

HPLC 法同时测定哈医祛风膏中去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱的含量及疗效观察

古丽娜尔·叶尔森那力¹ 木拉提·克扎衣别克^{1,2,3} 江阿古丽·艾山³

江安努尔·这依肯³ 地达尔·巴合提坚^{2,3}

(1 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐, 830011; 2 伊犁哈萨克自治州哈萨克医药研究所, 伊宁, 835000;

3 伊犁哈萨克自治州中医医院, 伊宁, 835000)

摘要 目的:建立高效液相色谱法(HPLC)测定哈医祛风膏中去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱的含量及临床疗效观察。方法:采用高效液相色谱法测定含量,色谱柱为 Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),以甲醇:0.01 mol/L 硫酸铵溶液(37:63,用三乙胺调 pH 至 4.0)为流动相,流速为 1 mL/min,柱温:25 ℃,检测波长在 320 nm。用完全随机法分实验组和对照组进行比较哈医祛风膏疗效。结果:去氢骆驼蓬碱的线性范围为 12~83 μg(r=0.999 8,n=6)平均回收率为 100.14%,RSD 值为 1.33%、骆驼蓬碱的线性范围为 12~83 μg(r=0.999 8,n=6)平均回收率为 98.89%,RSD 值为 1.77%。疗效比较治疗组的总有效率为 97.3%、对照组的总有效率为 90.1%,2 组有显著性差异,P<0.01。表明治疗组总体疗效明显优于对照组。结论:高效液相色谱法方法简便,准确,可靠,可以用于哈医祛风膏中去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱的含量测定。并哈医祛风膏治疗颈肩腰腿痛的效果较好、疗效确切、安全性良好,可降低患者复发率,可考虑在临床上推广。

关键词 哈医祛风膏;去氢骆驼蓬碱;骆驼蓬碱;高效液相色谱法;疗效。

Study of the Content and Effect of Harmine and Harmaline in Haiyi Wind-dispelling Ointment by HPLC Method

GulnarYersennale¹, MuratKizaipek^{1, 2, 3}, JangagulAsen³, JanganuerJeken³, DidarBahytjan^{2,3}

(1 College of pharmacy. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2 Traditional Kazakh Medicine Research

Institute of Ili Kazakh Autonomous Prefecture, Yining 835000, China; 3 Ili Kazak Autonomous prefecture

Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yining 835000, China)

Abstract Objective: To study the content and clinical effect of Harmine and Harmaline in Haiyi wind-dispelling ointment by HPLC method. **Methods:** The sample was separated on Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm). CH₃OH of 0.01 mol · L⁻¹ and (NH₃)₂SO₄(63:37 pH regulated to 4.0 by triethylamine) were used as the mobile phase, with flow rate at 1 mL · min⁻¹, column temperature at 25 ℃, the determining wavelength at 320nm. Complete random method was used to divide control group and experimental group to compare the efficacy of Haiyi wind-dispelling ointment. **Results:** Harmine calibration curve was linear over the range of 12-83 μg(r=0.9998, n=6). The average recovery rate was 100.14%, RSD was 1.33%. Harmaline calibration curve was linear over the range of 12-83 μg(r=0.9998, n=6). The recovery rate was 98.89%, RSD was 1.77%. The total effective rate of treatment group was 97.3%, followed by the control group at 90.1%. There was significant difference between the two groups(P<0.01), which indicates that the overall curative effect of treatment group was obviously better than that of the control group. **Conclusion:** The HPLC method is simple, accurate, and reliable, which can be applied to determine the content of harmine and harmaline in Haiyi wind-dispelling ointment. Haiyi wind-dispelling ointment is effective and safe for the treatment of shoulder, back and leg pain and can reduce the relapse rate of patients, thus can be further promoted in clinical practice.

