

HPLC-DAD 法测定通络开痹片中 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、士的宁、马钱子碱和杯苋甾酮

陈红霞¹, 张玉秋², 严晓娟³

1. 北京大学首钢医院 药剂科, 北京 100041

2. 清华大学玉泉医院(清华大学中西医结合医院) 药剂科, 北京 100049

3. 北京航空航天大学社区卫生服务中心 药剂科, 北京 100083

摘要: 目的 建立了 HPLC-DAD 波长切换法测定通络开痹片中 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、士的宁、马钱子碱和杯苋甾酮的分析方法。方法 Purospher ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 测定波长: 260 nm (士的宁和马钱子碱)、243 nm (杯苋甾酮)、254 nm (5-*O*-甲基维斯阿米醇苷); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL。结果 杯苋甾酮、马钱子碱、士的宁和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷分别在 0.058 4~5.840 0、0.118 0~11.800 0、0.094 9~9.900 0、0.023 8~2.380 0 μg/mL 具有良好的线性, 平均回收率分别为 100.51%、99.59%、98.75%、100.38%, RSD 值分别为 1.6%、1.1%、1.7%、1.6%。结论 本法具有前处理简单、分析时间短、检测结果准确等优点, 适用于通络开痹片的质量控制。

关键词: 通络开痹片; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; 士的宁; 马钱子碱; 杯苋甾酮; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)12-2746-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.12.011

Determination of 5-*O*-methylvisamicin, strychnine, brucine, and cyasterone in Tongluo Kaibi Tablets by HPLC-DAD

CHEN Hong-xia¹, ZHANG Yu-qiu², YAN Xiao-juan³

1. Department of Pharmacy, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100041, China

2. Department of Pharmacy, Yuquan Hospital of Tsinghua University (Tsinghua University Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine), Beijing 100049, China

3. Department of Pharmacy, Community Health Service Center of Beijing University of Aeronautics and Astronautics, Beijing 100083, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-DAD wavelength switching method for determination of 5-*O*-methylvisamicin glycoside, strychnine, brucine, and cyasterone in Tongluo Kaibi Tablets. **Methods** Purospher ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was consisted of acetonitrile - 0.5% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were set at 260 nm for strychnine and brucine, 243 nm for cyasterone, and 254 nm for 5-*O*-methylvisamicin glycoside. The column temperature was 30 °C, volume flow was 1.0 mL/min, and the injection volume was 10 μL. **Results** Cyasterone, brucine, strychnine, and 5-*O*-methylvisamicin glycoside showed good linear relationships in concentration range of 0.058 4 — 5.840 0, 0.118 0 — 11.800 0, 0.094 9 — 9.900 0, and 0.023 8 — 2.380 0 μg/mL. The average recoveries were 100.51%, 99.59%, 98.75%, and 100.38% with RSD values of 1.6%, 1.1%, 1.7%, and 1.6%, respectively. **Conclusion** The method has the advantages of simple pretreatment, short analysis time, and accurate detection result, which is suitable for quality control of Tongluo Kaibi Tablets.

Key words: Tongluo Kaibi Tablets; 5-*O*-methylvisamicin; strychnine; brucine; cyasterone; HPLC-DAD

现阶段, 随着我国人口老龄化趋势愈演愈烈, 以及人们工作压力的不断增大, 患有疼痛等类风湿性关节炎的人群越来越多。通络开痹片由马钱

子粉、川牛膝、当归、红花、木瓜、荆芥、防风、全蝎 8 味中药经粉碎等工艺制备而成, 具有活血散结、祛风通络的功效, 是骨伤科疾病中一种常用的

收稿日期: 2022-07-28

作者简介: 陈红霞 (1976—), 女, 主管中药师, 本科, 研究方向为临床中医学、中药的合理使用和中药药物警戒。E-mail: xsl7i5@163.com

