谱图

2.7 精密度试验

分别精密吸取上述对照品溶液各 5 μ L, 连续进样 6 次, 记录各色谱峰的峰面积, 计算其相对标准偏差(RSD)。苦参碱和氧化苦参碱峰面积的 RSD 分别是 1.41% 和 1.60%, 结果表明, 仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液分别在 0、2、4、6、8、10、12、24h 进样 10 μ L, 记录各色谱峰的峰面积, 测定其中苦参碱和氧化苦参碱的含量, 计算 RSD。结果分别是 1.39% 和 1.62%, 表明低温保存下的痛风清洗液稳定性较好, 常温下 1d 内也能保持较好的稳定性。

2.9 重复性试验

取同一供试品洗液样品(20151120)6 份, 按上述方法制备样品并进行检测, 苦参碱和氧化苦参碱的质量浓度分别为 0.2944、0.1319mg \cdot mL⁻¹, RSD 分别为 0.31% 和 1.01%, 表明供试品溶液的制备方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

精密吸取已知含量的同一样品溶液 9 份, 精密加入适量的苦参碱和氧化苦参碱, 按同样的方法制备供试品溶液, 测定苦参碱和氧化苦参碱的含量, 计算回收率和 RSD, 结果见表 1。

表 1 2 种成分的加样回收率(n=9)

测定成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
苦参碱	0.2662	0.1862	0.4518	99.68	100.99	1.63
	0.2662	0.1862	0.4559	101.88		
	0.2662	0.1862	0.4516	99.57		
	0.2662	0.2660	0.5326	100.15		
	0.2662	0.2660	0.5348	100.98		
	0.2662	0.2660	0.5409	103.27		
	0.2662	0.3458	0.6156	101.04		
	0.2662	0.3458	0.6078	98.79		
	0.2662	0.3458	0.6242	103.53		
氧化苦参碱	0.3812	0.2660	0.6427	98.31	99.08	1.89
	0.3812	0.2660	0.6493	100.79		
	0.3812	0.2660	0.6404	97.44		
	0.3812	0.3810	0.7479	96.25		
	0.3812	0.3810	0.7541	97.87		
	0.3812	0.3810	0.7693	101.86		
	0.3812	0.4953	0.8823	101.17		
	0.3812	0.4953	0.8697	98.63		
	0.3812	0.4953	0.8735	99.39		

2.11 样品含量测定

分别精密吸取对照品溶液 5 μ L 与供试品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 测定, 计算样品中苦参碱和氧化苦参碱的含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 测定成分的选择

2015 年版《中国药典》(一部)苦参项下, 测定苦参碱与氧化苦参碱的总量以控制苦参药材质量。故本制剂仅以君药苦参中有效成分苦参碱和氧化苦参碱作为含量测定的指标成分。经试验, 单独测定苦参单味药材中氧化苦参碱的含量为苦参碱的 3

表 2 痛风清洗液中 2 种成分含量(单位:mg \cdot mL⁻¹, n=8)

批号	苦参碱	氧化苦参碱
20150701	0.4313	0.1799
20150702	0.4134	0.1713
20151119	0.2741	0.1245
20151120	0.2944	0.1319
20160329	0.3106	0.1158
20160330	0.2882	0.1057
20160609	0.2538	0.1345
20160610	0.2246	0.1451

倍以上,而痛风清洗液中苦参碱的含量为氧化苦参碱的2倍多,反而高于氧化苦参碱,可能与制剂在制备过程中氧化苦参碱转化为苦参碱有关,这与文献报道一致^[16-17],有待进一步研究。由于苦参碱与氧化苦参碱存在转化关系,本实验首次采用HPLC同时测定痛风清洗液中二者含量,对建立含量测定的质量标准,有效控制该院内制剂质量,保证痛风清洗液治疗急性痛风性关节炎的临床疗效具有一定现实意义。

3.2 色谱柱的选择

使用C₁₈柱进行测定时,保留时间短,样品峰形不好,苦参碱、氧化苦参碱与杂质峰的分离不佳,使用氨基柱后问题得到解决,所以本实验更适合使用氨基柱。从色谱图可以看出苦参碱和氧化苦参碱的测定不受其他组分干扰,该方法具有专属性强,重复性好,准确度高等特点。

3.3 供试品溶液的制备

参考《中国药典》2015年版一部对三氯甲烷提取次数进行考察,结果过中性氧化铝柱样品与氯仿萃取色谱图差别不大,苦参碱与氧化苦参碱的提取率相近,从节省时间考虑,最后取得“2.3”项下为供试品溶液制备的最佳方法。

3.4 流动相的选择

本文选择不同比例乙腈-无水乙醇-2%磷酸为流动相,结果调整比例至乙腈-无水乙醇-2%磷酸(75:12.5:12.5, v/v),峰形较好,苦参碱峰的塔板数高,与周围峰分离度较好,保留时间适中。

3.5 含量测定结果

本实验测定的8个批号痛风清洗液样品中苦参含量稍高低不均,考虑可能与苦参药材的不同批次或产地有关。由此可以看出,统一药材的来源、产地等相关因素,对控制制剂质量及其质量标准,保证其临床疗效,具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 苗抗立,张建中,董颖,等. 苦参的化学成分及药理的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(2):69-73.
- [2] 李弟灶,潘显道,吴松. 苦参碱类生物碱研究进展[J]. 医学研究通讯,2005,34(1):65-66.

