

· 研究报告 ·

高效液相色谱法测定乐肤口服液中苦参碱的含量

吴相雷^{1,2}, 岳明², 黄皓², 陆文铨¹, 朴淑娟¹, 张凤¹ (1. 上海长征医院药学部, 上海 200003; 2. 宜春学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的 建立 HPLC 法测定乐肤口服液中苦参碱含量的方法。方法 色谱柱为 Diamonsil Platisil NH₂ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-异丙醇-3% 磷酸水溶液 (84 : 4 : 12); 流速为 1.2 ml/min; 进样量 5 μl; 检测波长 205 nm。结果 苦参碱在 54.50~872.00 μg/ml 浓度范围内线性关系良好, $r=0.999 1$; 平均回收率为 99.82%, RSD=1.12%。结论 该法简便、稳定可靠、重复性好, 为控制乐肤口服液的质量标准提供了可借鉴的依据。

[关键词] 高效液相色谱法; 苦参碱; 乐肤口服液

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)05-0443-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.05.016

Determination of matrine in Lefu oral liquid by HPLC

WU Xianglei^{1,2}, YUE Ming², HUANG Hao², LU Wenquan¹, PIAO Shujuan¹, ZHANG Feng¹ (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a high performance liquid chromatography method for the determination of matrine in Lefu oral liquid. **Methods** The HPLC method was performed on a Diamonsil Platisil NH₂ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-isopropyl alcohol-3% phosphoric acid solution (84 : 4 : 12). The flow rate was 1.2 ml/min. The sample injection volume was 5 μl. The detective wavelength was 205 nm. **Results** The calibration curve of matrine showed good linear response ranged from 54.50 to 872.00 μg/ml with $r=0.999 1$. The average recovery of spiked samples for matrine was 99.82% while the relative standard deviation for repetitions was 1.12%. **Conclusion** The method was simple, reliable and repeatable, which could be used for the quantitative determination of matrine of Lefu oral liquid.

[Key words] HPLC; matrine; Lefu oral liquid

医院制剂在传承特色制剂, 发挥社会效益和经济效益, 促进科研方面有着重要作用。军队医疗机构制剂是军队医疗机构根据本单位临床需要, 经审核批准而配制自用的固定处方制剂^[1]。军队医疗机构制剂具有反应快、调度快、适应性强等特点, 能够在应急情况下满足军事战争和应对突变的药品需求, 加强军队医疗机构制剂质量的监测是保证军民用药安全有效的前提^[2,3]。乐肤口服液是我院制剂, 由苦参、白鲜皮、黄芪等 8 味中药组成, 具有苦寒清热、燥湿止痒、理气行滞的功效。主要用于急性和慢性湿疹、接触性皮炎、脂溢性皮炎、痤疮等。乐肤

口服液临床效果好, 应用广泛, 目前采用薄层色谱 (TLC) 对方剂的君药苦参、臣药黄芪和使药甘草进行鉴别^[4], 尚未见有关其质量控制的文献报道。苦参水煎液在体外对部分皮肤真菌具有不同程度的抑制作用, 主要活性成分为生物碱, 其中以苦参碱含量较高, 苦参碱对大肠杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌及乙型链球菌均有明显抑制作用^[5]。基于此, 本课题以君药苦参中含量较高的苦参碱作为质量控制的指标, 参照国内外文献测定苦参碱含量的方法^[6-13], 建立高效液相色谱法 (HPLC) 测定乐肤口服液中苦参碱的含量, 为评价和控制乐肤口服液的质量提供科学依据。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies, 76337 Waldbronn, Germany), 包括 G1311A 输液泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱

[基金项目] 中药口服液类特色制剂的质量标准研究 (14ZJZ02-4)

[作者简介] 吴相雷, 硕士研究生。研究方向: 天然产物的开发。Tel: 15921754936; E-mail: 332954266@qq.com

[通讯作者] 张凤, 博士, 主管药师。研究方向: 中药及其制剂质量控制和开发研究。Tel: (021) 60748767; E-mail: fengzhangky@aliyun.com

温箱、G1314B-VWD 紫外检测器、Chemstation 色谱工作站; Sartorius CPA225D 型十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); SK7200H 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药 乐肤口服液由第二军医大学附属长征医院制剂室生产(批号:130709、130822、131020), 阴性样品由第二军医大学附属长征医院制剂室提供, 苦参碱对照品由中国食品药品检定所研究院提供(批号:110805-200508, 含量 98.7%); 乙腈、异丙醇均为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil Platisil NH₂ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-异丙醇-3% 磷酸水溶液(84:4:12), 等度洗脱; 流速: 1.2 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 205 nm; 进样量: 5 μl; 运行时间: 15 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取苦参碱对照品 2.18 mg, 置 2 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得对照品储备液(1.09 mg/ml), 4 °C 保存。

