

HPLC 测定丹黄祛瘀片中苦参碱和氧化苦参碱的含量

闵庆璐^{1*}, 王巍², 鞠成国², 尹程鑫³, 陈晓明⁴
(1. 大连美罗大药厂, 辽宁 大连 116036; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;
3. 辽宁成大生物股份有限公司, 沈阳 110179; 4. 大连天宇制药有限公司, 辽宁 大连 116110)

〔摘要〕 目的:建立丹黄祛瘀片中苦参碱和氧化苦参碱的含量测定方法。方法:采用 HPLC, 色谱柱为 Agilent NH₂ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-无水乙醇-3% 磷酸 (82:10:8), 检测波长 220 nm, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:苦参碱和氧化苦参碱的线性范围分别为 0.385~2.31 ($r=0.999\ 6$) 和 0.021 8~0.239 8 ($r=0.999\ 2$) μg; 平均加样回收率分别为 99.0% (RSD 0.85%, $n=6$), 97.2% (RSD 1.0%, $n=6$)。结论:该法简便, 快速, 结果准确, 重复性好, 可用于控制丹黄祛瘀片的质量。

〔关键词〕 丹黄祛瘀片; 苦参碱; 氧化苦参碱; 高效液相色谱法
〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)01-0060-03

Determination of Contents of Matrine and Oxymatrine in Danhuangquyu Tablets by HPLC

MIN Qing-lu^{1*}, WANG Wei², JU Cheng-guo², YIN Cheng-xin³, CHEN Xiao-ming⁴
(1. Dalian Merro Pharmaceutical Factory, Dalian 116036, China;
2. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;
3. Liaoning Chengda Biotechnology Co., Ltd., Shenyang 110179, China;
4. Dalian Tianyu Pharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116110, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of matrine and oxymatrine in Danhuangquyu tablets. **Method:** An Agilent NH₂ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-absolute ethyl alcohol-3% phosphoric acid (82:10:8), the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 30 ℃ and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Matrine showed a good linear relationship at the range of was 0.385-2.31 μg ($r=0.999\ 6$), the average recovery was 99.0%, RSD 0.85% ($n=6$); Oxymatrine showed a good linear relationship at the range of was 0.021 8-0.239 8 μg ($r=0.999\ 2$), the average recovery was 97.2%, RSD 1.0% ($n=6$). **Conclusion:** The method is accurate and reliable, and it can be used for the quality control of Danhuangquyu tablets.

〔Key words〕 Danhuangquyu tablets; matrine; oxymatrine; HPLC

丹黄祛瘀片是由黄芪、丹参、苦参等 20 味中药经提取加工而成, 具有活血止痛, 软坚散结之功效, 用于气虚血瘀、痰湿凝滞引起的慢性盆腔炎, 症见白带增多者。方中苦参主要含有苦参碱和氧化苦参碱等生物碱类成分, 具有一定的抗炎作用^[1]。为保证制剂的内在质量, 本试验采用高效液相色谱^[2-7]法, 测定苦参碱和氧化苦参碱的含量, 为该制剂临床用药的安全性和有效性提供实验依据。

1 材料
1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱系统 (美国安捷伦科技公司), 配有四元泵, 在线脱气机, 紫外检测器。FA1004B 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), AS3120B 型超声波清洗器 (天津奥特赛

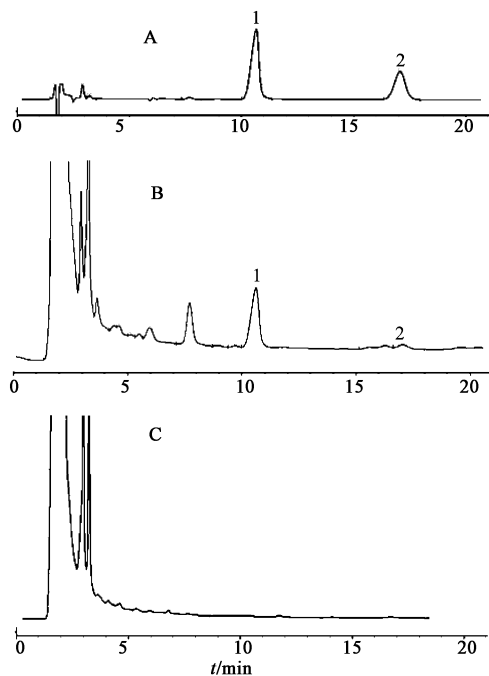
〔收稿日期〕 20110216(003)
〔通讯作者〕 * 闵庆璐, 从事中药制药, E-mail: qlmin-982000@126.com

恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药 丹黄祛瘀片由大连天山药业有限公司(批号 090301, 090302, 090303, 090901, 090902, 090903);组方中各药材均购自大连阳光大药房。苦参碱(批号 110780-200506)、氧化苦参碱(批号 110805-200508)购自沈阳市药检所。乙腈为色谱纯,美国 TEDIA 天地试剂公司生产,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 Agilent NH₂ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-无水乙醇-3%磷酸(82:10:8),检测波长 220 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。在此条件下,样品中苦参碱和氧化苦参碱与相邻组分分离度良好。理论塔板数按苦参碱计算,不低于2 000。见图 1。



1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱; A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性

图3 丹黄祛瘀片色谱

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取干燥至恒重的苦参碱和氧化苦参碱适量,加乙腈-无水乙醇(80:20)制成质量浓度分别为 0.385, 0.218 g·L⁻¹的溶液作为贮备液,精密吸取苦参碱贮备液 5 mL 和氧化苦参碱贮备液 1.5 mL 至 10 mL 量瓶中,加乙腈-无水乙醇(80:20)定容至刻度,得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取丹黄祛瘀片(批号 090302) 2 g,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液 1 mL,三氯甲烷 30 mL,超声处理 30 min,滤

过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇适量使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,以无水乙醇定容至刻度,作为供试品溶液。

2.4 阴性干扰试验 取方中去除苦参的各药味,按处方比例及制备工艺制得空白样品,取该空白样品按 2.3 项下方法操作,制备阴性对照液。精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪测定,结果表明阴性液无干扰。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围考察 将氧化苦参碱贮备液稀释 10 倍,得氧化苦参碱稀释液,精密吸取苦参碱贮备液和氧化苦参碱稀释液各 1, 3, 5, 7, 9, 11 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下条件测定。以对照品进样量为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,分别进行线性回归。结果苦参碱的回归方程为 $Y = 320.16X - 2.66$ ($r = 0.9996$),表明苦参碱在 0.385 ~ 2.31 μg 进样量与色谱峰面积线性关系良好;氧化苦参碱的回归方程为 $Y = 471.85X - 0.371$ ($r = 0.9992$),表明苦参碱在 0.021 8 ~ 0.239 8 μg 进样量与色谱峰面积线性关系良好。

2.5.2 精密度考察 精密吸取供试品溶液(批号 090302) 10 μL,重复进样 6 次,分别记录苦参碱和氧化苦参碱的色谱峰面积,计算 RSD 分别为 0.86%, 1.9%。表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性考察 将供试品溶液(批号 090302)分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,记录苦参碱和氧化苦参碱的色谱峰面积,计算 RSD,分别为 1.0%, 1.7%。表明 10 h 内测定,样品稳定性良好。

2.5.4 重复性考察 取丹黄祛瘀片(批号 090302) 6 份,每份 2 g,按供试品溶液制备方法操作,并测定,分别计算苦参碱和氧化苦参碱的平均含量及相应的 RSD 值。结果苦参碱平均含量为 1.106 mg·g⁻¹,氧化苦参碱平均含量为 0.085 11 mg·g⁻¹,RSD 分别为 1.2%, 2.3%。表明方法重复性良好。

2.5.5 回收率考察 取丹黄祛瘀片(批号 090302) 6 份,每份 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别以微量移液器加入苦参碱贮备液 3 mL 和氧化苦参碱贮备液 400 μL,其余按供试品溶液制备方法操作,精密吸取供试品溶液 10 μL 进行测定,计算回收率,结果表明苦参碱和氧化苦参碱的回收率均在 95.0% ~ 105.0%,RSD 亦符合相关规定。结果见表 1。