口服药物, 临床常用于治疗寒热错杂瘀血阻络所致的关节疼痛、肿胀等症状, 对类风湿性关节炎等风湿病具有较好的疗效^[1-4]。通络开痹片在临床上的不良反应一般可见头晕、舌唇麻、口干、胃部不适、便秘、肌肉抽动、皮疹和全身发紧等, 主要是因为开痹片中马钱子具有一定的毒性^[5-9]。通络开痹片现收载于《中华人民共和国新药转正标准》, 标准中规定本品含马钱子粉以土的宁计应为 1.08~1.32 mg/片, 但仅以马钱子粉药材为检测对象不能更严谨地控制该药品的质量。实验建立了 HPLC-DAD 波长切换法测定通络开痹片中 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、土的宁、马钱子碱和杯菟甾酮的分析方法, 用于通络开痹片的质量控制。

1 仪器与试剂

岛津 LC-30A 型高效液相色谱仪, 配置在线脱气机、自动进样器、四元比例阀、DAD 检测器 (日本岛津公司); 万分之一 Mettler-Toled AE200 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-3200 ES 型超声波清洗机 (昆山超声设备公司)。

5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 (质量分数以 97.4% 计, 批号 111523-201811)、土的宁 (质量分数以 94.9% 计, 批号 110705-201904)、马钱子碱 (质量分数以 98.3% 计, 批号 110706-201806)、杯菟甾酮 (质量分数以 95.3% 计, 批号 111804-201705) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 购自天津市科密欧有限公司; 实验用水为自制超纯水; 其他试剂均为分析纯, 购自国药集团; 通络开痹片, 由河北通络药业有限公司生产, 规格 0.31 g/片, 批号分别为 210715、211134、220302。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Purospher ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm,

5 μm); 以乙腈 (A) - 0.5% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~6 min, 89% A, 6~27 min, 89%~31% A, 27~30 min, 31%~89% A, 30~36 min, 89% A; 测定波长: 260 nm (土的宁和马钱子碱)、243 nm (杯菟甾酮)、254 nm (5-*O*-甲基维斯阿米醇苷); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备溶液的制备 取 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 即得 58.44 μg/mL 的溶液。同法制备含马钱子碱、土的宁和杯菟甾酮分别为 117.96、94.90、23.83 μg/mL 的溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取各对照品储备溶液, 准确吸取 1.0 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取通络开痹片 20 片, 研细, 精密称取约 0.5 g, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇 20 mL, 超声提取 25 min (超声功率 220 W、频率 60 kHz), 取出放冷, 加甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按通络开痹片制备方法和药材配比分别制备缺马钱子粉、川牛膝和防风的阴性样品, 按供试品溶液的制备项下方法制备各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液, 分别进样 10 μL, 采集谱图峰面积。通过比较对照品溶液和阴性样品溶液谱图, 发现在阴性样品溶液谱图中, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、土的宁、马钱子碱和杯菟甾酮对应的位置无干扰, 4 种成分分离度良好。见图 1。

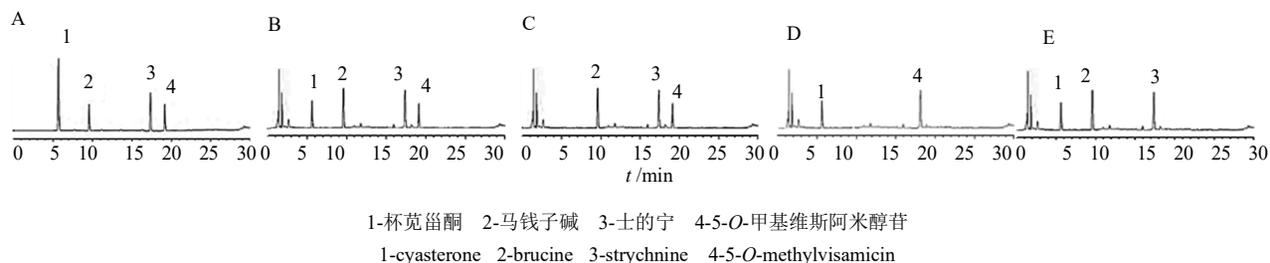


图 1 对照品 (A)、通络开痹片 (B)、缺川牛膝阴性样品 (C)、缺马钱子阴性样品 (D)、缺防风阴性样品 (E) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), Tongluo Kaibi Tablets (B), negative sample without *Cyathulae Radix* (C), negative sample without *Strychni Semen* (D), and negative sample without *Saposhnikovia Radix* (E)