2.2.2 供试品溶液 精密量取 10 ml 乐肤口服液置分液漏斗中, 加入浓氨水 0.5 ml, 用氯仿萃取 3 次(每次 10 ml), 合并萃取液, 蒸干, 用甲醇定容至 1 ml, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取白鲜皮 1 g、黄芪 1.5 g、白术 1 g、茯苓 1 g、牡丹皮 1 g、赤芍 1 g、甘草 0.25 g, 加水煎煮 2 次, 第一次 3 h, 第二次 2 h, 合并煎煮液, 滤过, 滤液浓缩至 4 ml, 加乙醇 8 ml, 搅匀, 上清液回收乙醇, 加单糖浆 3 ml, 加水至 10 ml。摇匀, 滤过, 即得乐肤口服液阴性对照品。然后按照“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法同法制备。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 取阴性对照品溶液、对照品储备液、供试品溶液注入液相色谱仪, 记录色谱图(见图 1)。由图 1 可见, 阴性对照品在苦参碱出峰处无相应峰, 说明样品中其他成分对苦参碱的测定无干扰。

2.3.2 线性关系考察 采用逐级稀释法, 配制苦参碱对照品浓度为 872.00、654.00、436.00、327.00、218.00、109.00 和 54.50 μg/ml 系列对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以液相色谱峰面积为纵坐标(Y), 浓度为横坐标(X)进行线性回归, 得回归方程: $Y = 7.395 X - 14.15$, ($r = 0.9991$), 线性范围 54.50~872.00 μg/ml。苦参碱在 54.50~

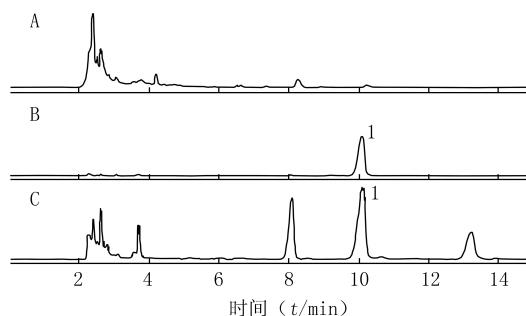


图 1 HPLC 色谱图

A. 阴性对照品溶液; B. 对照品溶液;
C. 供试品溶液; 1. 苦参碱

872.00 μg/ml 浓度范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取苦参碱对照品浓度为 218.00 μg/ml 的溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 测定峰面积。计算苦参碱峰面积 RSD 为 0.68%, 结果表明该方法精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取本品(批号 130822)按“2.2.2”项下条件制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积并计算含量, 苦参碱含量 RSD 为 2.22%, 结果见表 1, 说明该方法重复性良好。

表 1 乐肤口服液中苦参碱的重复性试验

取样量 (V/ml)	含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	平均含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	RSD (%)
10	478.5	487.8	2.22
10	483.0		
10	477.0		
10	487.2		
10	496.4		
10	504.8		

2.3.5 稳定性试验 取“2.3.4”项下重复性试验中的第一份供试品溶液(批号:130822), 分别在 0、12、24、36、72 h 按“2.1”项下色谱条件进样, 测得苦参碱峰面积的 RSD 为 1.52% ($n = 3$), 结果表明供试品溶液在 3 d 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 精密量取已知含量的乐肤口服液(批号:130822)6 份, 每份 10 ml, 分别精密加入苦参碱对照品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按照“2.1”项下色谱条件进样分析, 测定含量并计算苦参碱的回收率, 得苦参碱回收率为 99.82%, RSD 为 1.12% (表 2)。

2.4 样品测定 按“2.2.2”项下条件制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 根据标

准曲线计算 3 批乐肤口服液中苦参碱的含量,结果见表 3。

表 2 苦参碱加样回收率试验结果(n=6)

样品含量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
4.878	4.504	9.429	100.5		
4.878	4.522	9.409	100.1		
4.878	4.578	9.588	101.4	99.82	1.12
4.878	4.513	9.305	99.08		
4.878	4.568	9.417	99.69		
4.878	4.534	9.241	98.18		

表 3 样品中苦参碱含量测定结果(μg/ml, n=3)

批号	含量			平均含量
	1	2	3	
130709	479.1	477.5	479.2	478.6
130822	501.0	500.7	498.9	500.2
131020	497.8	499.2	499.7	498.9

