

星点设计-效应面法优化苦参碱氯化钠注射液有关物质检查方法

顾小燕^{1,2}, 狄斌², 陈民辉¹, 李耕¹, 黄青¹, 严菲^{1*}, 曹玲^{1*} (1.江苏省药品监督管理局检验研究院, 南京 210019; 2.中国药科大学, 南京 211198)

摘要: 目的 采用星点设计-效应面法优化苦参碱氯化钠注射液有关物质检查的色谱条件。方法 以流动相 pH、乙腈比例和柱温为考察因素, 以保留时间、分离度以及理论板数为考察指标, 进行标准归一化和多元线性回归, 运用效应面法获取最优色谱条件并进行方法学验证。结果 确定了最优色谱条件, 流动相为 0.2% 的三乙胺溶液(磷酸调节 pH 值至 6.5)-乙腈(90 : 10), 柱温为 40 ℃。结论 星点设计-效应面法优选出的色谱条件可用于苦参碱氯化钠注射液的有关物质检查, 且方法准确度高、重复性好。

关键词: 星点设计-效应面法; 高效液相色谱法; 苦参碱氯化钠注射液; 有关物质

中图分类号: R927.11 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)03-0358-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.012

引用本文: 顾小燕, 狄斌, 陈民辉, 等. 星点设计-效应面法优化苦参碱氯化钠注射液有关物质检查方法[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 358-363.

Optimization for the Method of Related Substances Determination of Matrine and Sodium Chloride Injection by Central Composite Design-response Surface Method

GU Xiaoyan^{1,2}, DI Bin², CHEN Minhui¹, LI Geng¹, HUANG Qing¹, YAN Fei^{1*}, CAO Ling^{1*} (1. Jiangsu Institute of Food and Drug Control, Nanjing 210019, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the chromatographic conditions for detecting related substances of Matrine and Sodium Chloride Injection by using central composite design-response surface method. **METHODS** The pH of the mobile phase, the proportion of acetonitrile in the mobile phase and the column temperature were taken as investigation factors, and the retention time, resolution and the number of theoretical plates served as inspection indexes. The study carried out standard normalization and multiple linear regression, and used response surface method to obtain optimal chromatographic conditions. The methodology was verified. **RESULTS** The optimal chromatographic conditions were determined, the mobile phase was 0.2% triethylamine aqueous solution (adjusted pH to 6.5 with phosphoric acid)-acetonitrile (90 : 10), and the column temperature was 40 ℃. **CONCLUSION** The chromatographic conditions optimized by central design-response surface method can be used for the determination of related substances in Matrine and Sodium Chloride Injection. The method has high accuracy and good repeatability.

KEYWORDS: central composite design-response surface method; HPLC; Matrine and Sodium Chloride Injection; related substance

苦参碱是苦参的主要活性成分之一, 属喹啉里西啶类生物碱, 具有抗炎、抗病毒、免疫调节和抗肿瘤等药理作用^[1], 主要以苦参碱氯化钠注射液应用于临床。苦参碱氯化钠注射液在各国药典中均未收载, 现行标准为国家药品监督管理局国家药品标准 WS₁-(X-018)-2006Z-2011, 有关物质检查采用 HPLC, 仅控制杂质总量。苦参中存在多种苦参类生物碱, 含量较高的有苦参碱的同分异构体槐定碱、氧化产物氧化苦参碱、脱氢产物槐果碱以及槐果碱的氧化产物氧化槐果碱等^[2-3]。因其与苦参碱具有类似的结构和性质, 在生产过程中难以分离, 故本研究拟确定槐定碱、氧化苦参碱、槐果碱和

氧化槐果碱为苦参碱氯化钠注射液中潜在的已知杂质, 上述 4 种杂质在现行标准色谱条件下不能完全分离。

星点设计-效应面法是一种多因素五水平的数学统计学实验设计方法, 常用于制剂的处方筛选和中药有效成分的提取等药学实验领域, 具有实验次数少、精度高等优点^[4-6], 目前尚未见其用于 HPLC 测定有关物质色谱条件的优化。本实验首次采用星点设计-效应面法优化苦参碱氯化钠注射液有关物质的 HPLC 条件, 建立了数学模型并分析各因素之间的相互作用, 结果置信度和拟合度较好, 预测值和真实值接近, 为科学修订苦参碱氯