Key Words Haiyi wind-dispelling ointment; Harmine; Harmaline; HPLC method; Clinical efficacy

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.08.029

哈医祛风膏是伊犁州中医医院哈医骨伤科和哈医药研究所根据祖传药方配制的医院协定处方,该方临床应用已有 20 多年的历史^[1-4]。颈肩腰腿痛多

为慢性劳损及无菌性炎性反应引起的以病患部位疼痛,肿胀甚至功能受限为主的一组疾病^[5-6]。常见病包括:颈椎病,肩周炎,腱鞘炎,腰椎间盘突出

基金项目:新疆自治区科研机构创新发展专项资金(编号:2013002);新疆地产中药民族新药研发项目(编号:XJHPHY-2010-YH)

作者简介:古丽娜尔(1987—),女,哈萨克族,在读研究生

通信作者:木拉提·克扎衣别克(1973—),男,哈萨克族,研究员,医学博士,研究方向:哈萨克药资源调查与新药研发,E-mail:murat_kizaipek@sina.com

出,腰肌劳损,骨质增生等疾病,几千年来,哈萨克医对颈肩腰腿痛的治疗积累了丰富的经验,形成了很多极具特色的有效的治疗方法^[7-8]。我们采用哈萨克医传统制剂—哈医祛风膏治疗颈肩腰腿痛患者293例,结果疗效、安全性良好、质量稳定且不良反应较少。本品主要由骆驼蓬、黄柏、大黄等哈萨克药组成,其中骆驼蓬为主药。骆驼蓬植物全草及种子主要成分已有相关文献^[9-10]报道。在哈萨克族民间常用其全草或种子治疗无名肿痛、风湿痹痛等疾病^[11-12]。骆驼蓬总碱的含量测定方法有多种,本文采用高效液相色谱(HPLC)法^[13]同时测定了哈医祛风膏中的去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱含量^[14-17]。该方法能将2组分完全分离,而且操作简便、结果准确、可靠。

1 HPLC法同时测定哈医祛风膏中去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬的含量

1.1 一般资料

1.1.1 仪器 高效液相仪(日本岛津,LC-20AB泵,SPD-20A检测器,CTO-10ASvp柱温箱,Lcsolution色谱工作站),色谱柱(Agilent TC-C₁₈,4.6 mm×250 mm,5 μm),电子天平(梅特勒,AB135-S)。

1.1.2 试剂 骆驼蓬碱对照品(SIGMA-ALDRICH, Lot#BCBH7580V,101211051),去氢骆驼蓬碱(98%,SIGMA-ALDRICH, Lot#BCBH0770V,101194332),硫酸铵为分析纯(天津市风船化学试剂科技有限公司),甲醇为色谱纯,哈医祛风膏(自制)。

1.2 方法与结果

1.2.1 标准溶液的配制 去氢骆驼蓬碱对照溶液的配制:精密称取去氢骆驼蓬碱对照品10.09 mg,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得。骆驼蓬碱对照溶液的配制:精密称取骆驼蓬碱对照品10.22 mg,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并加至刻度,即得,备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 取哈医祛风膏2 g,置于50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,超声30 min使溶解、过滤、取出,放冷、加甲醇至刻度,摇匀,精密吸取1 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,采用0.45 μm微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

1.2.3 色谱条件的选择

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C₁₈,4.6 mm×250 mm,5 μm。

1.2.3.2 检测波长 去氢骆驼蓬碱的检测波长为320 nm,骆驼蓬碱的检测波长为370 nm,在320 nm处骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱均有吸收,因此检测波

长选择为320 nm。进样量:10 μL,流动相为甲醇:0.01 mol/L硫酸铵溶液(37:63用三乙胺pH调为4.0左右)流速:1 mL/min,柱温:25℃。精密吸取去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱对照溶液各适量,用甲醇稀释成约20 μg/mL的供试液,进样10 μL。HPLC色谱图结果如下图1。

