

HPLC法测定胃疡宁丸中去甲乌药碱的含量

潘殿玲¹, 张海峰^{2*}

¹济南市妇幼保健院, 山东 济南

²山东爱维德生物科技有限公司, 山东 济南

Email: *songqing13401@163.com

收稿日期: 2020年12月9日; 录用日期: 2021年1月8日; 发布日期: 2021年1月18日

摘要

目的: 建立一种胃疡宁丸中去甲乌药碱含量的高效液相色谱(HPLC)测定方法。方法: 色谱柱选用安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18液相色谱柱; 流动相为乙腈-水(85:15), 水相中含有0.1%的甲酸; 检测波长为214 nm, 柱温25℃, 流速为0.5 mL/min。结果: 该方法具有较高的精密度、稳定性和可重复性, 加样回收率平均值为99.33%, 选取不同批次的胃疡宁丸, 测定其中去甲乌药碱的平均含量为9.348 μg/g。结论: 该方法可作为检测胃疡宁丸中去甲乌药碱含量的有效方法。

关键词

胃疡宁丸, 去甲乌药碱, 高效液相法

Determination of Higenamine in Weiyangning Pills by HPLC

Dianling Pan¹, Haifeng Zhang^{2*}

¹Jinan Maternity and Child Care Hospital, Jinan Shandong

²Shandong Aiweide Biological Technology Co., Ltd., Jinan Shandong

Email: *songqing13401@163.com

Received: Dec. 9th, 2020; accepted: Jan. 8th, 2021; published: Jan. 18th, 2021

Abstract

Objective: To establish an effective method for determining Higenamine in Weiyangning pills by HPLC. **Methods:** ZORBAX Eclipse XDB-C18 was used as the column; the mobile phase was acetonitrile-water (85:15), containing 0.1% formic acid in the aqueous phase; the detection wavelength was 214 nm, the column temperature was 25°C, and the flow rate was 0.5 mL/min. **Results:** The method has high precision, stability, and repeatability. The average recovery rate was 99.33%. The average content of higenamine in Weiyangning pills of different batches was determined to be 9.348 μg/g. **Conclusion:** This method can be used as an effective method for detecting the content of higenamine in Weiyangning pills.

*通讯作者。

trile-water (85:15) with 0.1% of formic acid in water; the detection wavelength was 214 nm; the temperature was 25°C; the flow rate was 0.5 mL/min. Results: The detection method exhibited high precision, stability, and repeatability. The average recovery was 99.33%. The average content of Higenamine in different batches of Weiyangning pills was 9.348 µg/g. Conclusion: This method can be used as an effective method for determining Higenamine in Weiyangning pills.

Keywords

Weiyangning Pills, Higenamine, HPLC

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胃疡宁丸是一种著名的中成药, 具有温中散寒、理气止痛、制酸止血的功效, 临床上用于治疗慢性胃炎、胃溃疡、胃胀、胃痛、胃酸过多等疾病[1]。随着现代医学的发展, 人们发现胃疡宁丸具有多种药理活性, 包括抗炎、抗菌、止痛、抗胃溃疡、抗幽门螺旋杆菌等[2] [3] [4] [5]。与各种治疗胃病的西药(埃索美拉唑镁、吗丁啉、生胃酮、西咪替丁等)相比, 胃疡宁丸具有毒副作用低、药效持久、不易复发等优点[6], 在治疗各种慢性胃病, 特别是慢性胃炎、胃溃疡等方面, 表现了出非常好效果。

胃疡宁丸由乌药、炒山药、制白术、白及、青皮等十几种中草药加工而成[7]。其中, 乌药来自于樟科山胡椒属植物乌药的块根, 具有理气止痛、温肾散寒的功效[8]。研究表明, 乌药中含有一定量的去甲乌药碱(图 1)。去甲乌药碱是一种 β_2 受体激动剂, 具有强心、降血压、抗炎镇痛、抗肿瘤等多种药理活性[9]-[14]。动物实验表明, 去甲乌药碱对大鼠心脏具有显著的保护作用[15], 能够明显增强心衰大鼠的心肌收缩力, 同时对炎症细胞和肿瘤细胞具有较好的抑制效果[16], 这说明去甲乌药碱是胃疡宁丸中的一种关键活性物质, 对于胃疡宁丸的多种药理活性至关重要。本实验拟采用高效液相色谱法分析测定胃疡宁丸中去甲乌药碱的含量, 通过优化色谱条件, 建立一种快速、简便、可重复的检测方法, 广泛用于测定胃疡宁丸及同类产品中去甲乌药碱的含量, 这有利于进一步研究去甲乌药碱在胃疡宁丸中起到的关键药理活性, 且对于中成药胃疡宁丸生产过程中的质量控制具有重要意义。

