

引用:李定发,邓淙友,张坚祥,李秀枝,吴佳璇,李映娜,周密,王闽予. 优化苦参配方颗粒 HPLC 含量测定方法[J]. 湖南中医杂志,2020,36(9):173-176.

优化苦参配方颗粒 HPLC 含量测定方法

李定发^{1,2}, 邓淙友^{1,2}, 张坚祥^{1,2}, 李秀枝^{1,2}, 吴佳璇^{1,2}, 李映娜^{1,2}, 周密^{1,2}, 王闽予^{1,2}

(1. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山, 528244;

2. 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山, 528244)

[摘要] 目的:优化苦参配方颗粒中苦参碱和氧化苦参碱含量的测定方法。方法:采用 HPLC 法,色谱柱为 Agilent ZORBAX NH2 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-无水乙醇-3% 磷酸溶液(80:10:10);流速:1 ml/min;检测波长:220 nm;柱温:30℃,进样量:5 μl。结果:苦参碱在 73.620 ~ 736.200 ng 范围内线性关系良好,回归方程为 $y = 548.2629x - 1200.6932$, $R = 0.9999$ 。氧化苦参碱在 79.511 ~ 795.110 ng 范围内线性关系良好,回归方程为 $y = 533.4244x - 560.8712$, $R = 0.9999$ 。精密度、重复性、稳定性试验 RSD 均 < 2%;苦参配方颗粒中苦参碱加样回收率在 98% ~ 103% 之间, RSD 为 1.52%, 氧化苦参碱加样回收率在 99% ~ 103% 之间, RSD 为 1.17%。结论:该方法简便快捷,准确度高,重复性好,可为相关测定方法的改进提供参考。

[关键词] 苦参;HPLC;苦参碱;氧化苦参碱

[中图分类号] R284.4 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.09.067

Optimization of high-performance liquid chromatography for content determination of Radix Sophorae Flavescentis formula granules

LI Dingfa^{1,2}, DENG Congyou^{1,2}, ZHANG Jianxiang^{1,2}, LI Xiuzhi^{1,2}, WU Jiaxuan^{1,2},

LI Yingna^{1,2}, ZHOU Mi^{1,2}, WANG Minyu^{1,2}

(1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, Guangdong, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Foshan 528244, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To optimize the method for content determination of matrine and oxymatrine in Radix Sophorae Flavescentis formula granules. Methods: High-performance liquid chromatography was performed on an Agilent ZORBAX NH2 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-anhydrous ethanol-3% phosphoric acid (80:10:10) at a flow rate of 1 ml/min, a detection wavelength of 220 nm, a column temperature of 30℃, and a sample size of 5 μl. Results: Matrine showed a good linear relationship within the range of 73.620 ~ 736.200 ng, with a regression equation of $y = 548.2629x - 1200.6932$ ($r = 0.9999$). Oxymatrine showed a good linear relationship within the range of 79.511 ~ 795.110 ng, with a regression equation of $y = 533.4244x - 560.8712$ ($r = 0.9999$). Relative standard deviation (RSD) was < 2% for accuracy, repeatability, and stability tests. In Radix Sophorae Flavescentis formula granules, matrine had a recovery rate of 98% ~ 103% (RSD = 1.52%), and oxymatrine had a recovery rate of 99% ~ 103% (RSD = 1.17%). Conclusion: This method is simple and convenient, with high accuracy and good repeatability, which provide a reference for improving related determination methods.

[Keywords] Radix Sophorae Flavescentis; high-performance liquid chromatography; matrine; oxymatrine

基金项目:广东省佛山市科学技术局项目(2016AG100912)

第一作者:李定发,男,主管中药师,研究方向:配方颗粒质量标准的研究

通讯作者:邓淙友,男,主管中药师,研究方向:配方颗粒质量标准的研究, E-mail: 630336784@qq.com

苦参是一味常用的中药材,来源于豆科植物苦参的干燥根,具有清热燥湿、杀虫利尿的功效。苦参中含有生物碱类,黄酮类等多种化学成分^[1],其中生物碱类中的苦参碱和氧化苦参碱含量为 2015 版《中国药典》苦参项下规定的苦参药材质量控制成分^[2]。

