以离子液体作流动相添加剂的高效液相色谱法 测定复方苦参注射液中 4 种生物碱

亓 亮, 张 婧, 张志琪*

(药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西师范大学, 陕西 西安 710062)

摘要:将离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([BMIM]BF₄)作为流动相添加剂建立了同时测定复方苦参注射液中 4 种主要生物碱的 HPLC 分析方法。以 Agilent TC-C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)为分离柱, 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(含 2.2×10^{-4} mol/L [BMIM]BF₄)(5:95, v/v)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL, 在 205 nm 下检测。结果表明, 苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱以及氧化苦参碱的质量浓度分别在 25.8 ~ 155.0 mg/L, 40.0 ~ 240.0 mg/L, 21.7 ~ 130.0 mg/L 和 37.5 ~ 225.0 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 0, 平均回收率($n=9$) 在 96.2% 和 98.9% 之间。离子液体的加入能明显改善 C18 柱分离生物碱的色谱峰形并提高分离度。本法简便、快速、重复性好, 可用于复方苦参注射液中生物碱的分离与测定。

关键词:离子液体; 流动相添加剂; 高效液相色谱法; 生物碱; 苦参; 复方苦参注射液

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)03-0249-05

Determination of four alkaloids in Compound Kushen Injection by high performance liquid chromatography with ionic liquid as mobile phase additive

QI Liang, ZHANG Jing, ZHANG Zhiqi*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural
Pharmaceutical Chemistry, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: In order to improve the resolution and peak shape, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([BMIM]BF₄) was used as mobile phase additive to develop an HPLC method for the determination of four main alkaloids in Compound Kushen Injection. An Agilent TC-C18 column was used with the mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (containing 2.2×10^{-4} mol/L [BMIM]BF₄)(5:95, v/v), flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 ℃, and injection volume of 20 μL, detected at 205 nm. The calibration curves of matrine, sophoridine, oxymatrine and oxysophocarpine were in good linearity over the ranges of 25.8 – 155.0 mg/L, 40.0 – 240.0 mg/L, 21.7 – 130.0 mg/L and 37.5 – 225.0 mg/L, respectively, with correlation coefficients above 0.999 0. The mean recoveries ($n=9$) were between 96.2% and 98.9%. Ionic liquid, [BMIM]BF₄, can obviously improve the resolution and peak shape. The method is simple, rapid, and reliable, and can be used for the determination of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait in Compound Kushen Injection.

Key words: ionic liquid; additive in mobile phase; high performance liquid chromatography (HPLC); alkaloids; *Sophora flavescens* Ait; Compound Kushen Injection

离子液体是近年来发展起来的一种由有机阳离子(季铵盐离子、咪唑盐离子和吡咯盐离子等)和无机阴离子(卤素离子、四氟硼酸根离子和六氟磷酸

根离子等)组成的绿色溶剂。因其独特的性能,如较低的熔点、可调节的路易斯酸度、良好的导电性、宽的电化学窗口、特殊的溶解性、可忽略的蒸汽压、

* 通讯联系人. E-mail: zqzhang@snnu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21275098).

收稿日期: 2012-11-12

环境友好等,其应用领域逐渐被拓宽^[1]。当应用反相色谱柱如 C18 柱分离极性化合物时,由于固定相中除了 C₁₈ 长链外,还有填料键合时残余的硅醇基,少量样品分子与硅醇基之间产生静电作用而被推迟洗脱出来,常常导致样品分子的浓度发生变化,从而产生拖尾。He 等^[2]将离子液体加入到流动相中,用于麻黄碱的分离,结果表明低浓度的离子液体能显著抑制样品分子与硅醇基之间的相互作用,改善峰形。Zhang 等^[3]以离子液体为添加剂实现了儿茶酚胺类物质的良好分离,Ruiz-Angel 等^[4]也证明低浓度离子液体的加入,能够改善 β -阻断剂的分离效果。