3 讨论

3.1 提取方法的考察 前处理试验中,在口服液中加入氨水,使得溶液中苦参碱充分处于分子状态,有利于有机溶剂对苦参碱进行萃取^[14]。接下来考察多种提取方法:以二氯甲烷、乙酸乙酯、氯仿分别提取碱化的供试品溶液。结果表明,氯仿萃取效果最好,且操作简单,萃取 3 次可以基本将苦参碱从供试品溶液中完全提取。

2010 版《中国药典》中对于苦参药材质量控制中的前处理方法为柱层析方法,即通过中性氧化铝柱去除药材中的其他化合物和杂质,富集苦参碱和氧化苦参碱^[14]。因此,本试验也考察了该法在乐肤口服液中的应用。但试验结果发现,氯仿萃取物经过氧化铝柱分析后的组分,与氯仿提取物相比,目标化合物苦参碱在色谱图上的分离没有显著影响。因此,为了节约时间和经济成本,且考虑到操作的简便性,试验选择碱化口服液后,将氯仿萃取 3 次的溶液合并浓缩后重新定容的方法进行样品前处理。

3.2 流动相的考察 苦参碱的分离是试验的关键。试验考察了甲醇-水系统和乙腈-水系统等流动相进行预试验,包括在系统中加入不同的添加剂,例如甲酸、乙酸、磷酸等,但试验结果并不理想。曾在乙腈-0.1% 磷酸水溶液(22 : 78)中加入三乙胺(pH 7.5),苦参碱分离效果也未有改善,与邻近的小峰不能完全分离,并且苦参碱的峰形不对称。2010 版《中国药典》有关药材中苦参碱的 HPLC 含

量测定收录了两种流动相,分别为乙腈-无水乙醇-3% 磷酸溶液(80 : 10 : 10)和乙腈-异丙醇-3% 磷酸水溶液(80 : 5 : 15)^[14]。因此,本试验尝试选择异丙醇作为添加剂,发现分离效果得到改善,在此基础上再次调整流动相的比例,当比例为乙腈-异丙醇-3% 磷酸水溶液(84 : 4 : 12),无需再次调节溶液 pH 值,苦参碱即可与邻近的峰达到完全分离,简单方便。

3.3 色谱柱的考察 本试验选用不同厂家的色谱柱,例如 Agilent ZORBAX SB-C₁₈, waters symmetry C₁₈ 和 GraceSmart RP₁₈,结果发现在普通 C₁₈ 柱上苦参碱峰形宽且不对称,无论怎么调整流动相都达不到分离度要求。因此,尝试使用适合分离生物碱的氨基柱 Diamonsil Platisil NH₂,配合已摸索好的流动相(乙腈-异丙醇-3% 磷酸水溶液),结果表明,苦参碱峰形良好,拖尾现象消失。

3.4 柱温和流速的考察 本试验考察了 25、30、35 °C 3 个不同柱温,结果发现温度改变对苦参碱的分离度影响不大,略微影响苦参碱的保留时间。同时还考察了 1.0、1.1、1.2 ml/min 不同流速对实验的影响,结果发现流速较小时峰形前沿、对称性不好。从保护色谱柱的考虑出发,最终确定柱温为 30 °C,流速为 1.2 ml/min。

4 小结

通过对前处理方法和色谱条件进行优化,本试验表明碱化口服液后氯仿萃取 3 次的方法,联合三相等度流动相进行 HPLC 分析的方法可以完成乐肤口服液中苦参碱的含量测定。该法精密度高,稳定性和重现性好,制备简单,可行性强,可用于检测乐肤口服液中苦参碱的含量,有助于提高医院制剂的有效性和安全性。

【参考文献】

- [1] 陈征宇,孔爱英.军队医疗机构制剂标准提高计划实施构想[J].中国药事,2013,27(11):1157-1160.
- [2] 汤迎爽,李富军.浅谈军队医院制剂发展方向[J].中医药导报,2012,18(7):120-121.
- [3] 周苏萍,夏晓东,傅小英.军队药品制剂抽验质量分析与建议[J].解放军药学学报,2010,26(2):176-177.
- [4] 林厚文,廖万清,郭澄.乐肤口服液制备及临床应用[J].时珍国医国药,2001,12(3):221.
- [5] 高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2007:103.
- [6] Wu XN, Yamashita F, Hashida M, et al. Determination of matrine in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies[J].Talanta,2003,59(5):965-971.

