

文章编号 1006-8147(2017)03-0277-03

论 著

HPLC 测定复方甘草胶囊浸膏中苦参碱、氧化苦参碱含量

薛茜^{1,3}, 陈虹², 高颖², 赵瑞顺³, 张靖婷³

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.武警后勤学院生药学和药剂学教研室, 天津 300309; 3.武警后勤学院附属医院药材科, 天津 300162)

摘要 目的:建立 HPLC 同时测定复方甘草胶囊中间体浸膏中苦参碱和氧化苦参碱的含量,为制备胶囊提供依据。方法:色谱柱为 Kromasil-NH₂ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-无水乙醇-3%磷酸(80:10:10,V/V/V),流速 1.0 mL/min,检测波长 220 nm,柱温 30 ℃。结果:苦参碱在 5.12~30.72 μg/mL($r=0.999\ 5$),氧化苦参碱在 5.16~30.96 μg/mL($r=0.999\ 5$)浓度范围内与峰面积线性关系良好,苦参碱平均回收率 99.63%,RSD 为 0.62%($n=6$),氧化苦参碱平均回收率 99.81%,RSD 为 0.72%($n=6$)。结论:该方法准确,稳定性好,重复性高,可用于复方甘草胶囊中间体浸膏的质量控制,为胶囊制备提供依据。

关键词 HPLC; 复方甘草胶囊; 苦参碱; 氧化苦参碱; 含量测定

中图分类号 R927.2

文献标志码 A

Determination of contents of matrine and oxymatrine in extraction of compound liquorice capsules by HPLC

XUE Xi^{1,3}, CHEN Hong², GAO Ying², ZHAO Rui-shun³, ZHANG Jing-ting³

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Pharmacognosy and Pharmacy, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China; 3. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of matrine and oxymatrine in extraction of compound Liquorice capsules, and to provide the foundation to prepare capsules. **Methods:** The HPLC was carried out on Kromasil-NH₂ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), and mobile phase was acetonitrile-absolute alcohol-3% phosphoric acid (80:10:10, V/V/V). The flow rate was 1.0 mL/min. Detection wavelength was 220 nm. The temperature of column was 30 ℃. **Results:** The linear ranges of matrine was 5.12 – 30.72 μg/mL ($r=0.999\ 5$), and oxymatrine was 5.16 – 30.96 μg/mL ($r=0.999\ 5$). The average recovery rate of matrine was 99.63% with RSD 0.62% ($n=6$), and oxymatrine was 99.81% with RSD 0.72% ($n=6$). **Conclusion:** This method is accurate, stable and repeatable. It can be used to control the quality of extraction of compound Liquorice capsules, and to provide the basis to prepare capsules.

Key words HPLC; compound liquorice capsules; matrine; oxymatrine; content determination

复方甘草胶囊是止咳平喘类新药,方中含有苦参等多味药材。苦参中含有苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱等多种生物碱及苦参新醇、降苦参醇等黄酮类化合物。苦参具有极强的药理学活性,包括抗菌、抗肿瘤升白细胞、抗炎、抗心律不齐、抗过敏、安定等作用^[1]。研究发现,苦参通过兴奋 β 受体,解除支气管痉挛及抑制抗体和慢反应物质释放而产生平喘作用^[2]。本文通过高效液相法对胶囊成型前的药物浸膏中苦参碱、氧化苦参碱进行含量测定,为制订质量标准摸索出可行的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 SHIMADZU-M20A 型高效液相色谱

基金项目 国家重大新药创新项目基金资助(2012ZX09103201-29)

作者简介 薛茜(1984-),女,中药师,硕士在读,研究方向:药物化学;

通信作者:陈虹, E-mail:chenhongtian06@163.com。

仪,包括 SPD-M20A 二极管阵列检测器、LC-solution 岛津工作站(日本岛津),KQ-500E 超声清洗仪(昆山仪器厂),半微量电子分析天平(梅特勒托利多仪器有限公司)。

1.1.2 试剂 复方甘草胶囊浸膏(自制),苦参碱对照品(中国药品生物制品鉴定所,110805-200508),氧化苦参碱对照品(中国药品生物制品鉴定所,110790-201007),乙腈(天津市康科得科技有限公司,色谱纯),超纯水(自制),其它试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件与系统适应性 色谱柱:Kromasil-NH₂ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-无水乙醇-3%磷酸(80:10:10,V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