苦参配方颗粒是由单味苦参饮片,采用提取、浓缩和制剂工艺精制而成,其主要有效成分为苦参碱和氧化苦参碱^[3-4]。为控制苦参配方颗粒的质量,保证检测方法稳定、准确,本文优化了苦参碱和氧化苦参碱两种成分的含量测定方法。该法简便、准确、快捷,可作为苦参配方颗粒产品的质量的控制方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器 2695 高效液相色谱仪(沃特世仪器公司);KQ-500DE 型超声清洗器(昆山仪器公司);Milli-Q 超纯水机(默克仪器公司);ME204E 万分之一天平(梅特勒-托利多公司)。

1.2 试药 苦参碱(批号:110805-201709)、氧化苦参碱(批号:110780-201508)购于中国药品生物制品检定所,供含量测定用。乙腈:色谱纯;水为超纯水(自制)。无水乙醇、氨水、三氯甲烷等试剂均为分析纯。苦参配方颗粒由广东一方制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX NH2 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液(80:10:10),流速:1.0 ml/min,柱温:30℃。检测波长:220 nm,进样量:5 μl。理论板数按氧化苦参碱峰计算应不低于 2000。

2.2 对照品溶液的制备 取苦参碱对照品、氧化苦参碱对照品适量,精密称定,加乙腈-无水乙醇(8:2)混合溶液,制成每 1 ml 各含苦参碱、氧化苦参碱 0.15 mg 的混合溶液,即得。苦参碱与氧化苦参碱对照品图谱见图 1。

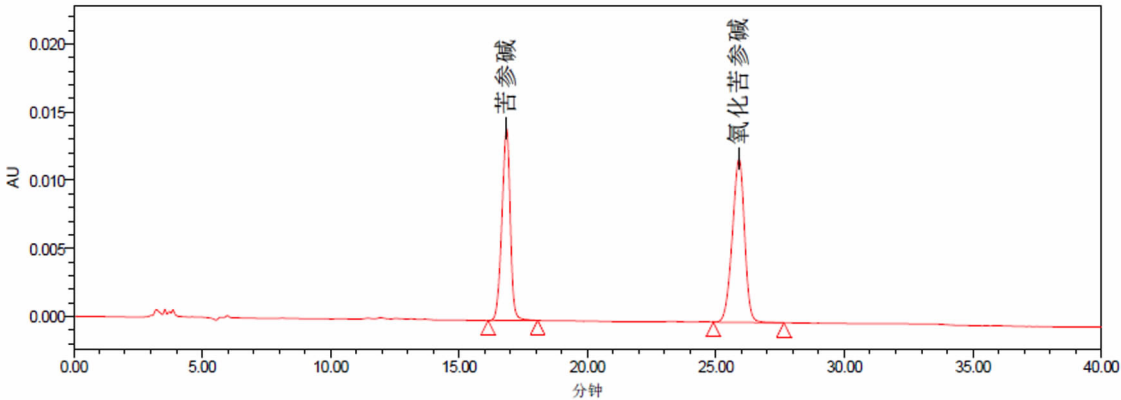


图 1 苦参碱/氧化苦参碱对照品的 HPLC 图谱

2.3 供试品的制备考察

2.3.1 不同提取溶剂用量的考察 取苦参配方颗粒研细,取 0.2 g,精密称定,平行 3 组,每组 2 份,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液 0.5 ml,分别精密加入三氯甲烷 15、25、50 ml,密塞,称定重量,加热回流 45 min,放冷,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 ml,加在中性氧化铝柱(100~200 目,5 g,内径 1 cm)上,依次以三氯甲烷、三氯甲烷-甲醇(7:3)混合溶液各 20 ml 洗脱,收集洗脱液,回收溶剂至干,残渣加无水乙醇适量使溶解,并转移至 10 ml 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件测定。结果表明采用三氯甲烷作为提取溶剂量,苦参配方颗粒中苦参碱与氧化苦参碱已基本提取完全。

2.3.2 不同提取方式的考察 取苦参配方颗粒研细,取 0.2 g,精密称定,平行 2 组,每组 2 份,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液 0.5 ml,精密加入三氯甲烷 25 ml,密塞,称定重量,一组加热回流 45 min,一组超声处理 45 min,放冷,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,滤过。其余按“2.3.1”项下

测定。结果发现加热回流比超声处理提取更完全。(见表 1)