复方苦参注射液由苦参和白土苓组成,其主要成分为苦参生物碱如苦参碱、槐定碱、氧化苦参碱和氧化槐果碱(结构见图 1)以及皂苷等。苦参生物碱有相似的喹啉啶类结构,具有平喘、消炎抗菌和抗肿瘤等生物活性。复方苦参注射液具有清热利湿,凉血解毒,散结止痛的功效,用于癌症疼痛的出血,可以作为中医药中的生物反应调节剂,成为中晚期恶性肿瘤的有效治疗药物^[5]。我国部颁标准采用酸碱滴定法通过测定苦参总碱的含量来控制制剂的质量,但该法终点颜色变化不明显,测定误差较大。近年来,建立了多种利用高效液相色谱同时测定生物碱的方法^[6-16],但对结构相似的多种组分的测定分离效果较差。本文选择 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([BMIM]BF₄)离子液体作为流动相添加剂,旨在提高分离度、改善峰形,建立同时测定复方苦参注射液中 4 种主要生物碱的 HPLC 分析方法。

图 1 (a) 苦参碱、(b) 槐定碱、(c) 氧化苦参碱和 (d) 氧化槐果碱的结构

Fig. 1 Chemical structures of (a) matrine, (b) sophoridine, (c) oxymatrine and (d) oxysophocarpine

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津系列高效液相色谱仪,包括 LC-10AT 单元泵和 SPD-10AT 检测器。

对照品苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱以及氧化苦参碱均购自天津一方科技有限公司;复方苦参注射液购于门诊药房(规格:5 mL × 5 支,山西振东制药

股份有限公司生产,批号为 20120215, 20120302, 20120304); [BMIM]BF₄ 离子液体由中科院兰州化学物理研究所提供;甲醇为色谱纯(美国 Spectrum 公司),实验用水由 Millipore 纯水机制得,其余试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(含 2.2×10^{-4} mol/L [BMIM]BF₄)(5: 95, v/v); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 205 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

1.3 标准溶液的配制

精确称取对照品苦参碱 3.1 mg, 槐定碱 4.8 mg, 氧化槐果碱 2.6 mg 和氧化苦参碱 4.5 mg, 同置于 10 mL 容量瓶中, 加磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 7.4)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品储备液, 使用时用磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 7.4)适当稀释。

1.4 供试品溶液的配制

精确量取复方苦参注射液 0.3 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 7.4)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择

对于生物碱的分离,文献多采用氨基柱^[8-12]进行,分离效果较好,也有以反相 C18 柱^[13-16]进行分离的报道。采用 C18 柱时,常以甲醇-水溶液或乙腈-水溶液为流动相,且多以三乙胺或氨水为添加剂将水相 pH 值调至 8.0 及以上^[13-15],此外也有文献使用多相溶剂作为流动相^[16]。本文选择 Agilent TC-C18 柱(pH = 2-8 适用)进行分离,首先分别在 pH 2.4、2.8、3.5、4.9、5.4、5.9 和 7.0 水相中加入不同量的甲醇进行试验,结果发现以 0.1% 磷酸水溶液(pH 2.4)洗脱效果最好,原因可能是在偏酸性条件时硅醇基以分子形式存在,从而可以减弱与生物碱极性基团的静电作用;随着甲醇量加大,生物碱保留值降低,分离度变差。亦曾尝试以乙腈作为有机相,发现比甲醇作为有机相时出峰更快,分离度也更差。因此,选择甲醇与 0.1% 磷酸水溶液按 5: 95 的体积比混合作为流动相,等度洗脱。

2.1.2 离子液体对分离的影响

在上一节所述流动相条件下,4 个组分的峰形仍不对称,且分离度仍较差,苦参碱与槐定碱没有达

到基线分离。为进一步改善分离效果,选择以 $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ 离子液体为流动相添加剂,考察了不同浓度的该离子液体对分离效果的影响。在 0.1% 磷酸水溶液中,分别在流动相水相中加入浓度为 0、 5.6×10^{-5} 、 1.8×10^{-4} 、 2.2×10^{-4} 和 3.4×10^{-4} mol/L 的 $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$,在流速 1.0 mL/min、柱温 30 ℃ 条件下进行试验,4 个目标组分的混合对照品溶液的色谱图见图 2a~e。由图 2 可以看出,与图 2a 相比,当加入 5.6×10^{-5} mol/L 的离子液体时,分离效果及峰形就有明显改善;随着离子液体浓度的增大,分离度进一步得到改善,但同时溶剂峰也明显增大;当离子液体浓度达到 2.2×10^{-4} mol/L 时,4 个组分达到最好的分离效果;进一步增大离子液体浓度,由于 $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ 在检测波长下有很强的紫外吸收,背景吸收逐渐升高,使样品吸收相对减弱,各组分峰强度呈现出降低的趋势。