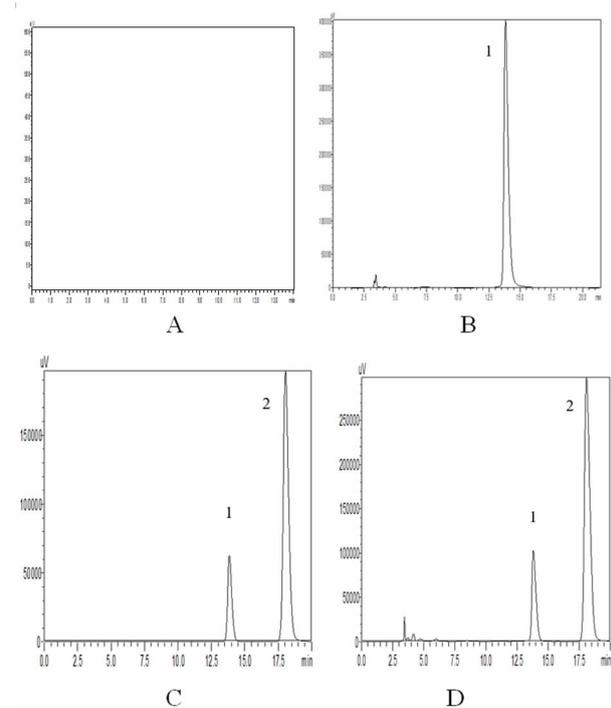


图1 HPLC色谱图结果

注:空白(A);骆驼蓬碱对照品(B);骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱对照品(C);样品(D);去氢骆驼蓬碱(1);骆驼蓬碱(2)

1.2.5 标准曲线的制备 分别精密量取去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱对照溶液各适量置同一容量瓶中,用甲醇稀释成一定浓度的系列溶液,进样10 μL,以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归,绘制标准曲线,得回归方程:骆驼蓬碱 $A = 729225b + 268741$ ($r = 0.9998, n = 6$) 去氢骆驼蓬碱 $A = 724386b + 76373$ ($r = 0.9998, n = 6$)。结果显示去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱分别在12.853~77.18 μg/mL、13.69~82.14 μg/mL范围内具有良好的线性关系。

1.2.6 加样回收率实验 取已制备好含量已知的同批哈医祛风膏(每片2 g),分为3组,按低、中、高浓度各加入去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱对照品储备液。按1.3.2的色谱条件进行测定计量,回收率计算。结果表明去氢骆驼蓬碱的平均回收率为98.89%,RSD为1.03%、骆驼蓬碱的平均回收率为100.14%,RSD为1.38%见表1。

1.2.7 精密度实验 取已制备好的样品按1.3.2色谱条件连续进样5次测峰面积,计算RSD结果去

氢骆驼蓬碱的 RSD 为 0.95%、骆驼蓬碱的 RSD 为 0.51%。

1.2.8 稳定性实验 取已制备好的供试品,分别在 0,3,6,9,12 h 进样,测定峰面积所得的去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱的 RSD 分别为 1.33% 和 1.17%。表明供试品在 12 h 内稳定。

表 1 回收率

成分	序号	含量 μg	加入量 μg	测得量 μg	回收率 %	RSD %
骆驼蓬碱	1	37.32	37.20	75.29	101.05	1.03
	2	37.32	37.20	75.71	101.62	
	3	37.32	37.20	73.78	99.02	
	4	37.32	43.72	88.17	100.85	
	5	37.32	43.72	86.58	99.03	
	6	37.32	43.72	86.57	99.02	
	7	37.32	51.80	103.31	99.72	
	8	37.32	51.80	103.45	99.86	
	9	37.32	51.80	104.70	101.06	
去氢骆驼蓬碱	1	28.60	25.11	53.58	99.78	1.38
	2	28.60	25.11	53.55	99.72	
	3	28.60	25.11	51.19	96.41	
	4	28.60	30.93	62.32	100.75	
	5	28.60	30.93	60.03	97.05	
	6	28.60	30.93	61.19	98.92	
	7	28.60	43.98	72.74	98.86	
	8	28.60	43.98	72.17	99.44	
	9	28.60	43.98	72.91	99.09	

1.2.9 重复性实验 取已制备好的供试品溶液 6 份,按上述方法平行测定 6 次,结果去氢骆驼蓬碱的 RSD 为 1.42%、骆驼蓬碱的 RSD 别为 1.25%,表明重复性良好。

1.2.10 样品测定 取哈医祛风膏三贴(每片 2 g),精密称定,置 50 mL 容量瓶中,其中加入适量甲醇,超声处理 30 min,补充已丢失的甲醇并至刻度,精密吸取 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μL 直径的微孔滤膜过滤,吸取 10 μL 进样,测定哈医祛风膏中去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱的含量,结果去氢骆驼蓬碱的 RSD 为 0.54%、骆驼蓬碱的 RSD 为 1.273%。结果见表 2。