作者简介: 顾小燕, 女, 硕士生 E-mail: 1174937648@qq.com
严菲, 女, 硕士, 副主任药师 E-mail: 37931658@qq.com

*通信作者: 曹玲, 女, 博士, 主任药师 E-mail: clide@sina.com

化钠注射液中有有关物质的测定方法提供参考。

1 仪器与试剂

LC-30AD 高效液相色谱仪、PDA 检测器均购自日本岛津公司；Waters Xbridge C₁₈ 色谱柱(4.6 mm× 250 mm, 5 μm)；CPA225D 型电子天平(德国赛多利斯公司)；DHG-9041A 电热恒温干燥箱(精宏实验设备公司)。

苦参碱对照品(批号：110805-202010；含量：98.7%)、氧化苦参碱对照品(批号：110780-201508；含量：92.5%)、槐定碱对照品(批号：110784-201706；含量：98.8%)和氧化槐果碱对照品(批号：111652-200301；含量：100%)均购自中国食品药品检定研究院；槐果碱对照品(上海安谱实验科技股份有限公司，批号：X3420010；含量：98.17%)；苦参碱氯化钠注射液由 A、B、C 企业提供；苦参碱原料药和辅料氯化钠均由 D 企业提供；三乙胺和磷酸为分析纯，均购自国药集团化学试剂有限公司；乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的优选

2.1.1 星点设计 以流动相 pH、乙腈比例和柱温为考察因素，设计三因素五水平试验对色谱条件进行优化，水平的代码值分别为 0、±1、±a，a=1.732，

因素水平设计方案见表 1。

表 1 因素与水平表

Tab. 1 Factors and levels table

水平	因素		
	X ₁ (流动相 pH)	X ₂ (乙腈比例/%)	X ₃ (柱温/℃)
-a	5.8	5	25
-1	6.0	7	29
0	6.3	10	35
1	6.6	13	41
a	6.8	15	45

2.1.2 数据处理 以保留时间(*t_R*)、分离度(R)和理论板数(N)为考察指标，按 0~1 进行标准归一化处理，并计算其几何平均数得总评归一值 OD^[7]。计算公式为： $d_{\max}=(Y_i-Y_{\min})/(Y_{\max}-Y_{\min})$ ， $d_{\min}=(Y_{\max}-Y_i)/(Y_{\max}-Y_{\min})$ ， $OD=(d_1d_2\cdots d_k)^{1/k}$ ，*k* 为指标数，结果见表 2。

2.1.3 模型拟合与方差分析 以流动相 pH、乙腈比例和柱温为自变量，总评归一值 OD 为因变量，进行多元线性回归、二次多项式回归和三次多项式回归，并以置信度(*P*)和拟合度(*R*²)为判定标准^[8-9]，数学模型如下。