离子液体 $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ 的加入之所以能够改善生物碱的分离效果,首先是因其能够在流动相中电离为咪唑阳离子和 BF_4^- 阴离子。咪唑阳离子能够与硅醇基反应,与生物碱的极性基团竞争硅醇基,因此,能够有效地对残余的硅醇基进行屏蔽;同时,最初随着离子液体浓度升高,咪唑阳离子与硅醇基之间的静电作用以及与烷基之间的疏水作用逐渐增强,从而增加了固定相的含碳量,使生物碱的保留增加^[2]。此外, BF_4^- 是离液序列比较高的阴离子,能够与生物碱阳离子形成离子对,进而被固定相所吸附,也可以增大生物碱的保留^[4]。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围

精确吸取混合生物碱对照品储备液 1 mL,分别稀释 2、4、6、8、12 倍,得到含苦参碱(25.8、38.8、51.7、77.5、155.0 mg/L)、槐定碱(40.0、60.0、80.0、120.0、240.0 mg/L)、氧化槐果碱(21.7、32.5、43.3、65.0、130.0 mg/L)以及氧化苦参碱(37.5、56.3、75.0、112.5、125.0 mg/L)的对照品溶液,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别取续滤液 20 μL 按 1.2 节色谱条件进样,以质量浓度为横坐标(X),峰面积值为纵坐标(Y)进行线性回归,得苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱的回归方程及线性相关系数分别为: $Y = 11\,470X + 80\,226$, $r = 0.999\,2$; $Y = 8\,294.9X + 96\,510$, $r = 0.999\,0$; $Y = 11\,047X + 140\,491$, $r = 0.999\,4$; $Y = 12\,596X + 140\,123$, $r = 0.999\,0$ 。线性范围分别为 25.8 ~ 155.0 mg/L, 40.0 ~ 240.0 mg/L, 21.7 ~ 130.0 mg/L 和 37.5 ~ 225.0 mg/L。

图 2 流动相中 $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ 浓度不同时混合对照品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of a standard mixture with mobile phases containing different concentrations of $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$

a. 0; b. 5.6×10^{-5} mol/L; c. 1.8×10^{-4} mol/L; d. 2.2×10^{-4} mol/L; e. 3.4×10^{-4} mol/L.

1. matrine; 2. sophoridine; 3. oxymatrine; 4. oxysophocarpine.

2.2.2 重复性

精确吸取 1.3 节混合对照品储备液,稀释 2 倍后在上述色谱条件下重复进样 6 次,记录色谱峰面积。计算得苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱的相对标准偏差(RSD)分别为 1.9%、2.6%、2.2% 和 1.6%,说明系统重复性良好。

2.2.3 稳定性

取同一供试品溶液,分别按 0、2、4、8、12 h 时间间隔进样,测定色谱峰峰面积,计算得苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱峰面积的 RSD 分别为 2.2%、2.8%、1.9%、2.5%,表明常温保存下样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.4 准确性

取同一注射液样品 5 份,按 1.4 节方法制备供试品溶液,进行测定后记录各组分峰面积,以 2.2.1 节回归方程计算样品中各生物碱的含量。苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱含量的 RSD 分别为 2.8%、3.4%、3.3%、1.8%。

2.2.5 加标回收率试验

吸取已知含量的注射液样品,按低、中、高浓度精确加入适量苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱,按同样方法制备供试品溶液,每种供试品溶液平行制备 3 份,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别取续滤液 20 μL 测定 4 种物质的含量,计算回收率和 RSD,结果见表 1。

表 1 4 种生物碱在样品中的加标回收率 (n=3)
Table 1 Recoveries of the four alkaloids in a sample (n=3)

Compound	Background/ mg	Added/ mg	Recovery/ %	RSD/ %
Matrine	0.897	0.7	97.3	2.3
		0.9	99.2	1.9
		1.2	100.2	2.6
Sophoridine	0.645	1.1	99.6	2.9
		2.0	97.6	0.4
		2.9	98.8	2.5
Oxymatrine	1.247	1.0	95.2	2.6
		1.2	96.4	2.6
		1.5	95.4	2.8
Oxysophocarpine	2.789	2.1	95.8	2.3
		2.5	97.2	2.2
		2.9	95.6	2.9

2.3 样品测定

精确吸取复方苦参注射液,按 1.4 节下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定 4 种生物碱的含量,样品色谱图见图 3,4 种生物碱含量测定结果见表 2。

