

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<sup>1,3</sup>, 陈虹<sup>2</sup>, 高颖<sup>2</sup>, 赵瑞顺<sup>3</sup>, 张靖婷<sup>3</sup>

(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-NH<sub>2</sub> 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<sup>1,3</sup>, CHEN Hong<sup>2</sup>, GAO Ying<sup>2</sup>, ZHAO Rui-shun<sup>3</sup>, ZHANG Jing-ting<sup>3</sup>

(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-NH<sub>2</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), and mobil 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 rangers 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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 仪器与试药

#### 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 试药 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-NH<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/mL 的苦参碱对照品溶液和浓度为 15.48  $\mu$ 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。

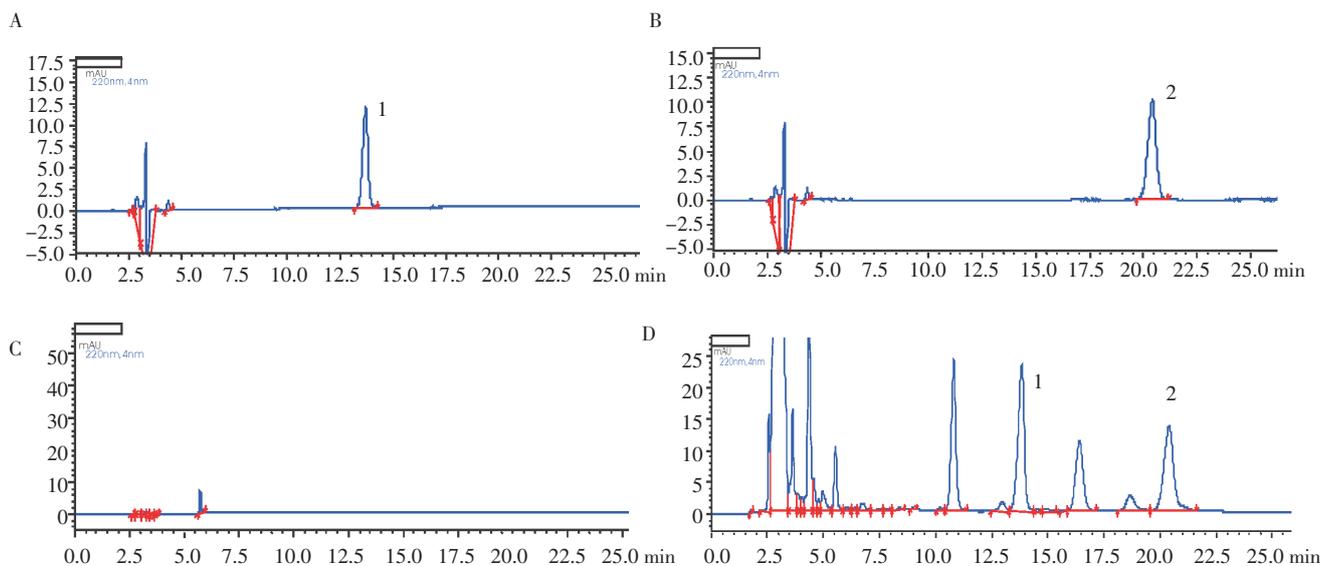
1.2.8 加样回收试验 取同批次已知含量的冻干粉样品,按 1.2.2.2 项下方法制成供试品溶液,精密量取 1 mL,分别加入苦参碱、氧化苦参碱对照品,加入量为样品含量的 80%、100%、120%,每个浓度测定 2 次,记录苦参碱、氧化苦参碱峰面积,计算回收率。

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  $\mu$ g/mL,氧化苦参碱在 5.16~30.96  $\mu$ 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/ %	<i>RSD</i> %
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/ %	<i>RSD</i> %
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)<sup>[3-5]</sup> 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<sup>[6-8]</sup>。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)