

高效液相色谱法测定消银胶囊中苦参碱和牛蒡苷的含量

李清芳¹ 梁艳² 张峰¹ 孙轶梅²

(1 开封市食品药品检验所, 开封, 475000; 2 河南应用技术职业学院, 郑州, 450042)

摘要 目的:探讨高效液相色谱法测定消银胶囊中苦参碱和牛蒡苷的含量,阐释中药合理配伍的科学内涵。方法:精密量取 10 μ L 的样品进样量或对照品溶液,采用 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m 的色谱柱,选择流动相的条件是在乙腈和 0.1% 磷酸 (12:88) 的中以 1 mL/min 的流速开展实验,柱温为 30 $^{\circ}$ C,检测波长为 230 nm,根据高效液相色谱法 (HPLC) 指纹图谱的梯度洗脱程序进行试验,并在 LCsolution 色谱工作站上进行指纹图谱分析消银胶囊中苦参碱和牛蒡苷的含量。结果:通过 HPLC 指纹图谱分析,牛蒡苷和苦参碱对照品分别于供试品溶液的色谱峰保留时间一致,且阴性对照溶液未对其造成干扰影响。牛蒡苷此在 0.14 ~ 3.5 μ g 范围内线性关系良好;苦参碱在 0.1 ~ 2.0 μ g 范围内线性关系良好。牛蒡苷加样回收率试验结果中平均回收率为 99.80%, RSD 为 2.01%;苦参碱加样回收率试验结果中平均回收率为 108.24%, RSD 为 1.97%。不同批次消银胶囊中牛蒡苷和苦参碱的含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),平均每粒消银胶囊中牛蒡苷含量为 0.817 mg,苦参碱为 0.437 mg。结论:高效液相色谱法可用于消银胶囊中苦参碱和牛蒡苷含量测定,进而对该药物进行质量控制。

关键词 高效液相色谱法;消银胶囊;苦参碱;牛蒡苷

Determination of the Content of Matrine and Arctium Lappa in Xiaoyin Capsule by High Performance Liquid Chromatography

Li Qingfang¹, Liang Yan², Zhang Feng¹, Sun Yimei²

(1 Kaifeng Institute of Food and Drug Control, Kaifeng 475000, China; 2 Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC method for determination of the content of matrine and Arctium lappa in Xiaoyin capsule, and to explain the scientific connotation of the rational compatibility of Chinese medicine. **Methods:** The precise amount of 10 μ L sample or standard solution was obtained, using 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m chromatographic column. Mobile phase condition was in acetonitrile and 0.1% phosphoric acid (12:88) in a 1 mL/min flow to carry out the experiment, and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The detection wavelength was 230 nm, according to the high performance liquid phase (HPLC) test fingerprint gradient elution program, and the content of matrine and elimination of arctiin in Xiaoyin capsule fingerprint was analyzed in LCsolution chromatography workstation. **Results:** 1) By HPLC fingerprint analysis, the retention time of the chromatographic peaks in the sample solution was consistent, and the negative control solution did not interfere with it. 2) It had good internal relations in the range of 0.14 ~ 3.5 g, and the internal relations of matrine were good in the range of 0.1-2 g. 3) The average recovery was 99.80%, and RSD was 2.01% in arctiin sample recovery test. The average recovery was 108.24% and RSD was 1.97% in matrine sample recovery test. 4) There was no significant difference between the content of arctiin and matrine in different batches of Xiaoyin capsule ($P > 0.05$). The average content of arctiin in each capsule was 0.817 mg, and matrine was 0.437 mg. **Conclusion:** HPLC can be used to determine the content of matrine and arctiin in Xiaoyin capsule, and then to control the quality of the drug.