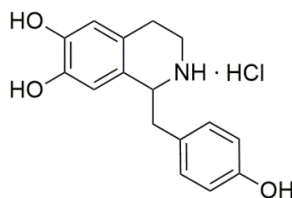


Figure 1. Chemical structure of Higenamine

图 1. 去甲乌药碱结构图

2. 仪器与试剂

2.1. 仪器

梅特勒 ME204E 电子天平, 安捷伦 Agilent1260 高效液相色谱仪, 昆山舒美 KQ-500B 型超声波清洗

器, 德国西门子 UltraClear 超纯水系统。

2.2. 试药

胃疡宁丸(广州白云山陈李济药厂有限公司), 去甲乌药碱对照品(上海抚生实业有限公司), 色谱级乙腈(阿拉丁), 超纯水(自制)。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

本实验色谱柱选用安捷伦 ZORBAX Eclipse XDB-C18 液相色谱柱, 150 × 4.6 mm, 3.5 μm; 流动相为乙腈 - 水(85:15), 水相中含有 0.1% 的甲酸; 检测波长为 214 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL, 流速为 0.5 mL/min。

3.2. 溶液的配制

3.2.1. 对照品溶液的配制

准确称取去甲乌药碱对照品, 置于容量瓶中, 用甲醇溶解、稀释, 配制成 1.0 g/L 的标准溶液, 于 -18 °C 闭光保存。使用时用移液管吸取一定量该对照品溶液, 用 3.1 所述的流动相乙腈 - 水(85:15)溶液稀释。

3.2.2. 供试品溶液的制备

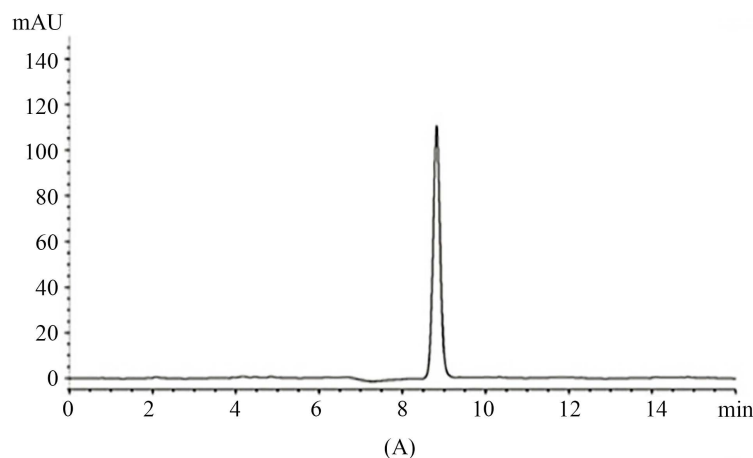
取胃疡宁丸 1.0 g, 加入硅藻土 2 g, 研磨, 转移到锥形瓶中, 加入 30 mL 甲醇, 于超声波清洗器中超声 1 h, 过滤, 滤饼中再次加入 30 mL 甲醇, 于超声波清洗器中超声 1 h, 过滤, 合并所得滤液, 减压浓缩, 所得固体用 3.1 所述的流动相乙腈 - 水(85:15)溶液溶解, 并稀释定容至 50 mL 得供试品溶液, 使用前取少量供试品溶液用微孔滤膜过滤。

3.2.3. 阴性供试品溶液的制备

按照胃疡宁丸中药配方的比例和制备工艺, 制备不含乌药的胃疡宁丸阴性对照样品, 按照 3.2.2 的方法制备阴性对照品溶液。

3.3. 专属性实验考察

取去甲乌药碱对照品溶液、供试品溶液和阴性供试品溶液各 10 μL, 按照 3.1 所述的色谱条件, 做 HPLC 谱图。如图 2 所示, 在该液相色谱条件下, 去甲乌药碱的保留时间是 8.41 min, 与相邻的化合物峰能够明显的分离, 且在阴性供试品溶液中几乎不含去甲乌药碱。



