doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.07.022

高效液相色谱法同时测定口疮穴位贴中 3 种生物碱含量*

董文燊[1],周秋娟[2],林　芝[1],陈　颖[1],蒋　燕[1],李　逸[1],瞿发林[1△]

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院,江苏 常州　213003;　2. 江苏省常州市武进区中西结合医院,江苏 常州　213003)

摘要:目的　建立同时测定口疮穴位贴中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为 Lichrosphe C_{18} 柱(250 mm × 4. 6 mm,5 μm),流动相为甲醇 - 乙腈 - 0. 015 mol / L 十二烷基硫酸钠水溶液(20∶35∶45,*V* / *V* / *V*),流速为 1. 0 mL / min,检测波长为 265 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL。**结果**　吴茱萸碱、吴茱萸次碱、小檗碱的进样量分别在 172. 10 ~ 2 151. 25 μg、93. 16 ~ 1 164. 50 μg、73. 38 ~ 917. 25 μg 范围内与峰面积线性关系良好(r = 0. 999 9, n = 6);精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均小于 2. 0%;平均加样回收率分别为 100. 48%,99. 91%,100. 02%,*RSD* 分别为 1. 44%,1. 56%,1. 64%(n = 6)。**结论**　该方法操作简便快速、重复性好、结果准确,可用于同时测定口疮穴位贴中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的含量。

关键词:口疮穴位贴;高效液相色谱法;吴茱萸碱;吴茱萸次碱;小檗碱;含量

中图分类号:R932;R284.1;R286.0　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1006 - 4931(2022)07 - 0089 - 03

Simultaneous Determination of Three Alkaloids in Kochuang Acupoint Applications by HPLC

DONG Wenshen[1], ZHOU Qiujuan[2], LIN Zhi[1], CHEN Ying[1], JIANG Yan[1], LI Yi[1], QU Falin[1]

(1. The 904th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, Changzhou, Jiangsu, China　213003;　2. Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wujin District, Changzhou, Jiangsu, China　213003)

Abstract: Objective　To establish a high - performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of evodiamine, rutecarpine and berberine in Kochuang Acupoint Applications. **Methods**　The chromatographic column was Lichrosphe C_{18} column (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol - acetonitrile - 0. 015 mol / L sodium dodecyl sulfate(SDS) aqueous solution (20∶35∶45, *V* / *V* / *V*), the flow rate was 1. 0 mL / min, the detection wavelength was 265 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results**　The linear ranges of evodiamine, rutecarpine and berberine were 172. 10 - 2 151. 25 μg, 93. 16 - 1 164. 50 μg, 73. 38 - 917. 25 μg(r = 0. 999 9, n = 6). The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 2. 0%. The average recoveries were 100. 48%, 99. 91% and 100. 02% with the *RSD*s of 1. 44%, 1. 56% and 1. 64% (n = 6). **Conclusion**　The method is simple, rapid, reproducible and accurate, which can be used for the simultaneous determination of evodiamine, rutecarpine and berberine in Kochuang Acupoint Applications.

Key words: Kochuang Acupoint Applications; HPLC; evodiamine; rutecarpine; berberine; content

口疮穴位贴方源自中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院中药复方经验方口疮散,由生大黄、吴茱萸、细辛、肉桂、川黄连 5 味中药组方[1],具有温通经络、清热泻火、散寒止痛功效,主要用于治疗口腔溃疡。方中,大黄、黄连味苦,性寒,清热泻火,用于上焦、中焦实火上炎;吴茱萸、细辛、肉桂为温里药,用于浮越之火引火归元,导热下行,吴茱萸的主要活性成分包括吴茱萸碱和吴茱萸次碱,具有散寒止痛功效;川黄连为苦寒之药,主要活性成分为小檗碱,具有清热泻火功效。为了更好地控制口疮穴位贴的质量,保证其临床疗效,本研究中建立了同时测定其主要活性成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1　仪器与试药

1. 1　仪器

LC - 20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),配有 SIL - 20A 型自动进样器、SPD - M20A 型检测器;FA1004 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司,精度为十万分之一);XS105 型电子分析天平(梅特勒 - 托利多仪器有限公司,精度为万分之一);R201 型旋转蒸发仪(上海申胜生物技术有限公司);SHZ - D(Ⅲ)型循环水式多用真空泵(上海力辰邦西仪器科技有限公司);HHS 型恒温水浴锅(上海医疗器械五厂)。

1. 2　试药

口疮穴位贴(中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院常州医疗区制剂室自制,批号分别为 20210118,

*基金项目:江苏省药学会 —— 奥赛康医院药学基金科研项目[A202024]。

第一作者:董文燊,男,大学本科,副主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)dongwenshen_hot102@163. com。

△通信作者:瞿发林,男,硕士,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)qufalin@163. com。