- [3] 姜静,冯建伟,陈靖,等. 氧化苦参碱的镇痛作用[J]. 中药药理与临床,2012,28(6):50-52.
- [4] 鲍娇琳,陆金健,陈修平,等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理,2012,23(3):369-373.
- [5] 张丽华,陈邦恩,潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展[J]. 中草药,2009,40(6):1000-1003.
- [6] 潘广洲,李峰,李健. 苦参碱和氧化苦参碱的转化对苦参提取工艺的影响 [J]. 现代中药研究与实践,2008,22(2):52-54.
- [7] 宋小妹,考玉萍. 洁身洗剂中苦参化学成分转化研究[J]. 西北药学杂志,2000,15(6):257-259.
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂 (第14册)[M]. 1997, WS3-B-2752-97.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:203.
- [10] 杨梦玉,邬国庆,周富荣. 薄层扫描法测定苦参中苦参碱的含量[J]. 中国中药杂志,1999,24(6):337-338.
- [11] 田娟,王维皓,高慧敏,等. HPLC测定复方苦参注射液中苦参碱、槐定碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(3):222-223.
- [12] 任洁,刘光斌,邹干朋,等. HPLC测定舒阴洗液中苦参碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):76-77.
- [13] 林祖武. HPLC法测定苦参洗剂中苦参碱的含量 [J]. 中医药导报,2011,17(10):70-71.
- [14] 史银基,刘砥威,石雪,等. HPLC测定阿娜尔妇洁液中苦参碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):119-121.
- [15] 杨君,王世玲,郭晓华,等. HPLC法测定复方苦参凝胶剂中苦参碱与辣椒碱的含量 [J]. 中国药师,2005,8(8):633-635.
- [16] 李水清,王国平,刘焱文. HPLC法测定治糜灵栓中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国药师,2007,10(3):250-251.
- [17] 江维克,王丽. HPLC法同时测定复方石韦片和苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量 [J]. 中成药,2005,27(1):45-48.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第44页)

Effect of Scalp Acupuncture on Cerebral Blood Flow in Patients with Cerebral Infarction Using Magnetic Resonance PWI Technique

HU Jin, CHU Haoran, WANG Ying, XIE Zongliang, ZHANG Jiale
(1. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of CM, Hefei 230061, China;
2. Acupuncture Clinical College, Anhui University of CM, Hefei 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the combined scalp acupuncture effect features and advantages of acupuncture in the treatment of cerebral infarction. **Methods** 180 cases of cerebral infarction were randomly divided into acupuncture group, acupuncture group and integrated group (scalp acupuncture combined with body acupuncture), each group of 60 cases, scalp acupuncture group take the top line, top 1, top 2 side line side line, D, D, temporal front and posterior temporal line; Acupuncture the group took ipsilateral Jianyu, Quchi, Hegu, Waiguan, futu, double knee eye, double zusanli. With the ipsilateral Jiquan, chize, Neiguan, air, Weizhong, yinlingquan, Sanyinjiao, Taichong; comprehensive group the combination of scalp acupuncture combined with body acupuncture. Treatment 6 days a week, rest 1 days after the treatment, 4 weeks for 1 courses, 1 after the observation of clinical efficacy. **Results** To evaluate the curative effect score, from the degree of nervous function defect and activities of daily living, simple type Fugl-Meyer motor score, upper limb muscle spasticity was measured and the degree of disability and other aspects, after 1 courses of treatment, the curative effect is more significant in combination group. The score in the degree of neural function defect (NIHSS), activities of daily living (ADL BI), the upper limb movement simple evaluation method(FMA), lower limb movement simple evaluation method (FMA), the determination of muscle spasticity (A Shworth), the degree of disability evaluation (Rankin score), statistically significant differences ($P<0.05$), PWI was performed before and after treatment, improve blood irrigation area and the time of observation, the results showed that the method can significantly improve the treatment of patients with cerebral blood perfused area and time, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Scalp acupuncture has obvious advantages in the treatment of cerebral infarction, and has significant clinical curative effect.

KEY WORDS: scalp acupuncture; acupuncture; clinical observation; cerebral infarction

(原文见第 32 页)

Determination of Matrine and Oxymatrine in TongFengqing Lotion by HPLC

LI Yan¹, ZHANG Guihua², ZHANG Lingzhong², WANG Jian², LIU Weichao², HE Mingwei²
(1. Kunming General Hospital of PLA, Kunming 650032 China,
2. The First Affiliated Hospital of Yunnan University of TCM, Kunming 650032, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for determination of matrine and Oxymatrine in Tongfengqing Lotion. **Methods** The content of matrine and oxymatrine was determined by HPLC on Dikma Platisil NH₂ column (250mm×4.6mm, 5μm) with a mobile phase of acetonitrile-absolute alcohol-2% phosphoric acid solution(75:12.5:12.5, v/v), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 220 nm, the injection volume was 10 μL, the column temperature was being 30 °C. **Results** The calibration curves of matrine, oxymatrine were in good linearity over the ranges of 0.784~9.408 μg($r=1.0000$), 0.484~5.808 μg($r=0.9999$), and the average recovery of matrine and oxymatrine was 100.99%, 99.08% with RSD of 1.63%, 1.89%(n=9). **Conclusion** The method is simple, quick, accurate, specific and reproducible for the quality control of TongFengqing lotion.

KEY WORDS: HPLC; TongFengqing lotion; matrine; oxymatrine