

HPLC 法测定黄丹兰颗粒剂中苦参碱和氧化苦参碱含量

陈 妍^{1,2}, 邢正英¹, 李继彬¹, 李 晗¹, 房志仲¹

(1.天津医科大学药学院药剂学教研室,天津市临床药物关键技术重点实验室,天津 300070;2.天津海滨人民医院药剂科,天津 300280)

摘要 目的:建立高效液相色谱(HPLC)法测定黄丹兰颗粒剂中苦参碱和氧化苦参碱含量的方法。方法:采用 HPLC 法以苦参碱、氧化苦参碱标准品为对照品,黄丹兰颗粒剂为样品,使用 TIANHE® Kromasil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,流动相为磷酸盐缓冲液(pH=3.0)-甲醇(93:7),流速为 0.8 mL/min,柱温为 35 ℃,检测波长为 220 nm,进样量为 20 μL。结果:苦参碱回归方程为 $Y=40\,074.09X-14.73$,其进样浓度在 2.5~25 μg/mL 范围内呈良好线性关系($r=0.999\,9$, $n=3$),平均加样回收率为 99.99%, $RSD=0.057\,7\%$ ($n=6$);氧化苦参碱回归方程为 $Y=53\,380.27X+46.35$,其进样浓度在 2.0~20.0 μg/mL 范围内呈线性关系($r=0.999\,9$, $n=3$),平均加样回收率为 99.78%, $RSD=0.443\,2\%$ ($n=6$)。苦参碱和氧化苦参碱平均含量分别为 0.505 6 mg/g 和 0.306 7 mg/g, RSD 分别为 0.298 7%和 0.154 2%。结论:HPLC 方法分离效果好、专属性强、简便、灵敏和准确,可作为黄丹兰颗粒剂中苦参碱和氧化苦参碱含量的测定方法。

关键词 黄丹兰颗粒剂;苦参碱;氧化苦参碱;高效液相色谱法

中图分类号 R927.2

文献标志码 A

黄丹兰颗粒剂是由苦参、黄芪、丹参、三七总苷、螺旋藻、绞股兰总皂甙和蝙蝠蛾孢菌丝体粉等组成,具有调节免疫功能,逆转纤维化进程,溶解纤维斑块的功效。苦参中主要活性成分为苦参碱和氧化苦参碱。近年来研究发现,其具有抗炎、抗菌、抗病毒、抑制免疫、抗纤维化、抗肿瘤等生物学作用^[1-3]。在动物实验中,对肝纤维化、肺纤维化及溶解纤维斑块等具有很好的治疗效果。中药苦参是黄丹兰颗粒剂处方中的主药,为了有效控制产品的质量,参考相关文献^[4-9]采用HPLC法测定了该颗粒剂中苦参碱和氧化苦参碱的含量,建立该制剂的质量控制标准,为申报医院制剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 仪器 美国高效液相色谱仪(Spectra-physics),输液泵(SP8810 precision isocratic, BIO-RAD),检测器(Spectra 100 variable wavelength detector),Anastar 色谱工作站,TIANHE® Kromasil C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm),KQ-100B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),ALC-210.4 电子分析天平(ACCULAB Sartorius group, 北京赛多利斯仪器系统有限公司),pH 计(雷磁 pHs-25 型,上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 苦参碱对照品(中国药品生物制

品检定所,批号为 110805-200306,供含量测定用)和氧化苦参碱对照品(中国药品生物物质品检定所,批号为 110780-200506,供含量测定用);黄丹兰颗粒剂(本室自制 3 批,批号:141014、141018 和 141022);甲醇(天津市康科德科技有限公司,色谱纯);乙腈(天津市康科德科技有限公司,色谱纯);其它试剂均为市售分析纯;重蒸水(自制)。

1.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:TIANHE® Kromasil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为磷酸盐缓冲液(磷酸调节 pH=3.0)-甲醇(93:7);流速为 0.8 mL/min;检测波长为 220 nm;柱温为 35 ℃;进样量 20 μL。

1.4 样品溶液的制备

1.4.1 对照品溶液的制备 精密称取苦参碱对照品 12.5 mg、氧化苦参碱对照品 10 mg,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,密塞。精密量取上述溶液各 10 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,密塞,制备成 50 μg/mL 的苦参碱对照品储备液和 40 μg/mL 的氧化苦参碱对照品储备液,备用。