表 2 样品含量测定

样品号	骆驼蓬碱含量 (mg/g)	RSD %	去氢骆驼蓬碱含量 (mg/g)	RSD %
1	5.47	1.27	3.80	0.54
2	5.33		3.77	
3	5.44		3.76	

2 临床疗效观察

2.1 资料与方法

2.1.1 一般资料 选取 2012 年 5 月至 2014 年 5 月

期间在我院骨伤科接受颈肩腰腿痛治疗的 586 例患者,其中男 209 例,女 377 例;年龄 25~75 岁;病程 3 个月至 20 年;颈椎病 60 例,肩周炎 98 例,腱鞘炎 36 例,腰椎间盘突出 110 例,腰肌劳损 24 例,骨质增生 74 例,腰骶关节炎 60 例,膝关节炎 90 例,风湿性关节炎 34 例。将患者按病种区组后随机分成试验组和对照组,各 293 例。2 组患者的年龄、性别、病程等一般临床资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),2 组具有可比性。

2.1.2 方法

2.1.2.1 纳入排除标准 纳入标准:1)患者知情同意;2)所患病种为颈椎病、肩周炎、腱鞘炎、腰椎间盘突出、腰肌劳损、骨质增生、关节炎;3)治疗方案为非手术治疗。排除标准:1)患者不配合、不同意参加试验者;2)患者要求手术治疗者。

2.1.2.2 对照组与治疗组处理方法 对照组:1)入院时宣教,讲解日常自我照护及休养方法;2)对症处理,物理治疗(按摩等),使用西医消炎止痛类药物。治疗组:防对照组使用的治疗方法外,给予哈医祛风膏每日 3 片于患处,持续使用至出院。

2.1.2.3 疗效评定标准 参照国家药品监督管理局 2002 年修订的《中药新药临床研究治疗原则》在患者出院时进行评价,痊愈:症状体征消失,恢复正常生活和工作;显效:症状体征消失,但过多活动局部仍有酸痛感,休息后可自行缓解;好转:症状体征改善,劳作后症状复作需经治疗后方能缓解;无效:症状体征无改善。

2.1.2.4 患者治疗满意度调查 本次满意度调查为简约满意度调查,分为满意、比较满意、不满意 3 项。

2.1.2.5 药物不良反应发生率 本次研究监测治疗组与常规对照组不良反应发生率的差异,主要监测的药物不良反应为:药物性皮炎、药物过敏反应、胃肠道反应、其他与治疗药物有关的异常反应。

2.1.2.6 样本含量估算 本次疗效研究主要为研究 2 组的有效率,为随机对照临床试验,比较方法为两独立样本率的比较,经预实验得到预计有率为 90% 左右,对照组有效率为 85% 左右,使用样本含量估计公式计算得到 $N_1 = N_2 = 268$ 。考虑到可能的失访及不配合等因素,扩大样本量至 290。

2.1.2.7 统计学处理 本次研究采用 SPSS 13.0 统计学软件。计量资料用 t 检验(以 $\bar{x} \pm s$ 表示),计数资料用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表3 2组患者治疗效果的对比

组别	例数	痊愈	显效	好转	无效	总有效率(%)
治疗组	293	63(21.5%)	180(61.4%)	42(14.3%)	8(2.7%)	97.3
对照组	293	32(10.9%)	143(48.8%)	89(30.4%)	29(9.9%)	90.1

2.2 结果 2组患者治疗效果的对比结果见表3。2组总体疗效的总有效率分别为97.3%和90.1%，2组差异有统计学意义， $P < 0.01$ 。表明治疗组总体疗效明显优于对照组。

