

文章编号: 1006-2858(2006) 04-0220-04

RP-HPLC 法同时测定复方苦参注射液 中氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱的含量

吴迪, 梁健, 廉建伟, 张蕾, 陈晓辉, 毕开顺
(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立复方苦参注射液中氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱的含量测定方法。方法 Hypersil ODS2 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水-磷酸(体积比为 10: 00: 30: 00: 65: 00: 0.05, 含 33 mmol·L⁻¹ 的 SDS), 检测波长为 210 nm, 柱温为室温。结果 氧化槐果碱质量浓度在 2.52~50.4 mg·L⁻¹ 内与峰面积呈良好线性关系, $r = 0.999\ 9$ ($n = 6$), 平均回收率为 98.2%, RSD 为 1.8% ($n = 9$); 氧化苦参碱质量浓度在 17.44~174.4 mg·L⁻¹ 内与峰面积呈良好线性关系, $r = 0.999\ 7$ ($n = 6$), 平均回收率为 99.5%, RSD 为 2.2% ($n = 9$); 苦参碱质量浓度在 1.96~39.20 mg·L⁻¹ 内与峰面积呈良好线性关系, $r = 0.999\ 7$ ($n = 6$), 平均回收率为 102.3%, RSD 为 2.0% ($n = 9$)。结论 测定方法可作为复方苦参注射液质量控制方法。
关键词: 复方苦参注射液; 氧化槐果碱; 氧化苦参碱; 苦参碱; 反相高效液相色谱法
中图分类号: R 94 **文献标识码:** A

复方苦参注射液是以苦参 (*Sophora flavescens* Ait.) 和白土茯苓 (*Heterosmilax japonica* Kunth) 组成的处方, 经加工制成的纯中药制剂, 又名岩舒注射液, 收载于卫生部药品标准^[1]。主要有效成分为氧化苦参碱 (oxymatrine OM)、氧化槐果碱 (oxysophocarpine OS)、苦参碱 (matrine M) (结构式见图 1) 和皂苷等。部颁标准采用酸碱滴定法, 测定苦参总碱的含量来控制制剂的质量, 该法的指示终点颜色变化不明显, 滴定误差较大。复方苦参注射液中氧化苦参碱和苦参碱含量测定的方法已有文献报道^[2], 作者在此基础上建立了 RP-HPLC 法, 同时测定注射液中氧化槐果碱、氧化苦参碱、苦参碱的含量。

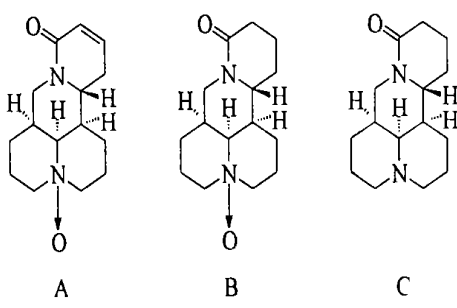


Fig. 1 The structures of oxysophocarpine (A), oxymatrine (B) and matrine (C)

1 仪器与试药

日本岛津 LC-10AD 液相色谱仪, SPD-10A 紫外检测器, CKChromTM 色谱工作站。氧化槐果碱对照品 (批号: 111652-200301)、氧化苦参碱对照品 (批号: 0780-200004) 和苦参碱对照品 (批号: 805-200005) 均购自中国药品生物制品检定所, 复方苦参注射液由山西金晶药业有限公司提供, 甲醇、乙腈和磷酸均为色谱纯, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别取氧化槐果碱对照品约 13 mg, 氧化苦参碱对照品约 22 mg 和苦参碱对照品约 10 mg, 精密称定, 分别置于 25 mL、50 mL 和 100 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (体积比为 10: 90) 溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成含氧化槐果碱 0.504 g·L⁻¹, 氧化苦参碱 0.436 g·L⁻¹ 和苦参碱 0.098 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

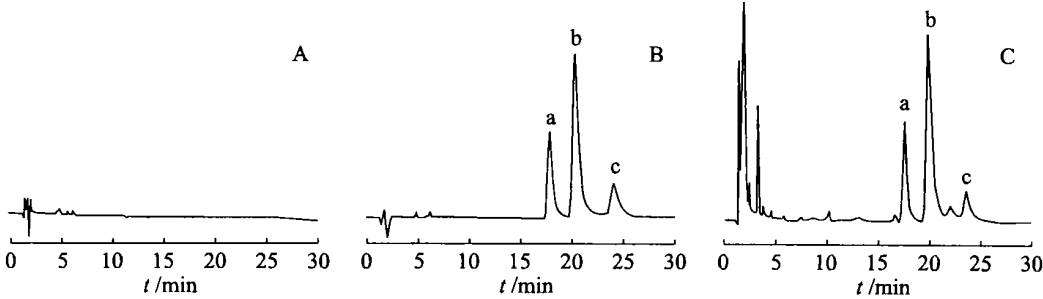
精密量取复方苦参注射液 0.4 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (体积比为 10: 90) 定容至刻

度;再精密量取上述溶液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,用甲醇-水(体积比为 10: 90)定容至刻度,摇匀,备用。