表 1 不同提取方式的比较

序号	取样量(g)	提取方式	苦参碱峰面积值	氧化苦参碱峰面积值	苦参碱与氧化苦参碱的总量(%)
1	0.2036	回流	66223	245029	3.12
2	0.2023	超声	50893	165563	2.19

2.3.3 不同回流温度考察 取苦参配方颗粒研细,取 0.2 g,精密称定,平行 2 组,每组 2 份,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液 0.5 ml,精密加入三氯甲烷 25 ml,密塞,称定重量,分别在 80℃、90℃加热回流 45 min,放冷,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,滤过。其余按“2.3.1”项下测定。结果发现选取 80℃、90℃两个加热回流温度对结果影响不大。(见表 2)

表 2 不同回流温度的比较

序号	取样量(g)	回流温度(℃)	苦参碱峰面积值	氧化苦参碱峰面积值	苦参碱与氧化苦参碱的总量(%)
1	0.2036	80	66223	245029	3.12
2	0.2058	90	68759	250485	3.17

2.3.4 浓氨试液浸泡时间考察 取苦参配方颗粒研细,取0.2 g,精密称定,平行3组,每组2份,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液0.5 ml,分别浸泡0、10、60 min后,精密加入三氯甲烷25 ml,密塞,称定重量,加热回流45 min,放冷,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,滤过。其余按“2.3.1”项下测定。结果发现加入浓氨试液后,不同浸泡时间对结果影响十分显著。(见表3)

表3 浓氨试液不同浸泡时间的比较

序号	取样量(g)	浸泡时间(min)	苦参碱峰面积值	氧化苦参碱峰面积值	苦参碱与氧化苦参碱的总量(%)
1	0.2097	0	27645	71965	0.98
2	0.2022	10	46036	128108	1.72
3	0.2056	60	83712	262084	3.43

2.3.5 过中性氧化铝柱不同滴速的考察 本实验以上述实验作为基础,对样品制备过程采取过中性氧化铝步骤滴速进行考察,发现不同滴速对结果影响十分显著。(见表4)

表4 过中性氧化铝柱不同滴速的比较

序号	滴速(s/滴)	苦参碱峰面积值	氧化苦参碱峰面积值	苦参碱与氧化苦参碱的总量(%)
1	0.5	60519	244311	3.06
2	1	66223	245029	3.12
3	2	63907	237399	3.02
4	3	40287	174984	2.17

2.3.6 过中性氧化铝柱步骤必要性的考察 取苦参配方颗粒研细,取0.2 g,精密称定,平行2组,每组2份,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液0.5 ml,精密加入三氯甲烷25 ml,密塞,称定重量,加热回流45 min,放冷,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,滤过。一组精密量取续滤液5 ml,回收溶剂至干,残渣加无水乙醇适量使溶解,并转移至10 ml量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过。另一组精密量取续滤液5 ml,加在中性氧化铝柱(100~200目,5 g,内径1 cm)上,依次以三氯甲烷、三氯甲烷-甲醇(7:3)混合溶液各20 ml洗脱,收集洗脱液,回收溶剂至干,残渣加无水乙醇适量使溶解,并转移至10 ml量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,均按“2.1”项下色谱条件测定。结果发现不过中性氧化铝柱,对色谱峰分离度、纯度无明显影响,将不过中性氧化铝柱样品结果进行DAD全波长扫描,确认苦参碱与氧化苦参碱未存在其他杂质干扰。(见表5、表6)

表5 过中性氧化铝柱步骤必要性考察

序号	取样量(g)	苦参碱峰面积值	氧化苦参碱峰面积值	苦参碱与氧化苦参碱的总量(%)
过柱	0.2036	66223	245029	3.12
不过柱	0.2056	83712	262084	3.43

表6 不过中性氧化铝柱样品扫描结果

方法	纯度因子1	纯度因子2	纯度因子3	纯度因子4	纯度因子5	纯度因子6
含量	999.583	997.367	996.215	997.163	994.913	996.418