Key Words High performance liquid chromatography; Xiaoyin capsule; Matrine; Arctiin

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.04.047

消银胶囊主要由苦参、牛蒡子、牡丹皮、赤芍等 13 味中药材提取研制而成,目前是独家生产品种。其中牛蒡子疏散风热、透疹消肿,苦参清热燥湿、杀

虫止痒和余下药物共奏清热凉血,养血润燥,祛风止痒之效。临床上多运用消银胶囊治疗白癜风中归属于血热风燥和血虚风燥的证型,其临床表现多为皮疹

为基底鲜红色的点滴状,表面覆有较干燥的银白色鳞屑,或薄或厚,若基底淡红色瘙痒较甚等^[14]。按照我国国家药品标准工作提高的要求,本研究制定了HPLC分别测定芍药苷和苦参碱含量的方法,使其与《中国药典》2010版中中药制药标准得到统一和提升,更加有效地控制消银胶囊的质量^[5-7]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱(HPLC)(岛津2010-CHT高效液相色谱仪);小型超声波清洗器(型号:FR10系列,杭州法兰特超声波科技有限公司)。

1.2 试剂 购于中国食品药品检定研究院牛蒡苷对照品(批号:110819-200505)和苦参碱对照品(批号:770805-200508)。

1.3 分析样品 取3个不同生产批次分别编号为001、002、003的消银胶囊(陕西摩美得制药有限公司;国药准字Z20000110);规格:0.3 g。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 精密量取10 μL 的样品进样量或对照品溶液,采用250 mm \times 4.6 mm,5 μm 的色谱柱(Agilent Eclipse C₁₈柱),选择流动相的条件是在乙腈和0.1%磷酸(12:88)的中以1 mL/min的流速开展实验,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为230 nm,根据HPLC指纹图谱的梯度洗脱程序进行试验,并在LCsolution色谱工作站上进行指纹图谱分析。

2.2 对照品溶液制备 精密称取购于中国食品药品检定研究院牛蒡苷对照品和苦参碱对照品置于容量瓶中,甲醇溶解,制成80 μg 的对照品溶液。阴性对照溶液的制备:按照消银胶囊的处方比例制备缺少牛蒡子和苦参的浓缩药液,即为阴性对照溶液。

2.3 供试品溶液制备 取3个不同生产批次分别编号为001、002、003的消银胶囊的内容物,用研磨器研细,精密取1.5 g,置于精准的50 mL容量瓶中,以甲醇定容后加塞密封,采用精密电子天平称定重量,放入500 W的小型超声波清洗器处理30 min,放冷,称重并以甲醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 专属性试验 根据2.3制备的供试品溶液,采用薄层层析的方法对消银胶囊中的苦参碱和牛蒡苷进行专属性试验,结果显示苦参碱和牛蒡苷各自的专属性均良好。

2.5 线性范围试验 根据1.1制备的牛蒡苷和苦参碱对照品溶液,分别精密取0 μL 、2 μL 、6 μL 、8 μL 、10 μL 、16 μL 、20 μL ,分别编号1~7并连续进样,以峰面积为Y轴,5 μL 进样浓度为X轴,绘制标

准曲线,并根据对照品的回归方程计算各有效成分在各自浓度范围内的线性关系。以对照品为横坐标,峰面积的自然对数为纵坐标进行回归,得牛蒡苷回归方程 $\ln Y = 480.77X - 67.535$ ($R^2 = 0.9993$),因此在0.14~3.5 μg 范围内线性关系良好。见图1;得苦参碱回归方程 $\ln Y = 1679X - 60.808$ ($R^2 = 0.9998$),因此在0.1~2.0 μg 范围内线性关系良好^[8-9]。见图2。

