

HPLC 法测定抗妇炎胶囊中木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱

乔乐天¹, 刘源¹, 贾号¹, 孙彬^{2*}

1. 商丘市第一人民医院 药学部, 河南 商丘 476100

2. 聊城大学 生物制药研究院, 山东 聊城 252059

摘要: 目的 采用高效液相色谱 (HPLC) 法同时测定抗妇炎胶囊中木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱 10 种活性成分。方法 采用 InerSustain AQ-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A: 乙腈-无水乙醇 (80:20), 流动相 B: 0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 检测波长 220 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。结果 木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱分别在 2.69~134.50、1.95~97.50、0.63~31.50、0.86~43.00、11.95~597.50、0.59~29.50、6.08~304.00、4.85~242.50、1.66~83.00、19.79~989.50 μg/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.9993$); 平均回收率分别为 99.11%、98.23%、96.95%、97.78%、100.02%、97.21%、99.66%、99.52%、98.81%、100.08%, RSD 值分别为 1.04%、1.23%、1.37%、1.65%、0.70%、1.28%、0.65%、0.81%、1.11%、0.63%。结论 建立的 HPLC 法可用于抗妇炎胶囊中 10 种活性成分的测定, 作为抗妇炎胶囊质量控制方法。

关键词: 抗妇炎胶囊; 木兰花碱; 黄柏碱; 药根碱; 巴马汀; 小檗碱; 高效液相色谱

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)12-2502-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.12.006

Determination of magnoliatine, phellodendrine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, sophocarpine, matrine, oxysophocarpine, sophoridine, and oxymatrine in Kangfuyan Capsules

QIAO Le-tian¹, LIU Yuan¹, JIA Hao¹, SUN Bin²

1. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Shangqiu, Shangqiu 476100, China

2. Institute of Biopharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for the simultaneous determination of 10 active components in Kangfuyan Capsules, including magnoliatine, phellodendrine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, sophocarpine, matrine, oxysophocarpine, sophoridine, and oxymatrine. **Methods** The separation was performed on an InerSustain AQ-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution of [acetonitrile-anhydrous ethanol (80:20)] - 0.1% phosphoric acid solution. The detection wavelength was set at 220 nm, column temperature was set at 30 ℃, the flow rate was set at 1.0 mL/min, and the injection volume was 10 μL. **Results** Magnoliatine, phellodendrine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, sophocarpine, matrine, oxysophocarpine, sophoridine and oxymatrine was linear within the range of 2.69 — 134.50, 1.95 — 97.50, 0.63 — 31.50, 0.86 — 43.00, 11.95 — 597.50, 0.59 — 29.50, 6.08 — 304.00, 4.85 — 242.50, 1.66 — 83.00, and 19.79 — 989.50 μg/mL ($r \geq 0.9993$). The average recovery were 99.11%, 98.23%, 96.95%, 97.78%, 100.02%, 97.21%, 99.66%, 99.52%, 98.81%, and 100.08%, with RSD values of 1.04%, 1.23%, 1.37%, 1.65%, 0.70%, 1.28%, 0.65%, 0.81%, 1.11%, and 0.63%, respectively. **Conclusion** The established HPLC method can be used for the simultaneous determination of ten active components in Kangfuyan Capsules, which can be used as the quality control method for Kangfuyan Capsules.

Key words: Kangfuyan Capsules; magnoliatine; phellodendrine; jatrorrhizine; palmatine; berberine; HPLC

收稿日期: 2021-10-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81703357)

作者简介: 乔乐天 (1985—), 男, 主管药师, 本科, 研究方向为药物质量控制。E-mail: az3306630@163.com

*通信作者: 孙彬 (1984—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物制药。

抗妇炎胶囊由黄柏、苦参、杠板归等9味中药加工而成,具有活血化瘀、清热燥湿的功效,主要用于湿热下注型盆腔炎、阴道炎、慢性宫颈炎,症见赤白带下、阴痒、出血、痛经等病症的治疗^[1]。现代研究表明,抗妇炎胶囊可加快慢性宫颈炎患者临床症状缓解和宫颈修复^[2-3],提高慢性宫颈炎伴人类乳头瘤病毒感染患者转阴率,降低复发风险^[4],缓解子宫平滑肌痉挛,改善局部血液循环,修复肌肉细胞损伤^[5]。抗妇炎胶囊现有质量标准^[1]和文献报道^[6-8]仅对其所含1或2个成分进行定量研究。中药复方制剂具有多靶点、多成分等特点,其产品质量受中药材品种种属、产地以及中药材采收季节、初加工处理方法等因素影响较大,并且近年来,多指标成分质量控制方法已逐步应用于中药复方制剂中。本实验采用HPLC法对抗妇炎胶囊中木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱10种活性成分进行同时测定,建立抗妇炎胶囊中多指标成分质量控制方法,为进一步提高该制剂的整体质量控制水平、确保临床用药疗效一致性提供参考。