2.3 色谱条件和色谱图

色谱柱: Hypersil ODS2 (200 mm×4. 6 mm,

5 μm, 大连依利特);流动相: 甲醇-乙腈-水-磷酸(体积比为 10. 00: 30. 00: 65. 00 0. 05, 含 33 mmol•L⁻¹的 SDS);流速: 1. 0 mL•min⁻¹;检测波长: 210 nm;柱温: 室温;进样量: 20 μL。在此色谱条件下, 空白样品、对照品和样品的色谱图见图 2。



A—Blank; B—Standard; C—Samples; a—Oxysophocarpine; b—Oxymatrine; c—Matrine

Fig. 2 HPLC chromatograms of oxymatrine in samples

2.4 标准曲线的绘制

分别精密量取氧化槐果碱对照品溶液 0. 1、0. 2、0. 4、0. 8、1. 6、2. 0 mL, 氧化苦参碱对照品溶液 0. 4、0. 8、1. 6、2. 4、3. 2、4. 0 mL, 苦参碱对照品溶液 0. 2、0. 4、0. 8、1. 6、2. 8、4. 0 mL 分别置 6 个 10 mL 量瓶中,用甲醇-水(体积比为 10: 90)溶液稀释并定容至刻度,摇匀。取上述溶液 20 μL 在上述色谱条件下进行分析,以对照品质量浓度 ρ(mg•L⁻¹)为横坐标,峰面积 A 为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,氧化槐果碱质量浓度在 2. 52~50. 40 mg•L⁻¹内线性关系良好,回归方程为 $A = 1. 449 \times 10^4 \rho + 4. 769 \times 10^2$, $r = 0. 999 7 (n = 6)$;氧化苦参碱质量浓度在 17. 44~174. 40 mg•L⁻¹内线性关系良好,回归方程为 $A = 1. 619 \times 10^4 \rho + 4. 899 \times 10^4$, $r = 0. 999 7 (n = 6)$;苦参碱质量浓度在 1. 96~39. 20 mg•L⁻¹内线性关系良好,回归方程为 $A = 1. 752 \times 10^4 \rho - 3. 539 \times 10^3$, $r = 0. 999 7 (n = 6)$ 。

2.5 精密度试验

2.5.1 仪器精密度

精密量取同一复方苦参注射液(批号: 20030505) 0. 4 mL, 按“2. 2”条操作,在上述色谱条件下重复进样 6 次,计算氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱峰面积的 RSD 分别为 1. 1%、0. 7% 和 0. 8%。

2.5.2 方法重复性

分别精密量取同一复方苦参注射液(批号: 20030505) 6 份,每份 0. 4 mL, 按“2. 2”条操作,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,计算氧化槐果

碱、氧化苦参碱和苦参碱峰面积的 RSD 分别为 1. 1%、0. 3% 和 1. 1%。

2.6 回收率试验

精密量取已知含量的复方苦参注射液(批号: 20030505) 9 份,每份 0. 2 mL, 分别精密加入一定量的氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱对照品溶液,按“2. 2”条操作,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,平均回收率结果见表 1。

2.7 样品溶液稳定性试验

取复方苦参注射液样品溶液(批号: 20030507), 按“2. 2”条操作,室温下放置,分别在 1、2、4、8、16、24 h 测定。结果表明: 氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱在 24 h 内稳定性良好, RSD 分别为 2. 6%、1. 5% 和 1. 8%。

2.8 样品测定

取样品溶液, 按“2. 2”条操作,在上述色谱条件下对 13 批复方苦参注射液进行分析,按标准曲线分别计算氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱的含量,结果见表 2, 色谱图见图 2。

3 讨论

a 研究中参考文献方法^[3, 4], 分别以三乙胺和氨水为添加剂,以 H₃PO₄ 为 pH 调节剂,采用离子抑制色谱法对苦参中生物碱类成分进行色谱分离,由于氧化槐果碱和氧化苦参碱结构、极性相似,难以实现基线分离。本法采用离子对色谱法选择性好,样品不需氧化铝小柱或碱化后再萃取等前处理过程,样品可稀释后直接进样分析,操作简便,回收率和精密度都能满足测定要求。但色

Table 1 Recoveries of the HPLC determination($n = 9$)

Sample	$m_{\text{sample}}/\text{mg}$	$m_{\text{added}}/\text{mg}$	$m_{\text{found}}/\text{mg}$	Recovery/ %	$\bar{x}/\%$	RSD/ %
OS	0.971	0.504	0.487	96.5	98.2	1.8
	0.971	0.504	0.483	95.7		
	0.971	0.504	0.495	98.1		
	0.971	1.008	0.986	97.8		
	0.971	1.008	0.972	96.4		
	0.971	1.008	1.006	99.8		
	0.971	1.512	1.524	100.8		
	0.971	1.512	1.506	99.6		
	0.971	1.512	1.494	98.8		
OM	1.940	0.872	0.857	98.3	99.5	2.2
	1.940	0.872	0.875	100.3		
	1.940	0.872	0.863	99.0		
	1.940	1.744	1.695	97.2		
	1.940	1.744	1.707	97.9		
	1.940	1.744	1.694	97.1		
	1.940	2.616	2.687	102.7		
	1.940	2.616	2.688	102.8		
	1.940	2.616	2.632	100.6		
M	0.350	0.196	0.194	99.0	102.3	2.0
	0.350	0.196	0.202	103.1		
	0.350	0.196	0.205	104.6		
	0.350	0.392	0.393	100.3		
	0.350	0.392	0.396	101.0		
	0.350	0.392	0.399	101.8		
	0.350	0.588	0.618	105.1		
	0.350	0.588	0.604	102.7		
	0.350	0.588	0.609	103.6		