表 1 丹黄祛瘀片苦参碱氧化苦参碱加样回收试验

成分	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
苦参碱	1. 113	1. 155	2. 263	99. 6	99. 0	0. 85
	1. 110	1. 155	2. 250	98. 7		
	1. 112	1. 155	2. 260	99. 4		
	1. 113	1. 155	2. 244	97. 9		
	1. 116	1. 155	2. 251	98. 3		
	1. 114	1. 155	2. 270	100. 1		
氧化苦参碱	0. 085 6	0. 087 2	0. 169 2	95. 9	97. 2	1. 0
	0. 085 4	0. 087 2	0. 170 2	97. 2		
	0. 085 6	0. 087 2	0. 171 0	97. 9		
	0. 085 7	0. 087 2	0. 170 7	97. 5		
	0. 085 9	0. 087 2	0. 169 8	96. 2		
	0. 085 7	0. 087 2	0. 171 5	98. 4		

2.6 样品含量测定 取 6 批丹黄祛瘀片(批号 090301,090302,090303,090901,090902,090903),按试验所建立的方法测定苦参碱和氧化苦参碱的含量,结果见表 2。

表 2 6 批丹黄祛瘀片含量测定 mg·g⁻¹

批号	苦参碱	氧化苦参碱
090301	1. 112	0. 091 23
090302	1. 106	0. 085 11
090303	1. 109	0. 088 33
090901	1. 088	0. 080 22
090902	1. 079	0. 078 94
090903	1. 093	0. 081 01
平均值	1. 098	0. 084 14

3 讨论与结论

3.1 供试品溶液制备方法考察 参照《中国药典》中苦参的含量测定方法^[2]制备供试品溶液,过中性氧化铝柱后,氧化苦参碱检测不到,因此试验中取浓氨试液-三氯甲烷提取液直接进行 HPLC 测定,结果苦参碱、氧化苦参碱均能达到足够的灵敏度,且与相邻组分均分离良好,可以用于定量检测。试验中,对超声提取和回流提取的效果进行了比较,结果两者无显著差别,为了操作简便,故采用超声提取法制备供试品溶液。另外,制剂中氧化苦参碱含量较低,可能与方中苦参经过水煎煮提取有关。

3.2 色谱条件考察 试验中,采用 Agilent C₁₈ 柱,以乙腈-无水乙醇-3% 磷酸不同配比及甲醇-乙腈-3% 磷酸不同配比等多个洗脱系统进行试验,均出现

色谱峰对称因子达不到要求的问题。后又以 Agilent NH₂ 柱,乙腈-无水乙醇-3% 磷酸不同配比进行试验,最后确定在乙腈-无水乙醇-3% 磷酸(82:10:8)系统下,苦参碱、氧化苦参碱峰形对称,与相邻组分均分离良好。

本试验以苦参碱和氧化苦参碱为指标,建立 HPLC 含量测定方法,经方法学验证,表明该方法重复性好、精密度高、样品稳定性好,回收率符合要求,因此可以用于本制剂的质量控制。

[参考文献]

[1] 刘雪花. 苦参生物碱的药理研究进展[J]. 中国实用医药,2009,4(14):232.

[2] 中国药典. 一部[S]. 2010:188.

[3] 周玉枝,原红霞. HPLC 法测定苦参浸膏中苦参碱和氧化苦参碱含量[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(4):315.

[4] 张成颖,弥宏,赵宏峰,等. HPLC 测定前列康泰胶囊中的苦参碱与氧化苦参碱[J]. 华西药学杂志,2010,25(4):476.

[5] 胥爱丽,毕晓黎,张建军,等. 重参消炎胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(12):13.

[6] 陈大中,赵润琴. 高效液相色谱法测定艾愈片中苦参碱和氧化苦参碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(3):20.

[7] 邵彩云,巴图德力根,韩志强. 高效液相色谱法测定蒙药达如奇颗粒中苦参碱和氧化苦参碱含量[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(2):251.

[责任编辑 蔡仲德]