1 材料

LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);SB25-120 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);FA2004 电子天平(0.1 mg, 上海衡平仪器仪表厂)。

盐酸黄柏碱(批号 111895-201805, 质量分数 94.9%)、盐酸药根碱(批号 110733-201609, 质量分数 89.5%)、盐酸巴马汀(批号 110732-201913, 质量分数 85.7%)、盐酸小檗碱(批号 110713-202015, 质量分数 85.9%)、槐果碱(批号 112052-202001, 质量分数 91.8%)、苦参碱(批号 110805-202010, 质量分数 98.7%)和氧化苦参碱(批号 110780-201909, 质量分数 92.9%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;木兰花碱(批号 PRF10031227, 质量分数 99.8%)、氧化槐果碱(批号 PRF7061721, 质量分数 99.9%)和槐定碱(批号 PRF8041443, 质量分数 99.1%)对照品均购自成都普瑞法科技开发有限公司。抗妇炎胶囊购自贵州远程制药有限责任公司,规格 0.35 g/粒,批号 20200503、20200507、20200602、20200701、20200704、20200802、20201001、20201108、20201201、20201203、20201205、20210301、20210303、20210307、20210505,编号依次为 S1~S15。乙腈、乙醇为色

谱纯,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取木兰花碱、盐酸黄柏碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱对照品适量,用甲醇制成分别含木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱 0.538、0.390、0.126、0.172、2.390、0.118、1.216、0.970、0.332、3.958 mg/mL 的混合对照品贮备液,再精密吸取贮备液适量,用甲醇稀释 20 倍,制得混合对照品溶液(分别含木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱 26.9、19.5、6.3、8.6、119.5、5.9、60.8、48.5、16.6、197.9 $\mu\text{g/mL}$)。

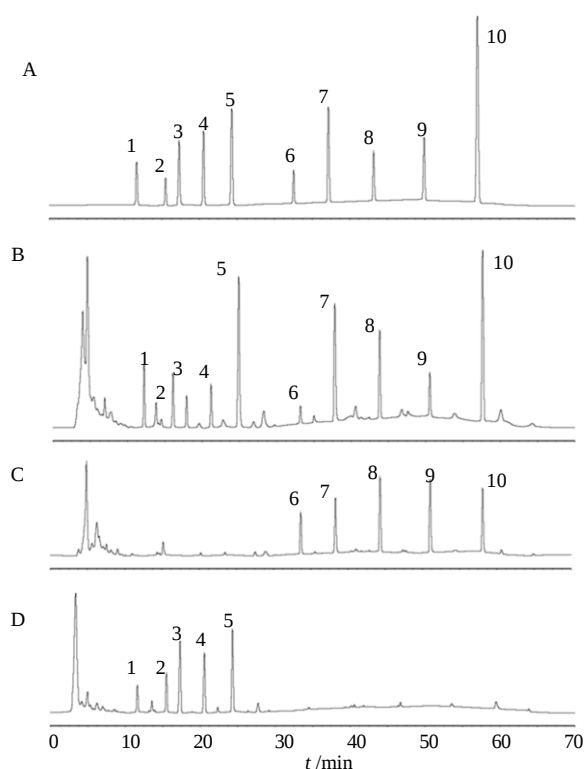
2.1.2 供试品溶液的制备 取抗妇炎胶囊内容物研细,精密称定细粉约 0.6 g,加浓氨试液 1 mL 使湿润,放置 5 min,精密加氯仿-甲醇(10:3) 25 mL,称定质量,超声 30 min,氯仿-甲醇(10:3)补足质量,滤过,取续滤液 10 mL,蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,即得。取按抗妇炎胶囊处方和制法分别制备的不含黄柏、不含苦参的阴性样品各适量,按上述方法制得相应的阴性样品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性