2.3.7 供试品溶液制备 按照以上试验结果优选苦参配方颗粒样品提取方法,即取苦参配方颗粒,研细,取0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液0.5 ml,浸泡60 min,精密加入三氯甲烷25 ml,密塞,称定重量,加热回流45 min,放冷,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液5 ml,回收溶剂至干,残渣加无水乙醇适量使溶解,并转移至10 ml量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品混合溶液(苦参碱:147.239 μg/ml,氧化苦参碱:159.022 μg/ml)1、2、4、6、8 ml,分别置于10 ml量瓶中,再分别加乙腈-无水乙醇(8:2)混合溶液稀释至刻度,摇匀,配成不同浓度的系列对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件测定,以峰面积积分值为纵坐标,进样量(ng)为横坐标,绘制标准曲线。(见表7)

表7 回归方程、相关系数和线性范围

组分	回归方程	相关系数	线性范围(ng)
苦参碱	$y = 548.2629x - 1200.6932$	$r = 0.9999$	73.620 ~ 736.20
氧化苦参碱	$y = 533.4244x - 560.8712$	$r = 0.9999$	79.511 ~ 795.11

2.5 仪器精密度试验 取样品(批号8055571),按“2.3.7”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,结果苦参碱和氧化苦参碱峰面积的RSD分别为0.98%和0.71%。

2.6 重复性试验 取同一批样品(批号8055571)6份,按“2.3.7”项下方法,制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果苦参碱和氧化苦参碱峰面积的RSD分别为1.02%和0.98%。

2.7 稳定性试验 取批号8055571样品液,按“2.1”项下色谱条件,分别于0、2、4、6、8、10 h进行测定,结果苦参配方颗粒中苦参碱和氧化苦参碱峰面积的RSD分别为0.42%和0.86%,表明样品在10 h内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号:8055571,苦参碱:8.0 mg/g,氧化苦参碱:26.4 mg/g)适量,研细,取约0.1 g,平行6份,精密称定,分别加入苦参碱对照品0.7 mg、氧化苦参碱2.3 mg,制备供试品溶液。结果表明:苦参碱回收率在98%~103%之间,RSD为1.52%。氧化苦参碱回收率在99%~103%之间,RSD为1.17%。

2.9 样品测定 取3批苦参配方颗粒,按“2.3.7”供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件测定,结果见表8,色谱图见图2。根据样品测定结果,苦参配方颗粒中苦参碱和氧化苦参碱的总量均大于3.0%。

表8 苦参配方颗粒测定结果(n=3)

批号	苦参碱峰面积	氧化苦参碱峰面积	苦参碱与氧化苦参碱的总量(%)
7081391	75645	267240	3.38
8016391	83418	264883	3.52
8055571	83712	262084	3.43

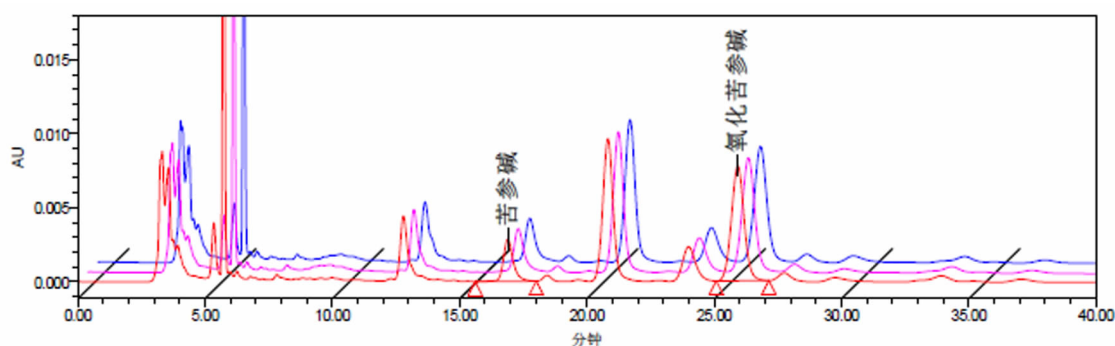


图2 不同批次的苦参配方颗粒的 HPLC 图谱

3 讨论

本文通过对 HPLC 样品前处理的 6 个参数(提取溶剂用量、提取方式、回流温度、浓氨试液浸泡时间、过中性氧化铝柱滴速与不过中性氧化铝柱因素)进行考察探索,确定了 HPLC 对苦参配方颗粒中苦参碱和氧化苦参碱含量测定最优的样品前处理操作方法,结果表明该方法样品中苦参碱、氧化苦参碱提取完全。