2.4 线性关系考察

取各对照品储备溶液,分别准确移取 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mL,置 5 个 10 mL 棕色量瓶中,

加甲醇溶解并加至刻度,摇匀,分别进样 10 μ L,采集谱图峰面积。以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标进行线性回归,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 各成分回归方程、线性系数和范围

Table 1 Curve equation, linear coefficient and range of components

成分名称	回归方程	r^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
杯菟甾酮	$Y=16.18 X+11.21$	0.999 1	0.023 8~2.380 0
马钱子碱	$Y=27.56 X+12.18$	0.999 4	0.118 0~11.800 0
土的宁	$Y=12.28 X+13.62$	0.999 2	0.094 9~9.900 0
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$Y=12.79 X+14.95$	0.999 0	0.058 4~5.840 0

2.5 精密度试验

取对照品溶液,分别连续进样 6 次,每次进样 10 μ L,采集谱图峰面积,结果杯菟甾酮、马钱子碱、土的宁和 5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 值分别为 1.2%、1.1%、0.7%、0.9%。

2.6 重复性试验

取通络开痹片样品(批号 210715) 6 份,制备供试品溶液,分别进样 10 μ L,采集谱图峰面积,结果杯菟甾酮、马钱子碱、土的宁和 5-O-甲基维斯阿米醇苷质量分数的 RSD 值分别为 1.8%、1.4%、1.1%、1.9%。

2.7 稳定性试验

取通络开痹片样品(批号 210715),制备供试品溶液,室温下分别于 0、2、4、8、12、24 h 取样分析,采集谱图峰面积,结果杯菟甾酮、马钱子碱、土的宁和 5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 值分别为 1.2%、0.9%、1.2%、1.5%,表明溶液在 24

h 内稳定。

2.8 回收率试验

取通络开痹片样品(批号 210715) 6 份,研细,各精密称取约 0.25 g,置 25 mL 棕色量瓶中,分别精密加入各对照品储备溶液(杯菟甾酮、马钱子碱、土的宁和 5-O-甲基维斯阿米醇苷质量浓度分别为 23.83、117.96、94.90、58.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.5 mL,制备供试品溶液,分别进样 10 μ L,采集谱图峰面积,计算回收率,结果杯菟甾酮、马钱子碱、土的宁和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均回收率分别为 100.51%、99.59%、98.75%、100.38%,RSD 值分别为 1.6%、1.1%、1.7%、1.6%。

2.9 样品测定

取 3 批通络开痹片样品,制备供试品溶液,分别进样 10 μ L,采集谱图峰面积,外标法计算杯菟甾酮、马钱子碱、土的宁和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的质量分数,结果见表 2。

表 2 通络开痹片中 5-O-甲基维斯阿米醇苷、土的宁、马钱子碱和杯菟甾酮的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of 5-O-methylvisamicin, strychnine, brucine, and cyasterone in Tongluo Kaibi Tablets ($n=3$)

批号	质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$			
	杯菟甾酮	马钱子碱	土的宁	5-O-甲基维斯阿米醇苷
210715	0.589 2	2.660 1	3.940 5	1.550 7
211134	0.617 4	2.621 7	3.636 6	1.511 1
220302	0.550 2	2.554 2	3.774 3	1.417 8

3 讨论

3.1 提取条件的优化

通络开痹片中基质较为复杂,由 8 味中药组成,因此选择合适的提取条件对提高检测灵敏度、降低基质干扰具有关键作用。实验分别考察 80%、85%、90%、95% 甲醇溶液和甲醇对通络开痹片中杯菟甾

酮、马钱子碱、土的宁和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的提取效果,结果选择甲醇时样品的提取效果最佳;确定提取溶剂后,分别考察超声功率和超声时间对提取效果的影响,最终确定最佳的提取条件为:以甲醇作为提取溶剂,超声功率控制 200 W,时间控制 20 min。