多元线性模型： $OD=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3$

表 2 实验设计与结果

Tab. 2 Experimental design and results

序号	X ₁	X ₂	X ₃	<i>t_R</i> -1	<i>t_R</i> -2	<i>t_R</i> -3	<i>t_R</i> -4	<i>t_R</i> -5	R-2	R-3	R-4	R-5	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	OD
1	-1	-1	-1	0.67	0.59	0.60	0.60	0.68	0.30	0.50	0.82	0.34	0.20	0.50	0.52	0.37	0.45	0.48
2	1	-1	-1	0.33	0.47	0.43	0.32	0.23	0.45	0.05	0.33	0.00	0.40	0.69	0.75	0.83	0.84	0
3	-1	1	-1	0.05	0.14	0.14	0.03	0.02	0.92	0.13	1.00	1.00	1.00	0.02	0.05	0.00	0.00	0
4	1	1	-1	0.50	0.43	0.50	0.70	0.76	1.00	0.89	0.62	0.59	0.02	0.12	0.19	0.51	0.63	0.41
5	-1	-1	1	0.77	0.70	0.73	0.92	0.94	0.37	0.71	0.72	0.46	0.31	0.66	0.70	0.58	0.69	0.63
6	1	-1	1	0.11	0.53	0.54	0.00	0.00	0.72	0.36	0.00	0.22	0.63	0.86	0.89	1.00	0.96	0
7	-1	1	1	0.07	0.18	0.15	0.13	0.11	0.92	0.04	0.86	0.97	0.21	0.16	0.18	0.15	0.19	0.20
8	1	1	1	0.72	0.38	0.39	1.00	1.00	0.23	0.55	0.24	0.55	0.15	0.22	0.25	0.74	0.83	0.44
9	-a	0	0	0.44	0.67	0.64	0.15	0.15	0.98	0.43	1.00	0.91	0.00	0.23	0.25	0.07	0.09	0
10	a	0	0	0.88	0.96	0.94	0.83	0.81	0.68	0.98	0.01	0.43	0.40	0.51	0.62	0.96	1.00	0.53
11	0	-a	0	0.00	0.00	0.00	0.25	0.19	0.00	0.00	0.56	0.04	0.61	1.00	1.00	0.96	0.95	0
12	0	a	0	0.00	0.00	0.00	0.13	0.13	0.80	0.03	0.78	0.89	0.96	0.00	0.00	0.17	0.23	0
13	0	0	-a	0.79	0.99	0.97	0.52	0.60	0.76	0.85	0.93	0.54	0.07	0.29	0.37	0.33	0.43	0.51
14	0	0	a	1.00	0.96	1.00	0.86	0.89	0.77	1.00	0.40	0.53	0.24	0.44	0.48	0.72	0.81	0.67
15	0	0	0	0.81	1.00	0.99	0.69	0.74	0.73	0.88	0.65	0.51	0.16	0.38	0.44	0.53	0.64	0.60
16	0	0	0	0.81	1.00	0.99	0.69	0.74	0.73	0.88	0.65	0.51	0.16	0.38	0.44	0.54	0.64	0.60
17	0	0	0	0.81	1.00	0.99	0.69	0.74	0.73	0.88	0.65	0.51	0.15	0.39	0.44	0.54	0.65	0.60
18	0	0	0	0.81	1.00	0.99	0.69	0.74	0.73	0.88	0.65	0.51	0.14	0.39	0.44	0.54	0.65	0.60
19	0	0	0	0.81	1.00	0.99	0.69	0.74	0.73	0.88	0.65	0.50	0.15	0.39	0.44	0.54	0.66	0.60
20	0	0	0	0.81	1.00	0.99	0.69	0.74	0.73	0.88	0.65	0.50	0.20	0.39	0.44	0.54	0.65	0.61

注：1-槐定碱；2-氧化苦参碱；3-氧化槐果碱；4-苦参碱；5-槐果碱。

Note: 1-sophoridine; 2-oxymatrine; 3-oxysophocarpine; 4-matrine; 5-sophocarpine.

二次多项式模型： $OD=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1X_2+b_5X_1X_3+b_6X_2X_3+b_7X_1^2+b_8X_2^2+b_9X_3^2$

三次多项式模型： $OD=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1X_2+b_5X_1X_3+b_6X_2X_3+b_7X_1^2+b_8X_2^2+b_9X_3^2+b_{10}X_1X_2X_3+b_{11}X_1^2X_2+b_{12}X_1^2X_3+b_{13}X_1X_2^2+b_{14}X_1X_3^2+b_{15}X_2^2X_3+b_{16}X_2X_3^2+b_{17}X_1^3+b_{18}X_2^3+b_{19}X_3^3$

采用 design expert 8.0 软件进行回归分析，得出多元线性模型 $P=0.910\ 5$ 、 $R^2=0.032\ 1$ ；二次多项式模型 $P=0.001\ 0$ 、 $R^2=0.889\ 7$ ；三次多项式模型 $P<0.000\ 1$ 、 $R^2=0.999\ 9$ 。结果表明，三次多项式模型的置信度和拟合度最佳，再逐步回归，得到最优拟合方程： $OD=0.60-0.16X_1-0.004\ 5X_2+0.048X_3+0.22X_1X_2-0.04X_1X_3+0.01X_2X_3-0.12X_1^2-0.21X_2^2-0.003\ 3X_3^2-0.22X_1X_2^2$ ($R^2=0.999\ 7$)，模型方差结果见表 3。

表 3 响应面模型的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for response surface reduced model