通过实验数据分析可知,对苦参配方颗粒中苦参碱及氧化苦参碱总量进行测定时,在样品前处理过程中,须控制浓氨浸泡的时间、采用加热回流提取、可以不采用过中性氧化铝柱步骤,如采用过中性氧化铝柱步骤须控制滴速。通过细化操作,可有效减少系统误差,保证提取效果的稳定

性,保证检测方法的准确性。本实验研究建立的方法,操作简便,准确性高,可作为苦参配方颗粒质量控制方法。

参考文献

- [1] 穆甲骏,王卫国,侯启昌. 苦参生理活性物质研究现状与展望[J]. 河南师范大学学报,2014,42(6):131-135.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:202-203.
- [3] 王丽聪,李松. HPLC 测定苦参配方颗粒中苦参碱与氧化苦参碱含量[J]. 盐城工学院学报,2013,26(1):48-51.
- [4] 王丽聪,李松. 苦参配方颗粒质量控制研究[J]. 现代药物与临床,2012,27(5):471-473.

(收稿日期:2019-12-17)

(上接第 154 页)增加细胞中 NF- κ B p65、SREBP1c mRNA 和蛋白的表达水平,降低 ABCA1 mRNA 和蛋白的表达水平,右归丸含药血清干预后,NF- κ B p65、SREBP1c mRNA 和蛋白的表达明显降低($P < 0.05$),ABCA1 mRNA 和蛋白的表达水平升高。研究表明,促进 NF- κ B 活性,可增加 SREBP1c mRNA 表达,减少 ABCA1 mRNA 表达,增加胆固醇在细胞内的聚集,导致泡沫细胞的堆积;同时刺激炎症因子的释放可加剧 AS 的发生发展。有效抑制 NF- κ B 和 SREBP1c 基因表达后,细胞内中胆固醇含量较对照组显著降低,可能是一条潜在的降低胆固醇水平的有效途径。

中医学认为,肾的气化功能失常最终导致津液的产生及输布功能失常而出现痰瘀互结^[9],右归丸通过温补肾阳,可激发肾主气化的功能,通过激发精血津液化生为气或能量,来达到促进“有形化无形”的气化过程^[10],促进瘀血与痰湿的有效分解来改善血中脂代谢的状态,从而起到降脂的作用。我们推测右归丸可能是通过抑制 NF- κ B 和 SREBP1c 基因表达,进而起到调节血脂的功能,同时通过抑制炎症因子的释放来防治 AS,这为临床预防和治疗 AS 提供了新的靶点。

参考文献

- [1] 李显东,陈平英,谢华强,等. 泡沫细胞 DNA 甲基化及其对脂代谢基因 SREBP1 表达的影响[J]. 山东医药,2018,58(24):22-25.

- [2] 于红红,俞琦,蔡琨,等. 泻心汤含药血清对 RAW264.7 源性泡沫细胞 TLR9/MyD88/NF- κ Bp65 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(18):24-29.
- [3] 谭玉林,唐艳艳,张敏,等. ABCA1 介导胆固醇外流及抗炎的信号通路研究进展[J]. 生理科学进展,2015,46(1):52-56.
- [4] CHEN J, YUE J, LIU J, et al. Salvianolic acids improve liver lipid Metabolism in ovariectomized rats via blocking STAT-3/SREBP1 signaling[J]. Chin J Nat Med,2018,16(11):838-845.
- [5] HOVLAND A, JONASSON L, GARRED P, et al. The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis[J]. Atherosclerosis,2015,241(2):480-494.
- [6] 赵敏,徐安莉,陈会敏,等. LXR α 靶基因对肾虚实验大鼠血脂中胆固醇的调控机制研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(5):1264-1267.
- [7] WESTERTEP M, BOCHEM AE, YVAN-CHARVET L, et al. ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation[J]. Circ Res,2014,114(1):157-170.
- [8] HU J, XI D, ZHAO J, et al. Crosstalk between high-density lipoprotein and inflammation and its significance to atherosclerosis[J]. Am J Med Sci,2016,352(4):408-415.
- [9] 吴元洁,王正,王玉凤,等. “痰浊”与高脂血症相关性初探[J]. 中医临床杂志,2004,16(3):201-203.
- [10] 皮持衡,王茂泓,贺支支. 肾主气化的概念及其临床应用[J]. 中医药学刊,2002,20(5):502-503.

(收稿日期:2020-01-12)