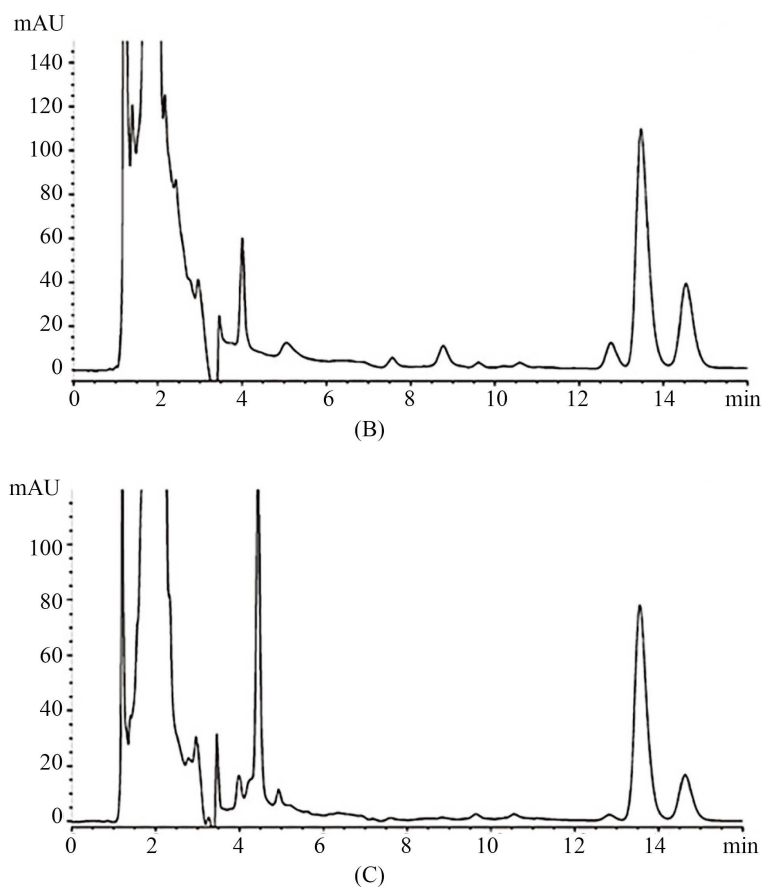


Figure 2. HPLC chromatogram of reference solution of Higenamine (A), test solution (B), and negative test solution (C)

图 2. 去甲乌药碱对照品溶液(A)、供试品溶液(B)和阴性供试品溶液(C)的液相色谱图

3.4. 线性关系考察

精确称量去甲乌药碱 2.4 mg, 用甲醇溶解, 容量瓶定容至 10 mL, 得 240 $\mu\text{g/mL}$ 的待测溶液。取该待测溶液, 配制成浓度为 2.4, 12.0, 24.0, 36.0, 48.0, 96.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液, 各取 10 μL , 进样, 测定去甲乌药碱的 HPLC 谱图, 以峰面积为纵坐标, 进样浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得去甲乌药碱的回归方程: $Y = 29456X + 24795$, $r = 0.9994$, 结果表明, 去甲乌药碱在 2.4~96.0 $\mu\text{g/mL}$ 的进样浓度范围内, 与峰面积呈良好的线性关系。

3.5. 精密度试验

用移液管移取步骤 3.2.1 中所配制的去甲乌药碱对照品溶液 3 mL, 置于容量瓶中, 定容至 10 mL, 取 10 μL , 进样, 测定去甲乌药碱的峰面积, 连续测定 6 次, 结果表明, 去甲乌药碱峰面积的 RSD 值是 1.98%, 符合实验要求。

3.6. 稳定性试验

取步骤 3.2.2 制备的供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 取样 10 μL , 测定去甲乌药碱 HPLC 谱图的峰面积, 计算 RSD 值为 0.88%, 说明该溶液在 10 h 内具有较好的稳定性。

3.7. 重复性试验

取同一批次的胃疡宁丸 6 份, 按照步骤 3.2.2 中的方法制备供试品溶液, 按照 2.1 所述的色谱条件, 做 HPLC 谱图, 测定去甲乌药碱的峰面积, 计算 RSD 值为 2.37%, 表明该测试方法具有较好的重复性。

3.8. 加样回收率实验

取同一批次的胃疡宁丸 1.0 g, 加入硅藻土 2 g, 研磨, 转移到锥形瓶中, 按照步骤 3.2.2 中的方法, 加入甲醇, 超声提取, 合并所得滤液, 减压浓缩, 向所得固体中加入 10 μL 的去甲乌药碱标准品溶液(浓度 1.0 g/L), 用 3.1 所述的流动相乙腈 - 水(85:15)溶液溶解, 并稀释定容至 10 mL, 按照 3.1 所述的色谱条件, 做 HPLC 谱图, 重复三次, 计算平均回收率。重复上述实验, 分别加入 20 μL 、30 μL 的去甲乌药碱标准品溶液(浓度 1.0 g/L), 计算平均回收率, 结果如表 1 所示, 加样回收率平均值为 99.33%, 符合药典要求。

Table 1. Recovery rate of Higenamine

表 1. 去甲乌药碱的加样回收率

加标水平	本底值(μg)	加入量(μg)	测定值(μg)	回收率(%)	平均值(%)
100%	9.1547	10	19.2614	101.07	99.33
		10	19.0487	98.94	
		10	19.0916	99.37	
200%	9.1547	20	28.9578	99.02	
		20	29.7354	102.89	
		20	28.5593	97.01	
300%	9.1547	30	38.3347	97.27	
		30	39.0458	99.64	
		30	38.7920	98.78	