3 讨论

颈肩腰腿痛是骨伤科门诊常见病、多发病。目前其临床治疗方法主要有牵引、推拿、针灸、拔罐、理疗等，但临床症状及疼痛改善情况不甚理想，病情反复，给患者带来痛苦和负担。我们采用哈萨克医传统制剂哈医祛风膏对颈肩腰腿痛患者进行治疗，经过293例患者的临床观察，与使用物理疗法治疗颈肩腰腿痛患者的效果进行比较，发现哈医祛风膏的治疗效果优于物理疗法。哈医祛风膏可以直接作用于患处，起到止痛，消炎，消肿，活血化瘀的治疗作用，使疼痛、肿胀或畸形等症状直接减轻或逐步消退，达到缓解疼痛，改善血液循环，减少炎症反应渗出，加强血氧供应的功效，此药疗效确切，同时具有良好的安全性，可降低患者复发率，可考虑在临床上推广。

本研究应用高效液相色谱法建立了一种分析方法。研究发现去氢骆驼蓬碱质量浓度为12.853~77.18 $\mu\text{g/mL}$ 范围内。骆驼蓬质量浓度为13.69~82.14 $\mu\text{g/mL}$ 范围内，去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱的质量浓度与色谱峰面积呈现良好的线性关系。供试品溶液连续进样5次的RSD(%)均小于1.0，重现性良好，样品溶液0h与12h后峰面积无明显变化。供试品溶液12h内稳定。上述研究结果说明该方法测定哈医祛风膏含量的重现性好、准确可靠、专属性强、灵敏度高、符合高效液相色谱法对含量测定的要求，有效地分离了骆驼蓬种子中去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱，并能同时测定、方法简单、快速、结果可靠，保证了哈医祛风膏的质量。

参考文献

[1] 贾娜·叶尔肯, 木拉提·克扎衣别克, 叶尔肯·努尔旦别克. 哈萨克医常用矿物药及其用法[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17

(6):25-27.

- [2] 陈阳, 毕肯·阿不德克木, 梅拉·哈万, 等. 哈萨克医学发展问题及对策[J]. 新疆中医药, 2014, 32(3):48-51.
- [3] 阿尔新·达开, 海拉提·哈力毛拉. 解析哈萨克医学骨夹板治疗法中索尔巴赫他的作用原理[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(9):29-30.
- [4] 阿尔新·达开, 加依娜尔·沙林别克. 哈萨克医习用动物药材羊脂的药理作用[J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(11):38-39.
- [5] 谢茂兵, 叶克艳, 陈安琴, 等. 中药塌渍结合中频电刺激治疗颈肩腰腿痛疗效观察[J]. 按摩与康复医学, 2015(1):79-80.
- [6] 张青, 李伟, 张琳静, 等. 活血化瘀中药配合矿物质热敷治疗颈肩腰腿痛962例[J]. 陕西中医, 2014(1):28-29.
- [7] 沙开静. 应用速刺法配合运动针法治疗颈肩腰腿痛的临床疗效[J]. 当代医药论丛, 2014(20):24.
- [8] 李永富. 中老年颈肩腰腿痛采用平衡针灸治疗临床效果分析[J]. 大家健康(下旬版), 2014(3):44.
- [9] 樊峥嵘, 姚新生. 骆驼蓬属(Peganum)植物成分及药理作用[J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(2):44-151.
- [10] 江苏新医学院编. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海人民出版社, 1997:1757-1758.
- [11] 马骥, 王理德. 西北地区骆驼蓬属药用植物种类与分布[J]. 中药材, 1996, 19(7):336-337.
- [12] 王巧明, 杨建瑜, 淮虎银. 骆驼蓬的生态生物学初步研究[J]. 兰州医学院学报, 1998, 24(2):26.
- [13] 王长虹, 刘军, 郑立明, 等. 高效液相色谱法和薄层析法鉴别骆驼蓬与骆驼蒿[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(1):72-74.
- [14] Wen F F, Zheng L M, Li X J, et al. Research on quality standards of herbs of Peganum harmala[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(19):2971-2976.
- [15] 依力扎提·伊明江. 新疆骆驼蓬水肥效应研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2012.
- [16] 温方方. 骆驼蓬草的质量标准研究[D]. 上海:上海中医药大学, 2013.
- [17] Hamsa T P, Kuttan G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma[J]. Chin Med, 2011, 6(1):11.

(2015-03-10 收稿 责任编辑:王明)