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1.39	10	0.14	3 526.93	<0.000 1
X_1	0.14	1	0.14	3 555.73	<0.000 1
X_2	2.799×10^{-4}	1	2.799×10^{-4}	7.09	0.026 0
X_3	0.031	1	0.03	781.02	<0.000 1
X_1X_2	0.39	1	0.39	9 802.62	<0.000 1
X_1X_3	0.013	1	0.01	324.05	<0.000 1
X_2X_3	8.000×10^{-4}	1	8.000×10^{-4}	20.25	0.001 5
X_1^2	0.20	1	0.20	5 095.64	<0.000 1
X_2^2	0.65	1	0.65	16 372.50	<0.000 1
X_3^2	1.548×10^{-4}	1	1.548×10^{-4}	3.92	0.079 1
$X_1X_2^2$	0.15	1	0.15	3 880.44	<0.000 1
残差	3.555×10^{-4}	9	3.950×10^{-4}		
失拟项	2.722×10^{-4}	4	6.804×10^{-5}	4.08	0.077 5
纯误差	8.333×10^{-5}	5	1.667×10^{-5}		
总差	1.39	19			

由上述拟合模型绘制各自变量与因变量的三维效应面图，见图 1。得到最优条件： $X_1=6.5$ ， $X_2=10.64$ ， $X_3=41$ ，结合实际情况，确定最终色谱条件：流动相水相为 0.2% 的三乙胺溶液(磷酸调节 pH 值至 6.5)，有机相乙腈比例为 10%，柱温为 40℃。

2.2 方法学验证

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Xbridge C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相为 0.2% 的三乙胺溶液(磷酸调节 pH 值至 6.5)-乙腈(90 : 10)；柱温 40℃；流速 1.0 mL·min⁻¹；检测波长 220 nm。

2.2.2 溶液制备

2.2.2.1 对照品储备液 分别精密称取苦参碱对照品，槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱和槐果

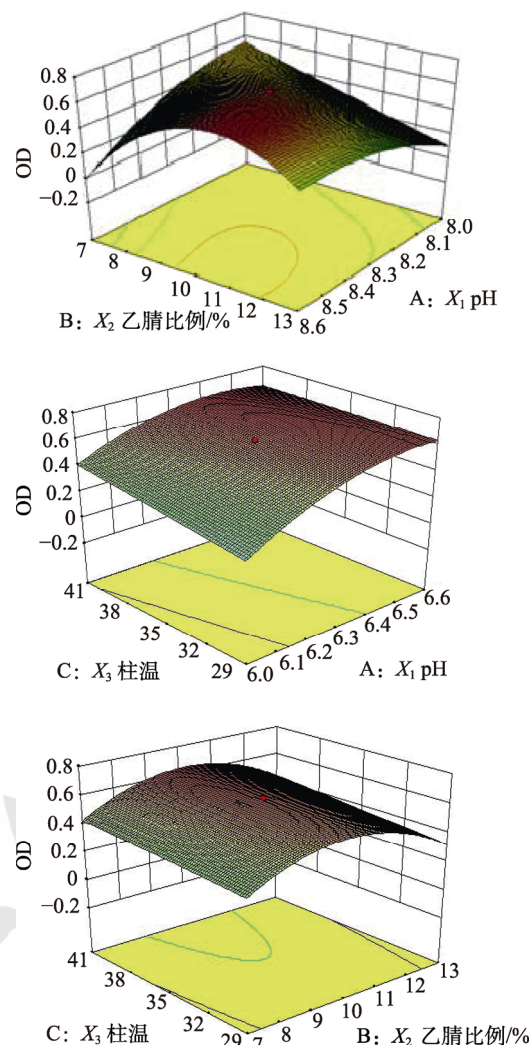


图 1 三维响应面图

Fig. 1 Three-dimensional response surface plot

碱等杂质对照品适量至量瓶中，加乙腈溶解并定量稀释制成每 1 mL 约含各成分 1 mg 的溶液。

2.2.2.2 混合对照品溶液 精密量取对照品储备液 1 mL 至 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度。

2.2.2.3 系统适用性溶液 取苦参碱和各杂质对照品适量，用水溶解并稀释制成每 1 mL 约含苦参碱 0.8 mg 和各杂质 10 μg 的溶液。

2.2.2.4 供试品溶液 苦参碱氯化钠注射液原液(每 1 mL 约含苦参碱 0.8 mg)。

2.2.2.5 对照品溶液 精密量取苦参碱氯化钠注射液适量，加水稀释制成每 1 mL 约含苦参碱 8 μg 的溶液。

2.2.3 系统适用性试验 按“2.2.1”项下色谱条件，精密量取系统适用性溶液 10 μL，进样，记录色谱图，见图 2。结果各成分之间的分离度均>3，表明该方法分离效果良好。