3.2 流动相体系的选择

高效液相色谱法常用的流动相有甲醇体系和乙腈体系,因此实验分别选择甲醇-水、乙腈-水、0.5%醋酸溶液-甲醇和0.5%醋酸溶液-乙腈作为流动相体系,考察对杯苋甾酮、马钱子碱、土的宁和5-O-甲基维斯阿米醇苷的出峰时间、分离效果的影响,结果选择甲醇体系时,4种待测物出峰时间较长,检测效率偏低;选择乙腈-水体系时,马钱子碱和土的宁色谱峰发生分叉,结果不准确;选择乙腈-0.5%磷酸溶液时,4种待测物分离良好,分析时间较短,且无基质干扰。故实验选择乙腈-0.5%磷酸溶液作为流动相体系。

3.3 检测波长的选择

取杯苋甾酮对照品,加甲醇稀释制成20.0 μg/mL的溶液,设置二极管阵列检测器扫描范围为200~400 nm,得到杯苋甾酮最大吸收波长为243 nm;同法得到马钱子碱、土的宁和5-O-甲基维斯阿米醇苷最大吸收波长分别为260、260、254 nm^[10-13]。为使4种待测物的响应最大,实验选择采用波长切换法,即分别在3个波长下分别对杯苋甾酮、马钱子碱、土的宁和5-O-甲基维斯阿米醇苷进行定性、定量检测。

实验建立了HPLC-DAD波长切换法测定通络开痹片中杯苋甾酮、马钱子碱、土的宁和5-O-甲基维斯阿米醇苷,对方法的重复性、线性、回收率等进行了考察,并对前处理的条件进行了优化,结果证明,本法具有前处理简单、分析时间短、检测结果准确等优点,适用于通络开痹片的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张超. 通络开痹片联合玻璃酸钠治疗膝骨关节炎的临

床研究 [J]. 中国处方药, 2021, 19(11): 78-80.

- [2] 蔡东海, 张干, 陈多军, 等. 通络开痹片对踝关节骨折术后关节功能康复影响研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(8): 1107-1109.
- [3] 赵先岭, 于洋. 通络开痹片联合依那西普治疗类风湿性关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(11): 3338-3342.
- [4] 周晓莉, 刘芳. 通络开痹片联合来氟米特片治疗类风湿性关节炎临床观察 [J]. 光明中医, 2019, 34(14): 2216-2218.
- [5] 党晓芳, 林晓兰, 齐昕, 等. 有毒中药制马钱子临床使用药学监护 [J]. 北京中医药, 2017, 36(10): 937-939.
- [6] 杨蕙, 王宇红, 张秀丽, 等. 马钱子超微粉对类风湿性关节炎模型大鼠的量效关系参数研究 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(12): 1942-1944.
- [7] 刘雅敏, 陈庆, 杨艳娇, 等. 热痹清片中马钱子碱和土的宁在大鼠体内的药动学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 79-83.
- [8] 毛迪, 张娜, 刘树民, 等. 高效液相色谱法测定痹祺胶囊和马钱子粉中马钱子碱和土的宁的含量 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(52): 10-11.
- [9] 徐明, 张静, 邱建平, 等. 中药马钱子的炮制方法及其药理作用研究进展 [J]. 中医学报, 2022, 37(4): 765-772.
- [10] 江丽, 余辉, 曹月霞, 等. SPE-UPLC法同时测定复方荆防颗粒中的升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(1): 33-37.
- [11] 陈继英, 蓬展鹏, 吴谋, 等. 高效液相色谱法测定万应跌打酒中土的宁含量 [J]. 中国药业, 2021, 30(4): 63-65.
- [12] 孙建彬, 越亮, 王欣, 等. HPLC法测定三香跌打损伤酒中马钱子碱和土的宁含量 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(3): 38-41.
- [13] 吕婧, 刘玉堂, 耿子凯, 等. 高效液相色谱法测定八味舒脉胶囊中川牛膝杯苋甾酮含量 [J]. 山东中医杂志, 2015, 34(5): 380-381.

[责任编辑 解学星]