Table 2 The results of the content tests ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $n = 3$)

Sample (Batch No.)	$\rho/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$				
	OS	OM	M	$\Sigma(\text{OS} + \text{OM} + \text{M})$	RSD/ %
20030509	5.79	11.38	1.60	18.77	1.0
20030507	5.14	10.14	1.68	16.96	1.4
20030503	5.02	9.93	1.77	16.72	1.6
20030510	5.79	11.33	2.36	19.48	2.0
20030505	4.86	9.70	1.75	16.31	1.7
20030412	4.10	10.22	1.89	16.21	2.2
20030508	5.22	10.21	1.89	17.32	0.8
20020907	2.95	6.68	2.72	12.35	2.1
20020910	3.54	8.13	2.96	14.63	2.3
20021007	4.07	7.83	3.60	15.50	1.5
20020702	3.84	7.55	2.70	14.09	2.1
20010519	2.36	3.99	1.88	8.23	1.7
20011111	3.69	6.95	2.43	13.07	1.3
20010520	2.49	4.63	1.87	8.99	1.0

谱系统平衡需要时间较长,一般为 90 min。

b. 从谱图看,氧化苦参碱和苦参碱仍有拖尾现象,曾试图用三乙胺作扫尾剂,但效果并不明显。从三乙胺扫尾机理考虑,三乙胺通过与固定相的硅醇基结合而起到改善峰形的作用,而用离子对色谱法测定氧化苦参碱和苦参碱时,三乙胺的碱性较强,与流动相中的 H^+ 结合后进而与烷基负离子结合性较强,其与硅醇基的结合因此受到抑制而失去其扫尾作用。

c. 部颁标准中规定,复方苦参注射液中苦参总碱的含量不得低于 $18.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,作者的测定结果表明大部分样品中氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱的含量总和在 $12.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上,是苦参生物碱类成分中主要成分,其含量直接反映其制剂质量的优劣,本文所建立的方法准确、灵敏、重现性好,克服了酸碱滴定法指示终点变化不灵敏,测定结果偏高的缺点。

d. 作者考察了流动相 pH 值和离子对试剂浓

度对组分分离的影响。结果表明, pH 值对保留时间,离子对试剂浓度对分离度影响较显著: pH 值降低,组分保留时间变短,离子对试剂浓度增大,明显改善氧化槐果碱和氧化苦参碱的分离度,综合考虑色谱柱耐受程度确定本文的色谱条件如上所述。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂第十四册 [S]. 1997. 120.
[2] 黄亚非, 张永明, 陶玲, 等. 高效液相色谱法测定肝酶灵注射液中苦参碱的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(6): 343.
[3] 王天勇, 杨文远. 反相高效液相色谱法同时测定苦豆子及其制剂中苦参碱和氧化苦参碱 [J]. 分析测试技术与仪器, 1996, 2(4): 30- 33.
[4] 张蕾, 陈晓辉, 王玺, 等. 离子对 RP-HPLC 法同时测定复方苦参注射液中氧化苦参碱和苦参碱含量 [J]. 中成药, 2004, 126(11): 876- 878.

Simultaneous RP-HPLC determination of oxysophocarpine oxymatrine and matrine in compound kushen injection

WU Di, LIANG Jian, LIAN Jiar wei, ZHANG Lei, CHEN Xiao hui, BI Kai shun
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical Unimversity, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method for simultaneous determination of oxysophocarpine, oxymatrine and matrine in compound kushen injection. **Methods** The column of Hypersil ODS2(4.6 mm×200 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was methanol-acetonitrile-water phosphoric acid(V: V: V: V= 10: 30: 65: 0.05, 33 mmol·L⁻¹ SDS), the detection wavelength was set at 210 nm and the column temperature was 25 °C. **Results** The linear range of oxysophocarpine was 2.52-50.4 mg·L⁻¹, oxymatrine was 17.44-174.4 mg·L⁻¹ and matrine was 1.96-39.20 mg·L⁻¹ respectively. The average recoveries of oxysophocarpine, oxymatrine and matrine were 98.2% with RSD 1.8%, 99.5% with RSD 2.2% and 102.3% with RSD 2.0% (n=9). **Conclusions** The method is accurate, sensitive and suitable for the quality control of compound kushen injection.

Key words: compound kushen injection; oxysophocarpine; oxymatrine; matrine; RP-HPLC