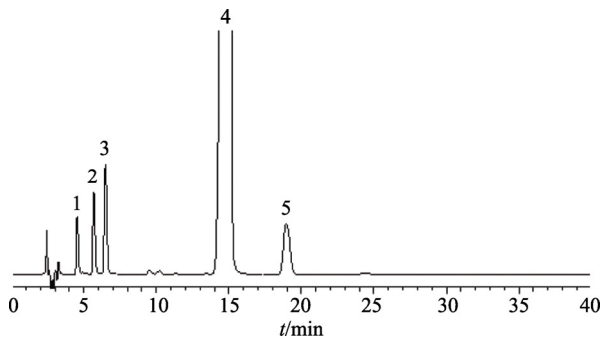


图2 系统适用性试验高效液相色谱图

1-槐定碱; 2-氧化苦参碱; 3-氧化槐果碱; 4-苦参碱; 5-槐果碱。

Fig. 2 HPLC chromatogram of system suitability test

1-sophoridine; 2-oxymatrine; 3-oxysophocarpine; 4-matrine; 5-sophocarpine.

2.2.4 专属性试验 ①氧化破坏溶液: 称取苦参碱原料约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 30%过氧化氢溶液 5 mL, 80 °C 水浴加热 1.5 h, 放冷至室温, 加水稀释至刻度; ②酸破坏溶液: 称取苦参碱原料约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL, 80 °C 水浴加热 1.5 h, 放冷至室温, 用 5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 值至中性, 加水稀释至刻度; ③碱破坏溶液: 称取苦参碱原料约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL, 80 °C 水浴加热 1.5 h, 放冷至室温, 用 5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调节 pH 值至中性, 加水稀释至刻度; ④高温破坏溶液: 取经 60 °C 高温破坏 6 h 后放冷至室温的苦参碱原料约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度; ⑤光照破坏溶液: 取经 4 500 lx 光照 24 h 的苦参碱原料约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度; ⑥未破坏溶液: 取苦参碱原料约 20 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度; ⑦空白辅料溶液: 取辅料氯化钠约 450 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。按“2.2.1”项下色谱条件, 分别精密量取上述溶液各 10 μL, 进样, 记录色谱图, 见图 3。结果可知破坏产生的各杂质与主成分之间以及各杂质之间的分离效果较好, 辅料对苦参碱有关物质检查无干扰, 该方法的专属性较强。

2.2.5 线性和相对校正因子 精密量取对照品储备液适量, 加水稀释制成分别含苦参碱和各杂质浓度约为 1, 5, 10, 25, 50, 100 μg·mL⁻¹ 的系列线性溶液。按“2.2.1”项下色谱条件, 分别精密量取上述溶液各 10 μL, 进样, 记录色谱图, 以峰面积(A)对溶液浓度(C)进行线性回归。以苦参碱为参照物, 用标准曲线法计算得各杂质的相对校正因子(f), 结果见表 4。

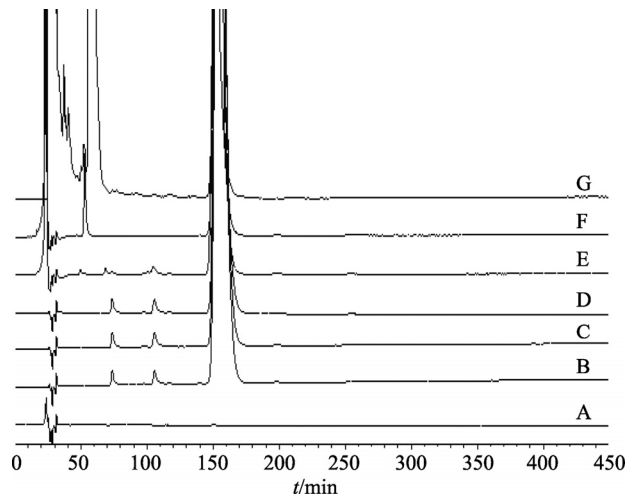


图3 专属性试验高效液相色谱图

A-空白辅料溶液; B-未破坏溶液; C-高温破坏溶液; D-光照破坏溶液; E-碱破坏溶液; F-酸破坏溶液; G-氧化破坏溶液。

Fig. 3 HPLC chromatogram of system suitability test

A-blank excipient solution; B-unbroken solution; C-solution destroyed by high temperature; D-solution destroyed by light; E-solution destroyed by alkali; F-solution destroyed by acid; G-solution destroyed by oxidative.