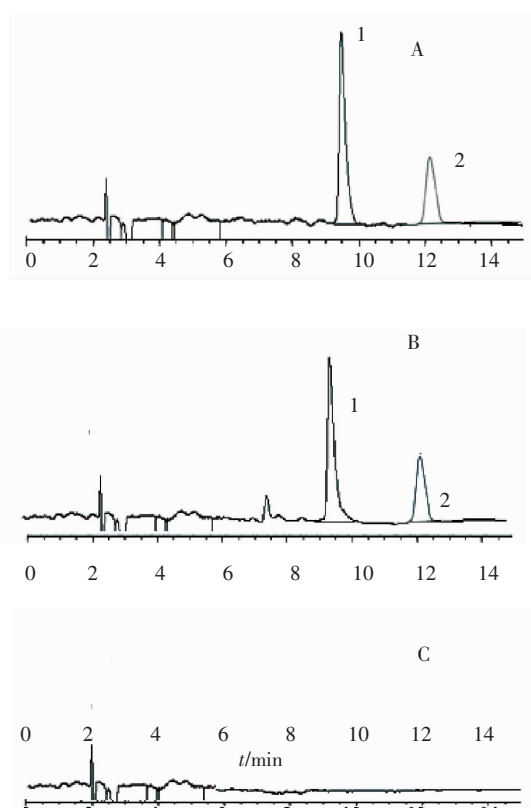
1.4.2 供试品溶液的制备 取黄丹兰颗粒剂至乳钵中研细,取粉末 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入浓氨水 1 mL,CHCl₃ 50 mL,密塞,摇匀,精密称定质量,放置 4 h,随时振摇,超声提取 20 min,再精密称定质量,用 CHCl₃ 补足其减失的质量,摇匀,

滤过,精密量取续滤液 25 mL,回收溶剂至干,立即取下,残渣加甲醇 1 mL 使其溶解,定量转移至 10 mL 量瓶中,加磷酸盐缓冲液至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.4.3 阴性样品对照液的制备 按处方比例,取除苦参外的其余药味,按工艺要求制成不含苦参的阴性样品,再按“1.4.2 项下”中的方法制成阴性样品对照液。

2 结果

2.1 专属性试验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品对照液各 20 μ L,按照“1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。苦参碱和氧化苦参碱对照品的保留时间分别为 9.7 和 12.3 min 左右,供试品色谱行为与苦参碱和氧化苦参碱对照品色谱峰相应的位置上有相应的色谱峰,阴性对照测定结果无干扰,色谱见图 1。



A.对照品;B.供试品;C.阴性;1.苦参碱;2.氧化苦参碱

图1 黄丹兰颗粒剂中苦参碱和氧化苦参碱色谱

2.2 线性关系考察

2.2.1 苦参碱 精密量取苦参碱对照品储备液,配制成 2.5、5、10、15、20 和 25 μ g/mL 系列对照品溶液。精密量取上述标准溶液 20 μ L 注入液相色谱仪测定,记录色谱图。以峰面积(Y)对苦参碱浓度(X)进行线性回归,得回归方程 $Y=40\,074.09X-14.73$

($r=0.999\,9, n=3$),结果表明:苦参碱进样量在 2.5~25 μ g/mL 范围内,呈良好线性关系。

2.2.2 氧化苦参碱 精密量取氧化苦参碱对照品储备液,配制成 2.0、4.0、8.0、10.0、15 和 20 μ g/mL 系列对照品溶液。精密量取上述标准溶液 20 μ L 注入液相色谱仪测定,记录色谱图。以峰面积(Y)对苦参碱浓度(X)进行线性回归,得回归方程 $Y=53\,380.27X+46\,035$ ($r=0.999\,9, n=3$),结果表明:氧化苦参碱进样量在 2.0~20.0 μ g/mL 范围内,呈线性关系。

2.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20 μ L,在 0、2、4、6、8 及 12 h 测定苦参碱和氧化苦参碱峰面积值,结果苦参碱的 RSD 为 1.510 5%,氧化苦参碱 RSD 为 0.991 3% ($n=6$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4 精密度试验 精密吸取供试品溶液 20 μ L,按上述色谱条件,连续测定 6 次,结果其中苦参碱 RSD 为 1.050 7%,氧化苦参碱 RSD 为 0.227 5% ($n=6$),表明仪器的精密度良好。

2.5 重复性试验 按“1.4.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,分别取 20 μ L 进样测定,结果苦参碱和氧化苦参碱的含量分别为 0.504 2、0.306 9 mg/g, RSD 分别为 0.217 8%、0.703 8% ($n=6$),表明本法的重复性良好。

2.6 回收率试验

2.6.1 苦参碱 精密称取已知含量的样品,精密加入不同量的苦参碱对照品,按供试品溶液的制备方法制得待测液,测定含量,平均回收率为 99.99%, RSD 为 0.057 7%,见表 1。

表1 苦参碱回收率试验结果

样品中含量/ mg	加入量/ mg	测定量/ mg	检出量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
0.504 2	0.401 28	0.905 5	0.674 7	100.00		
0.504 2	0.401 28	0.905 1	0.691 3	99.91		
0.504 2	0.401 28	0.905 8	0.681 8	100.08		
0.504 2	0.501 6	1.006 1	0.992 1	100.06		
0.504 2	0.501 6	1.005 6	1.017 7	99.96	99.99	0.057 7
0.504 2	0.501 6	1.005 4	0.995 7	99.92		
0.504 2	0.601 92	1.106 2	1.293 9	100.01		
0.504 2	0.601 92	1.105 9	1.303	99.96		
0.504 2	0.601 92	1.106 0	1.284 6	99.98		