采用 InerSustain AQ-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 A: 乙腈-无水乙醇(80:20),流动相 B: 0.1%磷酸溶液(每 100 毫升加十二烷基磺酸钠 0.2 g),梯度洗脱(0~10 min, 15.0% A; 10~27 min, 15.0%→56.0% A; 27~60 min, 56.0%→75.0% A; 60~70 min, 75.0%→15.0% A),检测波长 220 nm^[9-10],体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。记录色谱图,见图 1。各成分均能达到基线分离,分离度>1.5,阴性供试品不干扰抗妇炎胶囊中 10 种活性成分的测定,理论板数按所测各成分色谱峰计均不低于 6 500。

2.3 线性方程及相关系数试验

分别精密吸取 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 混合对照品贮备液,分别用甲醇定容至 20 mL 并摇匀,得编号为 I~VI 的 6 个混合对照品溶液,依法进样测定,记录色谱峰峰面积。采用峰面积对质量浓度进行线性回归,结果见表 1,结果表明木兰花



1-木兰花碱 2-黄柏碱 3-药根碱 4-巴马汀 5-小檗碱 6-槐果碱 7-苦参碱 8-氧化槐果碱 9-槐定碱 10-氧化苦参碱
1-magnoliatine 2-phellodendrine hydrochloride 3-jatrorrhizine hydrochloride 4-palmatine hydrochloride 5-berberine hydrochloride 6-sophocarpine 7-matrine 8-oxysophocarpine 9-sophoridine 10-oxymatrine

图1 混合对照品(A)、抗妇炎胶囊(B)、缺黄柏阴性供试品(C)和缺苦参阴性供试品(D)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Kangfuyan Capsules (B), sample without *Phellodendri Chinensis Cortex* (C), and sample without *Sophorae Flavescentis Radix* (D)

碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验

精密吸取同一份抗妇炎胶囊供试品溶液(编号S1) 10 μL, 依法进样, 连续测定6次, 记录色谱峰峰面积, 计算得木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱面积的RSD值分别为0.86%、1.10%、1.24%、1.17%、0.63%、1.28%、0.77%、0.92%、1.08%、0.51%。

2.5 重复性试验

取抗妇炎胶囊(编号S1) 6份, 制备供试品溶液, 依法进样测定, 记录色谱峰峰面积并采用外标法计算木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱的质量分数, 结果10种成分质量分数的RSD值分别为1.39%、1.62%、1.85%、1.73%、1.01%、1.89%、1.36%、1.50%、1.67%、0.92%。

2.6 稳定性试验

取抗妇炎胶囊(编号S1)样品, 依法制备供试品溶液, 于制备后0、2、5、9、14、24 h各精密吸取10 μL供试品溶液, 依法进样测定, 记录色谱峰峰面积, 结果木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱峰面积的RSD值分别为0.91%、1.08%、1.26%、1.20%、0.57%、1.31%、0.82%、0.91%、1.05%、0.54%, 表明抗妇炎胶囊供试品溶液在24 h内稳定性良好。

表1 10种成分线性关系测定结果

Table 1 Result of linear-regression analysis of ten constituents

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
木兰花碱	$Y=1.5024 \times 10^6 X - 739.1$	0.999 7	2.69~134.50
黄柏碱	$Y=1.2976 \times 10^6 X + 1003.8$	0.999 5	1.95~97.50
药根碱	$Y=7.8134 \times 10^5 X - 652.3$	0.999 7	0.63~31.50
巴马汀	$Y=9.0615 \times 10^5 X + 444.9$	0.999 4	0.86~43.00
小檗碱	$Y=1.1854 \times 10^6 X + 825.1$	0.999 9	11.95~597.50
槐果碱	$Y=5.0419 \times 10^5 X - 368.4$	0.999 9	0.59~29.50
苦参碱	$Y=1.8072 \times 10^6 X + 1073.2$	0.999 5	6.08~304.00
氧化槐果碱	$Y=1.6367 \times 10^6 X - 1157.5$	0.999 8	4.85~242.50
槐定碱	$Y=1.1513 \times 10^6 X + 773.8$	0.999 7	1.66~83.00
氧化苦参碱	$Y=1.3248 \times 10^6 X - 591.6$	0.999 3	19.79~989.50