表4 线性和相对校正因子的测定结果

Tab. 4 Results of linear and relative correction factor

组分	线性范围/ μg·mL ⁻¹	线性方程	r	f
苦参碱	1.02~102.25	$y=6.072\ 8\times10^3x-1.634\ 7\times10^3$	1.000 0	-
槐定碱	1.01~100.66	$y=4.277\ 3\times10^3x-1.322\ 4\times10^2$	1.000 0	1.42
槐果碱	0.96~96.17	$y=1.289\ 6\times10^4x-3.574\ 4\times10^3$	1.000 0	0.47
氧化苦参碱	0.98~98.23	$y=7.807\ 2\times10^3x-3.603\ 3\times10^2$	1.000 0	0.78
氧化槐果碱	1.02~101.66	$y=1.108\ 3\times10^4x+1.657\ 4\times10^2$	1.000 0	0.55

2.2.6 定量限和检测限 取线性溶液用水逐步稀释, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 以信噪比 S/N≈10 的溶液浓度为定量限(limit of quantitation, LOQ), S/N≈3 的溶液浓度为检测限(limit of detection, LOD), 结果见表 5。

表5 苦参碱及其杂质的定量限和检测限

Tab. 5 LOQs and LODs results of matrine and its impurities

组分	LOQ	LOD
苦参碱	511	205
槐定碱	504	201
槐果碱	480	192
氧化苦参碱	196	98
氧化槐果碱	203	102

2.2.7 精密度试验 按“2.2.1”项下色谱条件, 精密量取混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录色谱图。结果苦参碱和各杂质的峰面积 RSD 均<2.0%, 表明该方法精密度良好。

2.2.8 重复性试验 按“2.2.1”项下色谱条件，精密量取对照溶液和 6 份供试品溶液各 10 μL 进样，记录色谱图。测得槐果碱平均含量为 0.02%，RSD 为 1.9%；槐定碱、氧化苦参碱和氧化槐果碱均未检出。单个最大未知杂质和总杂质的含量 RSD 均<2.0%，表明该方法具有较高的重复性。

2.2.9 加样回收率试验 精密移取对照品储备液 1 mL 至 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，得回收率储备液。称取辅料氯化钠约 0.225 g 至 25 mL 量瓶中，加水溶解，精密加入 1 mL 回收率储备液，用水稀释至刻度，得回收率溶液，平行配置 6 份。按“2.2.1”项下色谱条件，精密量取上述溶液各 10 μL ，进样，记录色谱图，结果见表 6。表明该方法准确度良好，可用于定量分析苦参碱氯化钠注射液中的各杂质。

表 6 加样回收率试验的结果

Tab. 6 Results of sample recovery tests

组分	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
苦参碱	9.701	9.866	101.7	101.3	0.7
		9.771	100.7		
		9.713	100.1		
		9.892	102.0		
		9.866	101.7		
		9.841	101.4		
槐定碱	9.824	9.923	101.0	100.5	0.4
		9.897	100.7		
		9.852	100.3		
		9.855	100.3		
		9.818	99.9		
		9.895	100.7		
槐果碱	9.235	9.197	99.6	99.6	0.5
		9.271	100.4		
		9.178	99.4		
		9.190	99.5		
		9.145	99.0		
		9.228	99.9		
氧化苦参碱	9.550	9.522	99.7	99.6	0.5
		9.575	100.3		
		9.474	99.2		
		9.528	99.8		
		9.458	99.0		
		9.540	99.9		
氧化槐果碱	10.010	9.981	99.7	99.5	0.5
		10.000	99.9		
		9.925	99.2		
		9.918	99.1		
		9.926	99.2		
		10.020	100.1		

2.2.10 稳定性试验 取混合对照品溶液和供试品溶液，在室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h，按“2.2.1”项下色谱条件，精密量取不同时间的上述溶液各 10 μL ，进样，记录色谱图。结果混合对照品溶液中苦参碱和各杂质的峰面积 RSD 均<2.0%，供试品溶液中各杂质和杂质总量 RSD 也均<2.0%，表明这 2 种溶液 24 h 内稳定。

2.2.11 样品有关物质测定 精密量取苦参碱氯化钠注射液，按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液和对照品溶液，按“2.2.1”项下方法测定，结果见表 7。