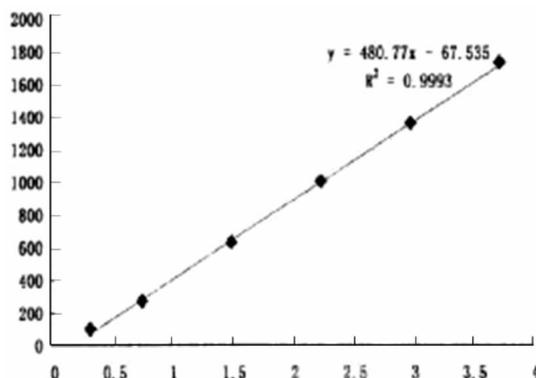


图1 牛蒡苷线性考察结果

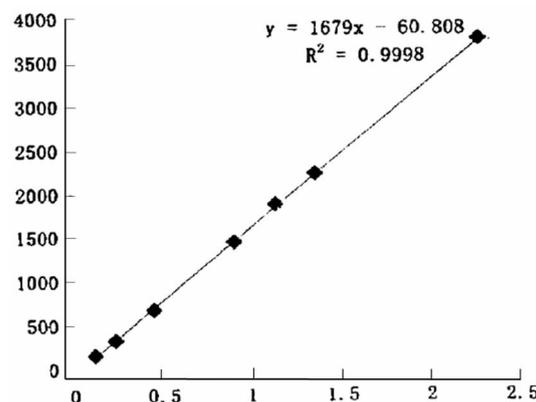


图2 苦参碱线性考察结果

2.6 中间精密度试验 精密吸取10 μL 同一供试品溶液,连续进样5次,结果显示相对标注偏差RSD是0.88%,精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 精密吸取10 μL 同一供试品溶液,配置后分别放置0、2、4、8、16、24、48 h后进样检测,结果显示48 h内供试品溶液基本稳定,RSD 0.97%。

2.8 重复性试验 精密吸取10 μL 同一供试品溶液,在相同色谱条件,相同液相分析仪上检测5次,结果显示标准偏差RSD为0.90%,重复性良好。

2.9 回收率试验 取6份同一批次供试品溶液,根据1.1制备的供试品溶液,编号A-F并分别加入2 mL牛蒡苷和苦参对照品溶液,计算供试品在HPLC中的加样回收率。牛蒡苷加样回收率试验结果中平均回收率为99.80%,RSD为2.01%。见表1;苦参

碱加样回收率试验结果中平均回收率为 108.24%，RSD 为 1.97%。见表 2；显示牛蒡苷和苦参碱加样回收率试验良好，HPLC 严谨性高^[10-11]。

表 1 牛蒡苷加样回收率试验结果

编号	取样量 (g)	样品含量 (mg)	测得量 (g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
A	0.804 6	2.189	2.359	99.29		
B	0.740 5	2.015	2.376	101.33		
C	0.758 3	2.063	2.408	99.57	99.80	2.01
D	0.769 7	2.096	2.400	99.42		
E	0.753 4	2.094	2.431	100.09		
F	0.740 1	2.092	2.430	101.81		

表 2 苦参碱加样回收率试验结果

编号	取样量 (g)	样品含量 (mg)	测得量 (g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
A	0.798 9	1.142 4	2.407 6	110.29		
B	0.777 0	1.110 5	2.353 9	108.12		
C	0.786 8	1.125 0	2.364 1	107.77	108.24	1.97
D	0.775 2	1.117 2	2.338 5	105.64		
E	0.785 4	1.123 0	2.340 4	110.69		
F	0.755 1	1.098 7	2.352 0	108.21		

2.10 样品测定结果

2.10.1 消银胶囊 HPLC 指纹图谱 由图 3、4 得，通过 HPLC 指纹图谱分析，牛蒡苷和苦参碱对照品分别于供试品溶液的色谱峰保留时间一致，且阴性对照溶液未对其造成干扰影响。

2.10.2 牛蒡苷和苦参碱含量测定 不同批次消银胶囊中牛蒡苷和苦参碱的含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，每粒消银胶囊中牛蒡苷平均含量为 0.817 mg，苦参碱为 0.437 mg。见表 3。

表 3 消银胶囊中牛蒡苷和苦参碱含量

批次	牛蒡苷含量 (mg/粒)	苦参碱含量 (mg/粒)
001	0.825	0.432
002	0.819	0.441
003	0.808	0.439
平均值	0.817	0.437

3 讨论

3.1 流动相的选择 本研究结合前期工作，根据本团队所查阅的资料^[12-16]，分别用甲醇-水(47:53)系统、乙腈-0.1%磷酸(12:88)系统，研究结果显示甲醇-水系统和乙腈-0.1%磷酸系统均可以有效分离苦参碱和牛蒡苷，但是甲醇系统中容易产生特异倒峰干扰操作等导致基线噪声较高，故最终选择乙腈-0.1%磷酸，并采用三乙胺调节 PH 至 8.0 作为流动相。为了进一步降低基线噪声，获得最好的共有峰形，本研究对磷酸水的浓度进行了考察，分别用