1.2.2 溶液的制备

1.2.2.1 对照品溶液:分别精密称取苦参碱、氧化苦

参碱对照品适量置 25 mL 量瓶中,加入乙腈-无水乙醇(80:20,V/V)溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成每毫升含苦参碱 0.051 2 mg、氧化苦参碱 0.051 6 mg 的对照品储备溶液。

1.2.2.2 供试品溶液:取本品制成的冻干粉 0.2 g,研细,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,用氯仿溶解,加氨水调至 pH=10,超声 30 min,放冷,加氯仿补足至刻线,过微孔滤膜,取续滤液做供试品溶液。

1.2.2.3 阴性对照品溶液:取不含苦参的空白制剂制成冻干粉,按 1.2.2.2 项下方法制备阴性对照品溶液。

1.2.3 专属性考察 取阴性对照品溶液、供试品溶液、对照品溶液 10 μ L 分别进样,按 1.2.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。

1.2.4 线性关系考察 分别取 1.2.2.1 项下苦参碱、氧化苦参碱对照品储备液 1、2、3、4、5、6 mL 置 10 mL 量瓶中,加入乙腈-无水乙醇(80:20,V/V)溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成苦参碱、氧化苦参碱的对照品系列溶液,按 1.2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,绘制标准曲线,求出线性范围。

1.2.5 精密度试验 取浓度为 15.36 μ g/mL 的苦参碱对照品溶液和浓度为 15.48 μ g/mL 的氧化苦参碱对照品溶液,按 1.2.1 项下色谱条件,重复进样 5 次,记录苦参碱、氧化苦参碱峰面积

1.2.6 稳定性试验 取 1.2.2.2 项下的供试品溶液,

于配置后 0、2、4、8、10 h 按 1.2.1 项下色谱条件测定,记录苦参碱、氧化苦参碱峰面积。

1.2.7 重复性试验 取同批次浸膏制成的冻干粉按 1.2.2.2 项下方法制成 5 份供试品溶液,按 1.2.1 项下色谱条件测定,记录苦参碱、氧化苦参碱峰面积。

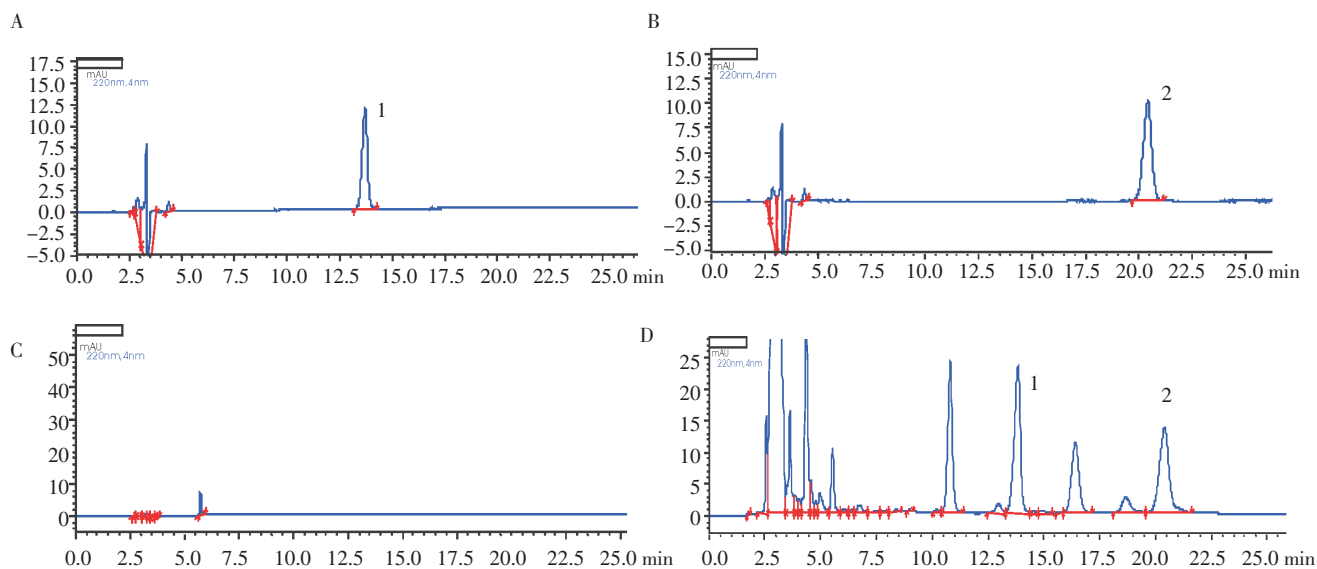
1.2.8 加样回收试验 取同批次已知含量的冻干粉样品,按 1.2.2.2 项下方法制成供试品溶液,精密量取 1 mL,分别加入苦参碱、氧化苦参碱对照品,加入量为样品含量的 80%、100%、120%,每个浓度测定 2 次,记录苦参碱、氧化苦参碱峰面积,计算回收率。