20210120,20210122);吴茱萸碱对照品(批号为110802－201710,含量按99.6%计),吴茱萸次碱对照品(批号为110801－201608,含量按99.7%计),小檗碱对照品(批号为110713－201814,含量按86.7%计),均购自中国食品药品检定研究院;十二烷基硫酸钠(SDS,湖南尔康制药股份有限公司,批号为101420190415);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Lichrosphe C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇－乙腈－0.015 mol/L SDS水溶液(20∶35∶45,*V*/*V*/*V*);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:265 nm;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

取吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱对照品各适量,精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇溶解成每1 mL分别含吴茱萸碱86.05 μg、吴茱萸次碱46.58 μg和小檗碱36.69 μg的混合对照品溶液。

取口疮穴位贴5贴,除去包装及盖衬,刮取药膏,置研钵中,混匀,取1 g,精密称定,置锥形瓶中,加甲醇50 mL,密塞,称定质量,浸泡1 h,超声(功率为300 W,频率为50 kHz)40 min使溶解,放至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取滤液10 mL,置圆底烧瓶中减压蒸干,残渣加热水(70～80 ℃)10 mL,超声使溶解,用0.1 mol/L NaOH调pH至8.5,分别用20,10,10 mL二氯甲烷萃取3次,合并萃取液,减压蒸干,残渣少量多次用甲醇超声(功率为300 W,频率为50 kHz)使溶解,置10 mL容量瓶中,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

按处方工艺分别制备缺吴茱萸、川黄连药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于1.5,阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:采用自动进样器分别精密吸取2.2项下混合对照品溶液2,5,10,15,20,25 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以进样量(*X*,μg)为横坐标、峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表1。

表1 线性关系考察结果(*n*=6)

Tab. 1 Results of linear relationship test(*n*=6)

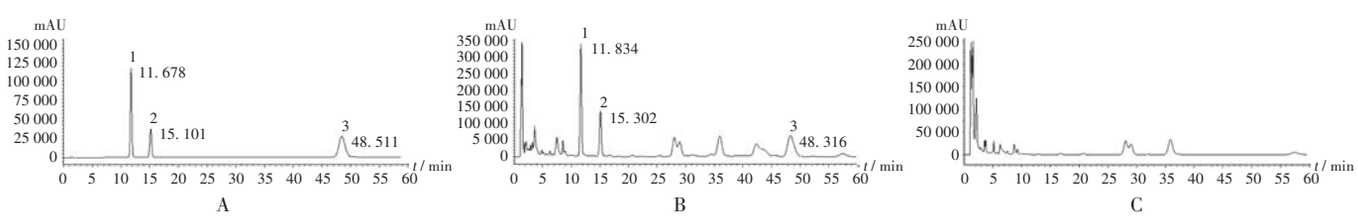
成分	回归方程	*r*	线性范围(μg)
吴茱萸碱	*Y*=1 314.3*X*－11 445.0	0.999 9	172.10～2 151.25
吴茱萸次碱	*Y*=1 034.7*X*－5 567.7	0.999 9	93.16～1 164.50
小檗碱	*Y*=2 639.3*X*－19 425.0	0.999 9	73.38～917.25

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱峰面积的*RSD*分别为1.40%,1.67%,1.71%(*n*=5),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20210118)口疮穴位贴药膏5份,各1 g,精密称定,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱含量的*RSD*分别为1.36%,1.63%,1.76%(*n*=5),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱峰面积的*RSD*分别为1.29%,1.60%,1.70%(*n*=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取口疮穴位贴药膏适量,精密称定,按1∶1精密加入含吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的混合对照品溶液适量,加甲醇至刻度,平行制备6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表2。



1. 吴茱萸碱 2. 吴茱萸次碱 3. 小檗碱

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Evodiamine 2. Rutecarpine 3. Berberine

A. Mixed control solution B. Test solution C. Negative control solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 2　加样回收试验结果（$n = 6$）

Tab. 2　Results of recovery test（$n = 6$）

成分	样品含量（mg）	加入量（mg）	测得量（mg）	回收率（%）	$\bar{X}$（%）	*RSD*（%）
吴茱萸碱	0.593 3	0.603 1	1.191 7	99.22		
	0.612 8	0.603 1	1.225 7	101.62		
	0.633 2	0.603 1	1.226 5	98.38	100.48	1.44
	0.612 1	0.603 1	1.224 1	101.48		
	0.597 5	0.603 1	1.202 2	100.27		
	0.606 5	0.603 1	1.221 3	101.94		
吴茱萸次碱	0.293 5	0.312 7	0.600 4	98.15		
	0.305 6	0.312 7	0.622 5	101.34		
	0.318 4	0.312 7	0.627 8	98.94	99.91	1.56
	0.303 5	0.312 7	0.618 3	100.67		
	0.293 6	0.312 7	0.601 8	98.56		
	0.303 0	0.312 7	0.621 4	101.82		
小檗碱	1.021 1	1.027 3	2.033 9	98.59		
	1.051 2	1.027 3	2.093 3	101.44		
	1.032 6	1.027 3	2.042 5	98.31	100.02	1.64
	1.047 1	1.027 3	2.085 3	101.06		
	1.022 5	1.027 3	2.036 9	98.74		
	1.051 0	1.027 3	2.098 4	101.96		