表 7 有关物质测定的结果

Tab. 7 Results of determination for related substance %

企业	批号	槐定碱	氧化苦参碱	氧化槐果碱	槐果碱	最大单杂	总杂
A	20010541	ND	ND	ND	0.02	0.12	0.43
	20010542	ND	ND	ND	0.02	0.12	0.47
B	20200607	ND	ND	ND	0.06	0.42	0.71
	20200608	ND	ND	ND	0.06	0.42	0.70
	20200609	ND	ND	ND	0.06	0.42	0.72
C	1808201	ND	ND	ND	ND	0.21	0.67
	1808211	ND	ND	ND	ND	0.15	0.52
	1808212	ND	ND	ND	ND	0.15	0.54

3 讨论

星点设计-效应面法是一种实验次数少、精度高以及可考察因素水平广的实验设计方法，且通常结合数学和统计学原理进行模型拟合和数据分析，更具适用性及科学性。在运用星点设计-效应面法优化 HPLC 条件时，需要通过预实验来确定考察因素并设计合理的因素水平。可根据要考察组分的理化性质，如酸碱性、溶解度和分子量大小等特点来进行预实验。

3.1 流动相 pH 值的考察

由于苦参碱及其相关杂质都是生物碱类物质，所以考察流动相 pH 值对其分离效果的影响。用磷酸调节水相 pH 值至 8.0, 7.5, 6.8, 6.0, 5.8 和 5.5，发现当 pH 值>6.8 时，苦参碱保留时间>45 min，分析效率低下；而 pH 值<5.8 时，各成分不能完全分离，因此选用 5.8~6.8 作为 pH 值的考察范围。

3.2 流动相乙腈比例的考察

考察了 5%, 10%, 15%, 20% 的乙腈比例对 5 种目标物质出峰情况的影响。发现在 20% 的乙腈比例下，各组分无法完全分离。5%~15% 的乙腈比

例下, 苦参碱及各杂质之间分离度和保留时间较为合适, 故选此范围作为乙腈的考察水平。

3.3 柱温的考察

通过调整柱温则发现, 苦参碱、槐果碱和槐定碱的保留时间随柱温的升高而增大, 氧化苦参碱及氧化槐果碱的保留时间则随柱温的升高而减小。考虑到柱温的可控性, 选用 25~45 °C 作为温度考察范围。

本次研究运用星点设计效应面法优化了苦参碱氯化钠注射液有关物质检查的色谱条件, 并进行了方法学验证。该方法准确度高、重复性好, 能在耗时较短的情况下使苦参碱、4 个潜在的已知杂质和多个未知杂质有效分离, 杂质谱丰富。

REFERENCES

- [1] LIANG P, YUAN T J, GU L L, et al. Study of hepatotoxicity and neural behavioral changes of *Sophora flavescens* and matrine in mice[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(12): 1444-1448.
- [2] ZHANG X W, LI L Y, SHANG H, et al. Advances in structural modification of matrine and its analogues[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(23): 5892-5900.
- [3] LENG X H. HPLC determination related substances of matrine[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci

Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2005, 7(S1): 45-47.

- [4] TAN Z E, ZENG P Q, TUO H Y, et al. Optimization of processing technology for compound metformin hydrochloride by central composite design-response surface methodology[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(12): 1490-1499.
- [5] LIU Y J, XIANG R W. Application of central composite design/response surface methodology in pharmacy experiment design[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(6): 455-457.
- [6] WANG L S, CHENG L, WU Y, et al. Optimization of propafenone hydrochloride sustained-release tablets by central composite design and response surface methodology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(11): 998-1001.
- [7] WANG Y, WANG H, WU X Y, et al. Content determination optimization of dexamethasone ephedrine nasal drops by central composite design-response surface methodology[J]. Chin Pharm(中国药师), 2019, 22(2): 231-235.
- [8] ZHANG J X, CHEN Y Z. Optimization of the coating formulation of loxoprofen sodium sustained-release pellets by central composite design-response surface methodology[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2010, 41(2): 130-134.
- [9] ZHOU Y F, WANG B. Optimization of ambroxol hydrochloride sustained-release tablets formulation by central composite design-response surface methodology[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2007, 38(1): 39-42.

收稿日期: 2021-08-13

(本文责编: 沈倩)