0.1%、0.2%、0.3% 的磷酸水溶液进行比较，发现乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相的分离效果最好，能够分离出最低基线噪声且峰形最好。

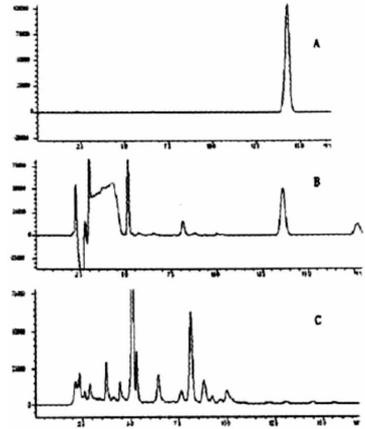


图 3 牛蒡苷高效液相指纹图谱

注：A. 牛蒡苷对照品溶液，B. 消银胶囊供试品溶液，C. 阴性对照溶液

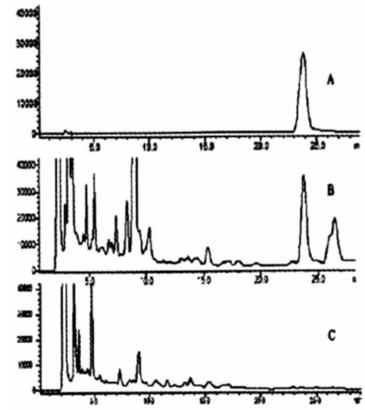


图 4 苦参碱高效液相指纹图谱

注：A. 苦参碱对照品溶液，B. 消银胶囊供试品溶液，C. 阴性对照溶液

3.2 HPLC 严谨性考察意义 线性考查在某一个浓度或峰高(面积)情况下进行样品分析是否是准确的，而准确的概念就是要成线性，换句话说，在这个范围内，待测样品面积要与浓度成正比，即符合紫外检测器的朗伯比尔定律，因为只有这样，在这个范围内浓度与面积成正比，分析结果才是准确的。而加样回收率包括绝对回收率和相对回收率，本研究涉及的是相对回收率；相对回收率严格来说有 2 种，一种是回收试验法，一种是加样回收试验法^[17-18]。而本研究的目的是为了考察 HPLC 的严谨性，因此选用加样回收试验法，也就是是在已知浓度样品中加入药物，来和标准曲线比，标准曲线也是在基质中加药物^[10]。

参考文献

[1] 顾敏婕, 李燕娜, 李咏梅, 等. 消银胶囊治疗寻常型银屑病 120 例

- [J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(9): 571-572.
- [2] 刘健, 刘莉. 消银胶囊治疗玫瑰糠疹疗效观察[J]. 陕西中医, 2011, 32(8): 1026-1027.
- [3] 乔爱莲. 窄谱中波紫外线照射联合复方甘草酸苷消银胶囊治疗寻常型银屑病疗效观察[J]. 当代医学, 2012, 18(16): 92-93.
- [4] 张晓宁. 消银胶囊治疗寻常型银屑病 76 例[J]. 陕西中医学院学报, 2013, 36(6): 69-70.
- [5] 段秀俊, 裴妙荣, 范书龙. HPLC 法测定双参消银胶囊中芍药苷含量[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(3): 173-174, 178.
- [6] 宁艳洁, 孙虹, 张贵华, 等. 消银胶囊水提工艺研究[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 20(11): 62-63.
- [7] 赵晓霞, 高辉, 于佳, 等. 消银胶囊质量标准的研究[J]. 黑龙江中医药, 2014, 43(6): 62-64.
- [8] 邵晶, 郭玫, 余晓晖, 等. 甘肃牛蒡不同部位总木脂素及牛蒡苷的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(6): 506-508.
- [9] 田娟, 王智民, 王维皓. HPLC 测定苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 23-24.
- [10] 郭安. 苦参碱和氧化苦参碱提取纯化工艺研究[J]. 西南林学院学报, 2006, 26(2): 37-39.
- [11] 康凯, 窦德强, 康廷国, 等. 牛蒡不同部位、牛蒡子不同产地中牛蒡苷和牛蒡苷元含量比较及指纹图谱分析[J]. 中国现代中药, 2009, 11(4): 23-26, 37.
- [12] 李明松, 许青. 高效液相色谱法测定苦参中苦参碱的含量[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(5): 19-20.
- [13] 魏红, 李春兰, 刘梅. 透皮吸收制剂中苦参碱稳定性的胶束 HPLC 研究[J]. 药物分析杂志, 2006, 18(9): 1317-1319.
- [14] 陈黎, 周晓萌, 张秀华, 等. 不同牛蒡子中牛蒡苷的鉴别及含量考察[J]. 中国药师, 2011, 14(1): 63-65.
- [15] 杨亮蕊, 胡建勇, 杞伶俐, 等. 高效液相色谱法测定牛蒡子中牛蒡苷和牛蒡苷元的含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(S1): 53-54.
- [16] 朱汀滢, 丛海建, 赵婷, 等. 牛蒡子中牛蒡苷测定方法的优化[J]. 中成药, 2016, 38(4): 846-850.
- [17] 段秀俊, 裴妙荣, 范书龙. HPLC 法测定双参消银胶囊中芍药苷含量[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(3): 173-174, 178.
- [18] 赵晓霞, 高辉, 于佳, 等. 消银胶囊质量标准的研究[J]. 黑龙江中医药, 2014, 43(6): 62-64.