表 2 复方苦参注射液样品中 4 种生物碱的含量 (n=3)
Table 2 Contents of the four alkaloids in Compound Kushen Injection samples (n=3)

Batch No.	Matrine/(g/L)	Sophoridine/(g/L)	Oxymatrine/(g/L)	Oxysophocarpine/(g/L)
20120215	1.793 ± 0.050	1.393 ± 0.067	2.494 ± 0.082	5.578 ± 0.100
20120302	2.217 ± 0.064	1.989 ± 0.042	2.363 ± 0.111	7.384 ± 0.192
20120304	2.241 ± 0.036	2.082 ± 0.087	2.349 ± 0.103	7.493 ± 0.217

图 3 复方苦参注射液样品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a Compound Kushen Injection sample

Concentration of [BMIM]BF₄: 2.2 × 10⁻⁴ mol/L.

1. matrine; 2. sophoridine; 3. oxymatrine; 4. oxysophocarpine.

3 结论

本文在分离苦参生物碱常用流动相(甲醇-水溶液)基础上,将离子液体[BMIM]BF₄作为流动相添加剂,建立了利用 C18 柱(pH = 2 ~ 8 适用)的高效液相色谱法同时测定复方苦参注射液中 4 种主要生

物碱的分析方法。与常用分析方法以三乙胺或氨水为添加剂相比,以离子液体作添加剂可采用普通 C18 柱分析,无需采用氨基柱或适用于碱性范围的特殊 C18 柱。该法简便、快速、重复性好,亦有望用于其他含有苦参生物碱的药物制剂分析。尽管本文目标化合物的最大吸收波长与所用咪唑盐离子液体吸收光谱重叠,使离子液体的加入量受到限制,其作用未能完全体现,但加入低浓度的离子液体仍对分离苦参生物碱的色谱峰形有明显改善、提高了分离度,提示离子液体在改善极性化合物尤其是碱性物质的色谱分离方面有着重要意义和潜在应用价值。

参考文献:

[1] Yu M J, Hang D, Cao Y H. Chinese Journal of Chromatography (余美娟, 杭栋, 曹玉华. 色谱), 2011, 29(2): 131
[2] He L J, Zhang W Z, Zhao L, et al. J Chromatogr A, 2003, 1007: 39
[3] Zhang W Z, He L J, Gu Y L, et al. Anal Lett, 2003, 36(4): 827
[4] Ruiz-Angel M J, Carda-Broch S, Berthod A. J Chromatogr A, 2006, 1119: 202
[5] Zhang W J, Hai L N, Lian Z L. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine (张文谨, 海丽娜, 连增

- 林. 中国中医药信息杂志), 2012, 19(8): 101
- [6] Shen Y, Han C, Liu C P, et al. Chinese Journal of Chromatography (沈燕, 韩超, 刘翠平, 等. 色谱), 2011, 29(2): 176
- [7] Kang X Q, Fan Z C, Zhang Z Q. J Chromatogr Sci, 2010, 48: 860
- [8] Jin R Y, Liao X M, Luo Z S, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (靳如义, 廖雪梅, 罗忠圣, 等. 药物分析杂志), 2008, 28(2): 297
- [9] Song X L, Xu Y Y. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (宋小莉, 徐颖颖. 药物分析杂志), 2007, 27(10): 1604
- [10] Geng G X, Sun Y H, Xiang B, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (耿革霞, 孙英华, 向柏, 等. 药物分析杂志), 2006, 26(5): 671
- [11] Xia X L. China Pharmacy (夏学励. 中国药房), 2009, 20(18): 1420
- [12] Ye X J, Song F Y. China Pharmacy (叶秀金, 宋粉云. 中国药房), 2011, 22(12): 1127
- [13] Liu G Q, Dong J, Wang H, et al. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54(5): 1065
- [14] Mao D, Chen K, Wang K, et al. Chinese Traditional Patent Medicine (毛丹, 陈珂, 王柯, 等. 中成药), 2011, 33(9): 1531
- [15] Liu X Q, Fan H J, Huang X W, et al. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis) (刘小琴, 范华均, 黄晓文, 等. 理化检验-化学分册), 2012, 48(3): 299
- [16] Xiang B, Sun Y H, Zhang Y, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (向柏, 孙英华, 张媛, 等. 中草药), 2005, 36(12): 1813