- [7] 张平刚,沈亮,甘凤琼,等.高效液相色谱法测定越南槐不同生长季节及不同部位的苦参碱和氧化苦参碱的含量[J].时珍国医国药,2013,24(1):140-141.
- [8] 余志华,王秀梅,吴雅莉,等.反相高效液相色谱法同时测定阴炎净洗液中苦参碱和氧化苦参碱含量[J].中国药业,2013,22(19):33-35.
- [9] 于海红,姜音,丛景香,等.苦参粗提液中苦参碱和氧化苦参碱的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2013,24(1):126-127.
- [10] 屈蓉,尹萌,张厚宝.高效液相色谱法测定止痛片中苦参碱的含量[J].时珍国医国药,2008,19(11):2786-2787.
- [11] 莫海玲,农英高,周佳宁.阴洁肤净洗液的质量标准研究[J].时珍国医国药,2007,18(3):632-633.
- [12] 李智勇,孙冬梅,王洛临.痒宁颗粒的质量标准研究[J].时珍国医国药,2011,22(11):100-101.
- [13] Zhang L, Liu WT, Zhang RW, *et al*. Pharmacokinetic study of matrine, oxymatrine and oxysophocaroin in rat plasma after oral administration of *Sophora flavescens* Ait. Extract by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed, 2008, 47(4-5):892-898.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:25-26,188-189.
- [收稿日期] 2015-02-04 [修回日期] 2015-10-20
[本文编辑] 顾文华

(上接第423页)

- [2] Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole [J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45:649-663.
- [3] Cocchi S, Codeluppi M, Venturelli C, *et al*. Fusarium verticillioides fungemia in a liver transplantation patient: successful treatment with voriconazole [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 71:438-441.
- [4] Voriconazole (Package Insert), Revised Version [Z]. New York, NY: Pfizer, 2011.
- [5] Hyland R, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31:540-547.
- [6] Van Gelder T, Le Meur Y, Shaw LM, *et al*. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation [J]. Ther Drug Monit, 2006, 28(2):145-154.
- [7] Thomson AH, Whiting B. Bayesian parameter estimation and population pharmacokinetics [J]. Clin Pharmacokinet, 1992, 22(6):447-467.
- [8] 纪宇,黄晓军.关于《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌感染的诊断标准与治疗原则(修订版)》治疗原则部分的解读[J].临床药物治疗杂志,2008,6(1):14-18.
- [9] 骆雪萍,梅铭惠.重症监护病房侵袭性真菌感染特点及诊断[J].重庆医学,2010,39(17):2389-2391.
- [10] Hamadad Y, Seto Y, Yago K, *et al*. Investigation and threshold of optimum blood concentration of voriconazole: a descriptive statistical metaanalysis [J]. J Infect Chemother, 2012, 18:501-507.
- [11] Kim KH, Lee S, Lee S, *et al*. Voriconazole-associated severe hyponatremia [J]. Med Mycol, 2012, 50:103-105.
- [12] Matsumoto K, Ikawa K, Abematsu K, *et al*. Correlation between voriconazole trough plasma concentration and hepatotoxicity in patients with different CYP2C19 genotypes [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34:91-94.
- [13] Park WB, Kim NH, Kim KH, *et al*. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial [J]. Clin Infect Dis, 2012, 55:1080-1087.
- [14] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, *et al*. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(12):1813-1821.
- [15] 付双双,熊歆,翟所迪,等.伏立康唑患者血药浓度监测[J].中国临床药理学杂志,2013,29(8):622-624.
- [16] 蔡然,张杰根,刘晓蒙,等.42例伏立康唑治疗肺真菌感染患者的不良反应[J].临床药物治疗杂志,2013,11(2):49-51.
- [17] 解建,张明,李涛,等.伏立康唑治疗101例重症患者侵袭性真菌感染的临床分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(4):811-813.
- [18] Dolton MJ, Ray JE, Chen SC, *et al*. Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9):4793-4799.
- [19] Pai MP, Allen S. Voriconazole inhibition of tacrolimus metabolism [J]. Clin Infect Dis, 2003, 36:1089-1091.
- [20] Chang HH, Lee NY, Ko WC, *et al*. Voriconazole inhibition of tacrolimus metabolism in a kidney transplant recipient with fluconazole-resistant cryptococcal meningitis [J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(4):348-350.
- [21] Venkataramana R, Zang S, Gayowski T, *et al*. Voriconazole inhibition of the metabolism of Tacrolimus in a liver transplant recipient and in human liver microsomes [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9):3091-3093.
- [22] 王柠柠,梁武,颜苗,等.在本院患者中建立伏立康唑群体药物代谢动力学模型的初步探索[J].中南药学,2015,11(3):1174-1177.
- [收稿日期] 2015-08-17 [修回日期] 2014-12-01
[本文编辑] 顾文华