2.7 回收率试验

取抗妇炎胶囊(编号 S1)内容物,研细后精密称定细粉 0.3 g,共称取 9 份,随机均分成 3 组,精密加入混合对照品溶液(含木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、氧化苦参碱 0.407、0.281、0.097、0.132、1.769、0.087、1.051、0.753、0.247、2.693 mg/mL) 0.8、1.0、1.2 mL 各一组,制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积,计算得 10 种成分的平均回收率分别为 99.11%、98.23%、96.95%、

97.78%、100.02%、97.21%、99.66%、99.52%、98.81%、100.08%,RSD 值分别为 1.04%、1.23%、1.37%、1.65%、0.70%、1.28%、0.65%、0.81%、1.11%、0.63%。

2.8 样品测定

取 15 批抗妇炎胶囊,制备供试品溶液,依法检测,记录色谱峰峰面积,采用外标法计算木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱的质量分数,结果见表 2。

表 2 抗妇炎胶囊中木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱的测定结果($n=3$)

Table 2 Results of magnoliatine, phellodendrine, jatrorrhizine, palmatine, berberine, sophocarpine, matrine, oxysophocarpine, sophoridine, and oxymatrine in Kangfuyan Capsules ($n=3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	木兰花碱	黄柏碱	药根碱	巴马汀	小檗碱	槐果碱	苦参碱	氧化槐果碱	槐定碱	氧化苦参碱
S1	1.357	0.954	0.311	0.452	5.921	0.281	3.479	2.516	0.832	9.018
S2	1.138	1.006	0.328	0.430	6.157	0.298	3.441	2.279	0.783	9.362
S3	1.320	1.026	0.315	0.398	5.893	0.249	3.728	2.855	0.851	8.574
S4	1.406	0.901	0.304	0.342	6.288	0.337	3.580	2.013	0.992	9.004
S5	1.371	0.982	0.336	0.497	6.003	0.274	3.097	2.835	0.896	9.157
S6	1.085	0.907	0.320	0.401	5.911	0.276	2.783	2.626	0.820	9.197
S7	1.198	0.993	0.292	0.536	6.262	0.289	3.918	2.790	0.666	7.696
S8	1.334	0.825	0.273	0.368	5.669	0.280	3.495	2.913	0.804	7.683
S9	1.429	0.763	0.357	0.427	5.674	0.263	3.304	3.019	0.766	7.214
S10	1.303	0.855	0.248	0.485	6.139	0.295	3.662	3.002	0.694	7.865
S11	1.615	0.785	0.295	0.501	4.860	0.267	3.693	2.497	0.747	7.686
S12	1.597	1.017	0.373	0.438	7.105	0.304	4.175	2.508	0.923	9.923
S13	1.365	1.028	0.344	0.529	7.004	0.315	3.502	2.471	0.901	10.822
S14	1.448	1.113	0.356	0.477	6.992	0.326	4.106	2.026	0.950	9.970
S15	1.541	1.136	0.360	0.492	6.435	0.309	4.154	3.007	0.961	9.897

3 讨论

3.1 活性成分的选择

抗妇炎胶囊由苦参、杠板归、黄柏、连翘、益母草、赤豆、艾叶、当归和乌药 9 味中药组方而成,方中苦参清热燥湿、杀菌止痒,为其君药;黄柏、杠板归清热解毒、燥湿消肿,益母草、当归补血活血、消肿止痛,连翘清热解毒、消肿散结,合为臣药;赤豆利水消肿,艾叶温经止血、祛湿止痒,合为佐药;乌药行气止痛,为使药。9 种药物处方用量比例为 25:25:15:5:3:3:3:3:3,苦参、杠板归和黄柏处方用量较大。苦参含有生物碱类、

黄酮类、三萜皂苷类等成分,其中槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱等生物碱为其主要活性成分,具有抗病原微生物、抗炎作用^[11];黄柏含有生物碱类、黄酮类、酚酸类成分,其中木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀和小檗碱等生物碱是黄柏中主要活性成分,具有抗炎、抗真菌作用^[12];杠板归主要含有槲皮素、芦丁等黄酮类成分,而抗妇炎胶囊方中苦参、黄柏、连翘、益母草、艾叶、当归中均含有黄酮类成分,作为该制剂定量测定目标成分专属性不强;同时连翘、益母草、赤豆、艾叶、当归和乌药处方用量较低,所含成分作为定量