(2017-06-28 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

(上接第 983 页)

- [5] Pacheco-Pinedo, EC, Durham, AC, Stewart, KM, Wnt/ β -catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium [J]. J Clin Invest, 2011, 121(5): 1935-1945.
- [6] Liang Y, Liu M, Wang P, et al. Analysis of 20 genes at chromosome band 12q13: RACGAP1 and MCERS1 overexpression in nonsmall-cell lung cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2013, 52(3): 305-315.
- [7] Lee JS1, Hur MW, Lee SK, et al. A novel sLRP6E1E2 inhibits canonical Wnt signaling, epithelial-to-mesenchymal transition, and induces mitochondria-dependent apoptosis in lung cancer [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36520.
- [8] Nakashima, N, Liu, D, Huang, CL, et al. Wnt3 gene expression promotes tumor progression in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012, 76(2): 228-234.
- [9] 曾凡军, 周媛媛, 宋新宇, 等. β -连环蛋白与抑癌基因 ING1 蛋白在肺癌组织中的表达[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(2): 110-112, 封 3.
- [10] Han, A, Song, Z, Tong, C, et al. Sulindac suppresses beta-catenin expression in human cancer cells [J]. Eur J Pharmacol. 2008, 583(1): 26-31.
- [11] 杨静, 官成浓. GSK-3 β 对肿瘤细胞的双重调节[J]. 中国医疗前沿, 2013, 8(6): 14-15.
- [12] 陶丽, 盛晓波, 刘玉萍, 等. GSK-3 β 活性调节与肿瘤治疗[J]. 中国药理学通报, 2014(6): 741-743, 744.
- [13] 王革平, 陈莉. 非小细胞肺癌中 PGSK-3 β 、CEA、C-myc 表达与临床病理因素的相关性研究[J]. 华西医学, 2009, 24(9): 2320-2323.
- [14] 曾静, 邱志新, 刘丹, 等. pGSK-3 β 表达与非小细胞肺癌预后关系分析[J]. 中华肺部疾病杂志(连续型电子期刊), 2011, 4(6): 462-466.
- [15] 郭扬, 曲国蕃. GSK3 β 在恶性肿瘤中的作用及研究现状[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(22): 4390-4392.
- [16] Nakashima T, Liu D, Nakano J, et al. Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. Oncol Rep, 2008, 19(1): 203-209.
- [17] 赖习华, 王茂生, 陈小萍, 等. C-myc 与 PCNA 在肺癌组织中的表达及其意义[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(8): 1583-1585.
- [18] 王革平, 陈莉. 非小细胞肺癌中 PGSK-3 β 、C-myc 表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(11): 2224-2226.

(2018-01-01 收稿 责任编辑: 杨觉雄)