1.2.9 样品含量测定 取 3 批浸膏制成的冻干粉样品,精密称定,按 1.2.2.2 项下方法制成供试品溶液,在 1.2.1 项下色谱条件进样,记录苦参碱、氧化苦参碱峰面积,采用标准曲线法计算样品中苦参碱、氧化苦参碱含量。

2 结果

2.1 色谱条件与系统适应性 结果表明,在 1.2.1 项的色谱条件下,苦参碱保留时间为 13.7 min,氧化苦参碱保留时间为 20.4 min,二者与相邻杂质峰的分离度大于 1.5,理论塔板数以苦参碱计大于 2 000。

2.2 专属性考察结果 供试品中苦参碱、氧化苦参碱保留时间与对照品一致,阴性对照品溶液在对应保留时间处无吸收峰,其他药味对苦参碱、氧化苦参碱的测定无干扰,见图 1。



A.苦参碱对照品;B.氧化苦参碱对照品;C.阴性对照品;D.供试品(1:苦参碱,2:氧化苦参碱)

图 1 复方甘草胶囊高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of the compound liquorice capsules

2.3 线性关系考察结果 以苦参碱、氧化苦参碱溶液浓度为横坐标(X),以对应的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得苦参碱回归方程为 $Y = -4\,190.933 +$

$4\,357.679X$, $r = 0.999\,5$;氧化苦参碱回归方程为 $Y = -3\,415.533 + 5\,329.856X$, $r = 0.999\,5$ 。表明苦参碱在 5.12~30.72 μ g/mL,氧化苦参碱在 5.16~30.96 μ g/mL

浓度范围内,线性关系良好。

2.4 精密度试验结果 苦参碱峰面积 RSD 值为 0.90%($n=5$),氧化苦参碱峰面积 RSD 值为 1.1%($n=5$),表明仪器精密度良好,符合要求。

2.5 稳定性试验结果 苦参碱峰面积 RSD 值为 1.4%($n=5$),氧化苦参碱峰面积 RSD 值为 1.8%($n=5$),表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验结果 供试品中苦参碱平均质量分数为 12.916 9 mg/g, RSD 值为 1.8%($n=5$),氧化苦参碱平均质量分数为 8.519 6 mg/g, RSD 值为 1.7%($n=5$),表明该测定方法重复性良好。

2.7 加样回收试验结果 苦参碱平均回收率为 99.63%, RSD 为 0.62%($n=6$);氧化苦参碱平均回收率为 99.81%, RSD 为 0.72%($n=6$),符合方法学要求(表 1、表 2)。

表 1 苦参碱加样回收率结果($n=6$)

Tab 1 Results of the sample recovery rates of matrine ($n=6$)

样品含量/ mg	加入量/ mg	测得含量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD %
0.127 5	0.102 0	0.229 7	100.20	99.63	0.62
0.127 5	0.102 0	0.228 3	98.82		
0.127 5	0.127 5	0.254 8	99.84		
0.127 5	0.127 5	0.253 9	99.14		
0.127 5	0.153 0	0.281 1	100.39		
0.127 5	0.153 0	0.279 6	99.41		

表 2 氧化苦参碱加样回收率结果($n=6$)

Tab 2 Results of the sample recovery rates of oxymatrine ($n=6$)