测定成分准确度不够,故本实验以君药中的成分为首选,结合臣佐使药的确认原则,选取抗妇炎胶囊所含槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、氧化苦参碱、木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀和小檗碱10种活性成分为定量控制目标成分。

3.2 提取方法的选择

制备供试品溶液时,对提取溶剂进行了多次筛选,首先选用甲醇^[13-15]、乙醇^[9]、三氯甲烷^[10]经超声提取30 min后制得的溶液进行样检测,发现甲醇溶液中木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀和小檗碱的含量较高,但氧化苦参碱含量偏低,三氯甲烷溶液中药根碱的含量较低。经过反复试验摸索,最终确定实验中的供试品溶液的制备方法。

3.3 流动相的确定

考察流动相时,首先对基础流动相甲醇-水和乙腈-水进行考察,结果甲醇-水流动相系统出现严重的漂移现象,无法正常积分;乙腈-水系统出现过杂峰,造成待测成分不能分离,且苦参碱和氧化苦参碱拖尾严重,不能准确积分,综合参考文献报道^[16-17],通过反复摸索,最终选择流动相A为乙腈-乙醇(80:20),流动相B为0.1%磷酸溶液(每100毫升加十二烷基磺酸钠0.2 g)。

本实验采用HPLC法对抗妇炎胶囊中木兰花碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、槐果碱、苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱和氧化苦参碱10种活性成分进行同时检测,建立了抗妇炎胶囊中多指标成分的质量控制方法,所建立的方法准确可靠,简单易行,可为抗妇炎胶囊中多指标综合质量评价模式的建立、稳定产品质量、保证临床疗效的一致性提供有力的实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局国家药品标准 WS-10498 (ZD-0498)-2002-2012Z [S]. 2012.
- [2] 王剑. 抗妇炎胶囊联合阿奇霉素治疗慢性宫颈炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(9): 1487-1490.
- [3] 刘芳, 胡令军. 抗妇炎胶囊联合重组人干扰素 $\alpha 2a$ 治

疗慢性宫颈炎的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(6): 1078-1080.

- [4] 于淼淼, 杨露. 抗妇炎胶囊联合重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对慢性宫颈炎伴HPV感染患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2020, 42(1): 89-93.
- [5] 陈华国, 孙欣, 周欣. 苗族医气阻血瘀证现代科学内涵探索以及苗族药抗妇炎胶囊干预机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 5000-5006.
- [6] 姜莲, 王影超, 廖敏, 等. 抗妇炎胶囊中苦参的质量控制研究 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(11): 23-26.
- [7] 王秀芬. HPLC法测定抗妇炎胶囊中盐酸小檗碱含量 [J]. 石油化工应用, 2007, 26(5): 53-55.
- [8] 张善玉, 姜艳玲, 申英爱, 等. 抗妇炎胶囊中苦参碱和氧化苦参碱的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 728-729.
- [9] 鉴志刚, 叶世芸, 殷少文, 等. 基于指纹图谱技术与主成分分析优化苦参中苦参总碱的提取条件 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(8): 39-44.
- [10] 计曼艳, 曾琨, 王华. HPLC-DAD法同时测定中药苦参中七种生物碱成分的含量 [J]. 中国药师, 2017, 20(1): 60-63.
- [11] 孙磊, 郭江玉, 闫彦, 等. 苦参化学成分及其生物碱抑菌活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(11): 100-102.
- [12] 何巧玉, 刘静, 李春霞, 等. 基于网络药理学和指纹图谱的黄柏质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4931-4941.
- [13] 罗婷, 王佳琪, 江宇勤, 等. 一测多评法测定不同产地黄柏炭中4种生物碱含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(8): 11357-1364.
- [14] 田斌, 瞿孝兰, 林义平, 等. 基于多波长切换的HPLC法测定黄柏-蛇床子药对成分含量 [J]. 中药材, 2020, 43(8): 1952-1955.
- [15] 罗婷, 王佳琪, 江宇勤, 等. 不同等级黄柏炭饮片的HPLC指纹图谱分析 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(12): 2904-2906.
- [16] 潘明凤, 冯锐, 罗鸿, 等. 黄柏中黄柏碱和木兰花碱含量的反相高效液相色谱法测定 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 35-36.
- [17] 陈静, 王淑美, 孟江, 等. 一测多评法测定苦参中5种生物碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1406-1410.

[责任编辑 解学星]