2.6.2 氧化苦参碱 精密称取已知含量的样品,精密加入不同量的氧化苦参碱对照品,按供试品溶液的制备方法制得待测液,测定含量,平均回收率为 99.78%, RSD 为 0.443 2%,见表 2。

表 2 氧化苦参碱回收率试验结果

样品中含量/ mg	加入量/ mg	测定量/ mg	检出量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
0.306 9	0.333 44	0.639 9	0.674 7	99.87		
0.306 9	0.333 44	0.640 8	0.691 3	100.14		
0.306 9	0.333 44	0.641 2	0.681 8	100.26		
0.306 9	0.416 8	0.720 2	0.992 1	99.16		
0.306 9	0.416 8	0.720 8	1.017 7	99.30	99.78	0.443 2
0.306 9	0.416 8	0.720 3	0.995 7	99.18		
0.306 9	0.500 16	0.807 1	1.293 9	100.00		
0.306 9	0.500 16	0.806 9	1.303 0	99.97		
0.306 9	0.500 16	0.807 8	1.303 1	100.15		

2.7 样品测定 按上述色谱条件和含量测定方法,精密测定 3 批样品,记录峰面积,计算含量。苦参碱平均含量为 0.505 6 mg/g, 氧化苦参碱平均含量 0.306 7 mg/g, 见表 3。

表 3 样品含量测定结果

批号	苦参碱 含量/(mg/g)	苦参碱平 均含量/ (mg/g)	RSD/%	氧化苦参 碱含量/ (mg/g)	氧化苦参 碱平均 含量/(mg/g)	RSD/%
141014	0.504 2			0.306 9		
141018	0.505 4	0.505 6	0.298 7	0.307 1	0.306 7	0.154 2
141022	0.507 2			0.306 2		

3 讨论

3.1 流动相的选择 分别考察 3 种不同比例的流动相:(1)乙腈-0.1% KH_2PO_4 溶液;(2)乙腈-水(含 KH_2PO_4 和庚烷磺酸钠);(3)磷酸盐缓冲液($\text{pH}=3.0$)-甲醇(93:7)。结果表明:使用流动相为磷酸盐缓冲液($\text{pH}=3.0$)-甲醇(93:7),流速为 0.8 mL/min,柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 时,色谱峰对称,基线平稳,分离效果最好。

3.2 供试品提取纯化条件的选择 根据苦参碱和氧化苦参碱的溶解性能,并参考有关文献^[4-9]的提取纯化方法,最终选取如下方法:取黄丹兰颗粒剂至乳钵中研细,置具塞锥形瓶中,加入浓氨水使样品充分润湿,加入 CHCl_3 , 密塞,摇匀,放置 4 h,随时振

摇,超声提取 20 min,滤过。超声的方法比回流法更为简便。

3.3 薄层层析试验 薄层色谱(TLC)分析在药物制剂等快速检测中具有独特的优势,简便易行,可以作为定量分析初始依据。在建立 HPLC 定量分析中,同时利用“1.4 项下”的样品溶液进行了 TLC 试验,硅胶 G 加 2% NaOH 溶液的自制板,展开剂为氯仿:甲醇:浓氨溶液(5:0.6:0.3),上行展开 8 cm,显色剂为依次喷以稀碘化铋钾试液和亚硝酸钠试液,日光下苦参碱和氧化苦参碱显红棕色斑点,阴性对照液无干扰^[8-11],结果显示 TLC 分析可以作为该制剂的定性分析方法。

参考文献:

- [1] 张知贵,杨华. 苦参素对免疫性肝纤维化大鼠肝脏组织 MMP-1, TIMP-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 236
- [2] 袁建,杨宇. 基质金属蛋白酶-1、基质金属蛋白酶抑制剂-1 与肝纤维化的中医治疗[J]. 井冈山大学学报:自然科学版, 2010, 31(5): 106
- [3] 李大寿. 苦参碱治疗慢性乙型肝炎肝纤维化 45 例临床观察[J]. 中国民康医学, 2011, 23(21): 2701
- [4] 肖琦,阳文武,李柏群,等. 高效液相色谱法测定足光散中苦参碱含量[J]. 中国药业, 2015, 24(17): 55
- [5] 刘莹,孟庆妍,翟宏宇. HPLC 法同时测定复方苦参肠炎康片中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(5): 842
- [6] 叶秀金,宋粉云. HPLC 法测定清肺抑火丸中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(12): 1127
- [7] 张成颖,弥宏,赵宏峰,等. HPLC 测定前列康泰胶囊中的苦参碱与氧化苦参碱[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(4): 476
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 1027
- [9] 肖琦,阳文武,李柏群,等. 高效液相色谱法测定足光散中苦参碱含量[J]. 中国药业, 2015, 24(17): 55
- [10] 伍小燕,唐爱存,谢臻,等. 抑霉洗剂质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 88
- [11] 祁海宏,郭瑾丽,屈鹏舒,等. 薄层色谱扫描法测定治带片中苦参碱含量[J]. 中国药业, 2008, 17(3): 15

(2016-02-02 收稿)