样品含量/ mg	加入量/ mg	测得含量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD %
0.086 4	0.069 1	0.155 8	100.43	99.81	0.72
0.086 4	0.069 1	0.154 9	99.13		
0.086 4	0.086 4	0.172 2	99.31		
0.086 4	0.086 4	0.173 1	100.34		
0.086 4	0.103 7	0.190 7	100.58		
0.086 4	0.103 7	0.189 1	99.04		

2.8 样品含量测定结果 见表 3。

表 3 3 批样品冻干粉中苦参碱、氧化苦参碱含量(mg/g)

Tab 3 Contents of matrine and oxymatrine in freeze dried powder from three samples (mg/g)

样品批号	苦参碱质量分数	氧化苦参碱质量分数
20150301	13.043 5	8.971 2
20150302	12.744 8	8.510 4
20150303	12.560 2	8.407 7

3 讨论

3.1 供试品的选择 制备胶囊时需将浸膏处理为冻干粉,对比发现以冻干粉为供试品更易准确称

量,不影响含量测定结果,故以冻干粉作为供试品。冻干粉制备方法为取 100 g 浸膏加 100 mL 无水乙醇,溶解后分 3 次旋蒸至干,冷冻 12 h 后真空干燥,出粉为 57~60 g。

3.2 检测波长的选择 取苦参碱、氧化苦参碱对照品加入乙腈-无水乙醇(80:20, V/V)溶解,在 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描,在 220 nm 处有最大吸收,与药典一致,故测定波长选择 220 nm。

3.3 流动相的选择 参考文献选择乙腈-无水乙醇-3%磷酸(80:10:10)、乙腈-无水乙醇-5%磷酸(80:10:10)、乙腈-无水乙醇-3%磷酸(81:10:9)^[3-5]为流动相,发现乙腈-无水乙醇-3%磷酸(81:10:9)的基线不稳,峰型对称性差,分离度不佳;乙腈-无水乙醇-5%磷酸(80:10:10)虽然峰型较好,但是出峰时间过早而且磷酸量大对色谱柱伤害大,故选择乙腈-无水乙醇-3%磷酸(80:10:10),保留时间适宜,基线平稳,分离度较好,峰型对称。

3.4 供试品的制备 实验发现选择合理的方法制备供试品溶液对测定结果影响也很大。在供试品中加二氯甲烷和氯仿对比,分别碱化至 pH=10,后超声处理 30 min,过滤,取续滤液进液相^[6-8]。结果表明,二氯甲烷对供试品溶解度差,含量损失大而且相邻色谱峰分离不完全,故选择氯仿处理供试品。

本试验建立了同时测定复方甘草胶囊中间体浸膏中苦参碱、氧化苦参碱含量的高效液相法,方法学考察结果符合要求,操作简单、稳定性高、重复性好,回收率高,可用于复方甘草胶囊中间体浸膏的质量控制,为胶囊制备提供依据;也为胶囊成型后,制订质量标准摸索出可行的检测方法。

参考文献:

- [1] 张少少,安银岭,华燕,等.苦参化学成分和药理研究现状[J].中国民族民间医药,2008,8(2):8
- [2] 王俊学,王国俊.苦参碱及氧化苦参碱的药理作用及临床应用[J].肝脏,2000,5(2):116
- [3] 曾以旺,陈燕瑞,王少平,等.HPLC同时测定复方苦参片中苦参碱、氧化苦参碱含量[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(11):40
- [4] 刘军玲.复方苦参注射液含量测定方法研究[J].安徽医药,2011,15(12):1516
- [5] 刘小琴,范华均,黄晓文,等.微波辅助提取高效液相色谱法测定苦参中 5 中生物碱的含量[J].理化实验-化学分册,2012(3):299
- [6] 刘羽.不同产地和不同季节苦参中苦参碱和氧化苦参碱的含量测定[J].山东化工,2016,16(45):72
- [7] 洪世忠.复方苦参注射液中苦参碱和氧化苦参碱的总含量测定[J].中医学报,2015,7(30):1014
- [8] 周俊,彭翠香,范茜茜,等.益母妇宁胶囊中苦参碱、氧化苦参碱的含量测定[J].湖北中医药大学学报,2015,3(17):32

(2016-08-27 收稿)