2.4　样品含量测定

取 3 批口疮穴位贴药膏 1 g，依法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定 2 次，记录峰面积，并计算含量。结果样品中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的平均含量分别为 1.182 6，0.583 8，2.078 9 mg / g。详见表 3。

表 3　样品含量测定结果（$n = 2$）

Tab. 3　Results of content determination of samples（$n = 2$）

批号	吴茱萸碱		吴茱萸次碱		小檗碱	
	$\bar{X}$（mg / g）	*RSD*（%）	$\bar{X}$（mg / g）	*RSD*（%）	$\bar{X}$（mg / g）	*RSD*（%）
20210118	1.159 6	1.36	0.567 1	1.63	2.083 0	1.76
20210120	1.206 1	1.39	0.603 1	1.68	2.072 2	1.71
20210122	1.182 0	1.44	0.581 3	1.66	2.081 4	1.73

3　讨论

3.1　流动相选择

比较了以甲醇 - 乙腈 - 0.015 mol / L SDS 水溶液和乙腈 - 0.05 mol / L 磷酸二氢钾溶液为流动相[2-5]时 3 种待测成分的峰形及分离度，结果前者优于后者。调节甲醇 - 乙腈 - 0.015 mol / L SDS 水溶液洗脱体系的比例为 20∶35∶45（*V* / *V* / *V*）时，3 种待测成分的分离度高，峰形好，干扰少。故选择甲醇 - 乙腈 - 0.015 mol / L SDS 水溶液（20∶35∶45，*V* / *V* / *V*）作为流动相。

3.2　检测波长选择[3]

采用紫外 - 可见光扫描对照品溶液，结果吴茱萸碱和吴茱萸次碱于 225 nm 和 290 nm 波长处均有较大吸收，小檗碱于 225，265，346 nm 波长处均有较大吸收；但供试品溶液于 225 nm 波长处基线平稳度较差，且其他色谱峰亦有较大吸收，影响小檗碱峰的分离度，于 265 nm 和 290 nm 波长处 3 种生物碱成分的分离度均较好，但 265 nm 波长处的吸收值高于 290 nm，故选择 265 nm 作为 3 种待测成分的检测波长。

3.3　萃取溶剂选择

口疮穴位贴由 5 味中药饮片经粉碎后入药，化学成分复杂。预试验中采用甲醇超声提取，本研究中采用有机溶剂进行提取与纯化，曾以乙酸乙酯、二氯甲烷和乙醚作为供试品的萃取溶剂。结果二氯甲烷对吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的综合萃取率较高，故选择二氯甲烷作为萃取溶剂。

3.4　供试品溶液 pH 调节点选择

小檗碱的溶解度在稀碱溶液中提高[6-7]。本研究中采用 0.1 mol / L NaOH 溶液调节供试品溶液的 pH 值（范围为 7.5 ~ 9.0），对吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的萃取率进行考察。结果吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的萃取率由大至小分别为 pH 8.5 > pH 7.5 > pH 9.0 > pH 8.0，pH 7.5 > pH 8.5 > pH 8 > pH 9.0，pH 9.0 > pH 8.5 > pH 7.5 > pH 8.0。综合比较，最终以 pH 8.5 作为供试品溶液的 pH 调节点。

3.5　方法评价

本方法操作简便快速、重复性好、结果准确，可用于同时测定口疮穴位贴中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和小檗碱的含量。

参考文献

[1] 周秋娟，瞿发林，董文燊．正交试验法优选口疮穴位贴的提取工艺[J]．中国药业，2020，29（5）：96 - 98.
[2] 李　宇，韩凤梅，刘　伟，等．反相高效液相色谱法测定加味左金丸中盐酸小檗碱和吴茱萸次碱的含量[J]．中国药学杂志，2006，41（8）：631 - 633.
[3] 宋成英．黄连 - 吴茱萸药对中 3 种生物碱的高效液相色谱法同时测定[J]．时珍国医国药，2016，27（11）：2625 - 2626.
[4] 陈　凯，李　慧，王佳奇，等．基于一测多评法研究配伍比例及 pH 值环境对黄连 - 大黄配伍后 4 种生物碱成分溶出的变化规律[J]．中草药，2016，47（10）：1709 - 1713.
[5] 陈　星，鲁晓光，仲格嘉，等．反相高效液相色谱法同时测定藏药五味黄连丸中 6 种有效成分的含量[J]．海峡药学，2017，29（12）：65 - 68.
[6] 吴永秋，万君晗，杨健峰，等．游离小檗碱的制备及其溶解性质考察[J]．今日药学，2017，27（8）：540 - 544.
[7] 杨庆珍，郑司浩，黄林芳．小檗碱提取方法和药理活性研究进展[J]．中国新药杂志，2015，24（5）：519 - 525.

（收稿日期：2021 - 07 - 06；修回日期：2021 - 10 - 21）