3.9. 胃疡宁丸样品中去甲乌药碱的含量

取不同批次的胃疡宁丸 6 份, 按照步骤 3.2.2 中的方法制备供试品溶液, 按照 3.1 所述的色谱条件, 做 HPLC 谱图, 测定去甲乌药碱含量, 结果如表 2 所示。结果表明, 不同批次的胃疡宁丸中去甲乌药碱的含量均在 9 $\mu\text{g/g}$ 左右, 去甲乌药碱的平均含量为 9.348 $\mu\text{g/g}$ 。

Table 2. Content of Higenamine in Weiyangning pills

表 2. 胃疡宁丸样品中去甲乌药碱的含量

批次	含量测定值($\mu\text{g/g}$)	平均含量($\mu\text{g/g}$)
1	9.033	9.348
2	8.954	
3	10.021	
4	9.624	
5	9.347	
6	9.108	

4. 结果与讨论

本文采用传统的高效液相色谱技术, 建立了胃疡宁丸中去甲乌药碱的含量测定方法。该方法操作简

便, 具有较高的精密度、较好的稳定性和实验可重复性, 可广泛用于其它类中成药中去甲乌药碱含量的测定, 这为中成药有效成分的快速分析和质量控制提供了可选择的、简易且精密度高的分析手段。测定结果表明, 胃疡宁丸中去甲乌药碱含量的平均值为 9.348 $\mu\text{g/g}$, 这说明去甲乌药碱很可能在胃疡宁丸的某些药理活性中起到了非常重要的作用, 例如强心、降血压、抗炎镇痛、抗肿瘤等, 这对于进一步研究胃疡宁丸的多种药理活性至关重要。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. WS3-B-3935-98. 中药成方制剂药品标准. 胃疡宁丸[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药典委员会, 1998.
- [2] 何凤雷, 郑华珠, 石洪超, 等. HPLC 法测定胃疡宁丸中芍药苷的含量[J]. 中国医药导报, 2017, 14(9): 133-135.
- [3] 黄思明, 梁志健, 操红缨, 等. 胃疡宁丸抗炎镇痛的药效研究[J]. 中药与临床, 2015(2): 64-67.
- [4] 许艺飞, 江伟雯, 邝兆进, 等. 胃疡宁丸体内外抗幽门螺杆菌的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014(5): 572-576.
- [5] 刘静, 黄萍, 吴清和, 等. 胃疡宁丸对胃肠运动影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013(10): 283-285.
- [6] 徐晶晶, 黄萍, 吴清和, 等. 胃疡宁丸抗实验性胃溃疡的药效及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 736-739.
- [7] 李诗慧, 何广俊, 卢映, 等. HPLC 法测定胃疡宁丸中乌药醚内酯的含量[J]. 中国医药指南, 2015, 13(6): 32-33.
- [8] 邢梦雨, 田崇梅, 夏道宗. 乌药化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 153-157.
- [9] 韦震鸣, 傅强, 李志樑, 等. 去甲乌药碱对 2 型心肾综合征大鼠心肾的保护作用[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(11): 1830-1833.
- [10] Yang, S., Chu, S., Ai, Q., *et al.* (2020) Anti-Inflammatory Effects of Higenamine (Hig) on LPS-Activated Mouse Microglia (BV2) through NF- κ B and Nrf2/HO-1 Signaling Pathways. *International Immunopharmacology*, **85**, Article ID: 106629. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106629>
- [11] Romeo, I., Parise, A., Galano, A., *et al.* (2020) The Antioxidant Capability of Higenamine: Insights from Theory. *Antioxidants*, **9**, 358. <https://doi.org/10.3390/antiox9050358>
- [12] Yen, C.-C., Tung, C.-W., Chang, C.-W., *et al.* (2020) Potential Risk of Higenamine Misuse in Sports: Evaluation of Lotus Plumule Extract Products and a Human Study. *Nutrients*, **12**, 285. <https://doi.org/10.3390/nu12020285>
- [13] Zhang, Y., Zhang, J., Wu, C., *et al.* (2019) Higenamine Protects Neuronal Cells from Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Injury. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120**, 3757-3764. <https://doi.org/10.1002/jcb.27656>
- [14] Wang, Y., Geng, J., Jiang, M., *et al.* (2019) The Cardiac Electrophysiology Effects of Higenamine in Guinea Pig Heart. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **109**, 2348-2356. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.022>
- [15] 曹艳, 王自正, 王峰, 等. 盐酸去甲乌药碱心肌负荷试验对心率、血压、心肌耗氧量的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2012(17): 1353-1355.
- [16] 宋莉, 贾琦, 周银银, 等. 基于生物大数据库分析并验证附子去甲乌药碱抗肿瘤潜在作用机制[J]. 南京中医药大学学报, 2020(5): 655-660.