

团体标准

T/ NAIA×××-××××

苦豆子中9种生物碱含量的测定  
高效液相色谱法

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

# 前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区药品检验研究院、宁夏医科大学、宁夏职业技术学院、宁夏紫荆花制药有限公司负责起草

本文件主要起草人：马玲、尚博杨、冷晓红、王汉卿、雷艳、马学琴、梁建宁、马宗卫、撒志明、王宁、马春燕、平吉文、汪晓东、王英华。

本文件为首次发布。

# 苦豆子中9种生物碱含量的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

本文件规定了苦豆子中9种生物碱类含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于苦豆子中9种生物碱类物质：槐定碱、苦豆碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱、莱曼碱、野靛碱和槐胺碱9种生物碱含量的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

试样中的生物碱类物质用10% NaOH浸润12h，再用甲醇超声提取，微孔滤膜过滤，高效液相色谱法测定，外标法定量。

## 5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂：乙腈、三乙胺：色谱纯

5.2 标准品：苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、槐定碱、槐果碱均购于中国食品药品检定研究院，苦豆碱、莱曼碱、野靛碱、槐胺碱（由宁夏紫荆花药业提供，HPLC归一化法检测纯度为99.5%）。

5.4 样品：苦豆子 *Sophora aLopescuroides* L. 采集后分取各器官（根、茎、叶、花、籽）及全草的样品阴干后，粉碎过40目筛。

### 5.4 单标储备溶液

分别准确称取经真空干燥至恒重的苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱、莱曼碱、野靛碱和槐胺碱适量，用甲醇溶解并配置成质量浓度为 1mg/mL 的单标储备溶液，贮存于密闭容量瓶中避光于 4℃ 下储存。

### 5.5 混合标准储备溶液

分别精密量取（5.4）项下的单标储备溶液适量，用甲醇溶解并稀释制成每mL含苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱、莱曼碱、野靛碱和槐胺碱约为 100 μg 的溶液，作为混合标准储备溶液。

## 6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪，（配DAD检测器）；

6.2 分析天平

6.3 超纯水机

6.4 0.45 $\mu$ m 滤膜，有机相。

## 7 供试品溶液的制备

取本品粉末（过 40 目筛）0.5 g，精密称定，置 100 ml 具塞锥形瓶中，加 10% NaOH 溶液浸润 12 h 后，精密加入甲醇 20 ml，密塞，称定重量，超声提取（功率 250W, 频率 33kHz）40 min，放置至室温，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，用 0.45  $\mu$  的滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液。

## 8 高效液相色谱参考条件

色谱柱：Waters 公司的 X-Brige C18（4.6mm\*250mm 5 $\mu$ ）(PH=1-11)色谱柱。

流动相 A：乙腈；流动相 B：0.05mol/L 的磷酸二氢钾（2.0ml/L 三乙胺）；按下表梯度洗脱。

检测器：二极管阵列检测器（DAD）。

检测波长：205nm（苦豆碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、莱曼碱），311nm（野靛碱和槐胺碱）。

进样体积：10 $\mu$ l。

柱温：25 $^{\circ}$ C。

表 1 程序洗脱表

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1.0	6	94
10	1.0	6	94
50	1.0	13	87
55	1.0	6	94

## 9 标准曲线的制作

精密量取“5.4”项下的混合对照品溶液2.0ml、3.0ml、4.0ml、5.0ml、6.0ml、10.0ml至 10ml 的容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得系列线性测定混合标准使用溶液。取上述系列溶液按8项的色谱条件进行测定，记录峰面积，以对照品溶液浓度（C）为横坐标，峰面积（A）为纵坐标，绘制标准曲线或求线性回归方程。

## 10 测定

取平行两份的供试品溶液测定，待测液中各生物碱的响应值应在标准曲线范围内。以相对保留时间确定待测定成分峰，以外标法计算待测成分含量。

## 11 结果计算和表达

试样中槐定碱、苦豆碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱、莱曼碱、野靛碱和槐胺碱的含量以质量分数 $\omega_i$ 计，数值以微克每克（mg/g）计，按式（1）计算：

$$\omega_i = \frac{C_s \times V}{m} \quad (1)$$

式（1）中：

$C_s$ —从标准曲线上查得待测液中各生物碱的质量浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$V$ —试样中加入的提取溶液体积，单位为毫升（ml）；

$m$ —试样的质量，单位为克（g）

测定结果保留三位有效数字。

## 12 色谱图

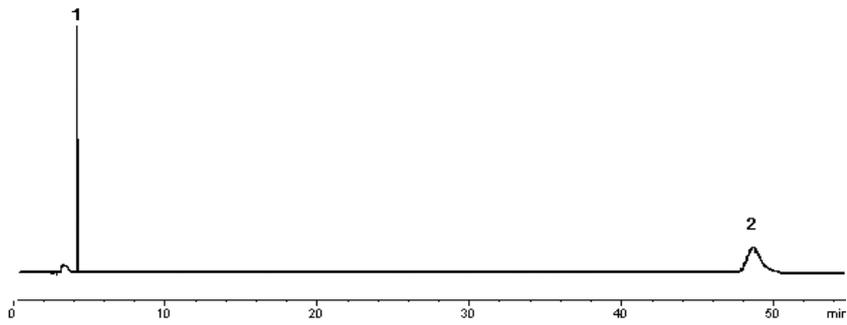
生物碱类混合标准品溶液及苦豆子供试品色谱图参见附录A

## 13 精密度

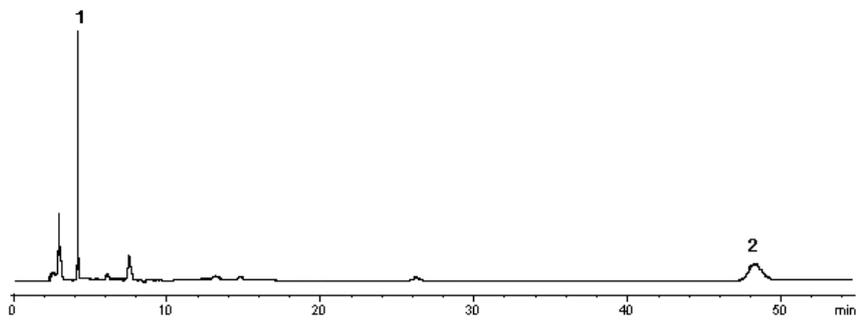
在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的5%。

## 附录 A

(资料性)



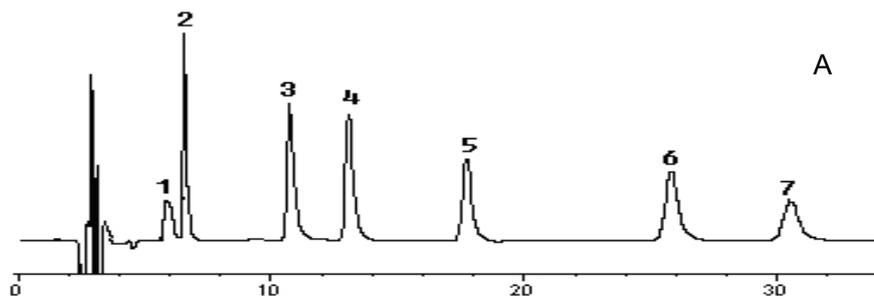
图A1 311nm下2种生物碱标准溶液色谱图



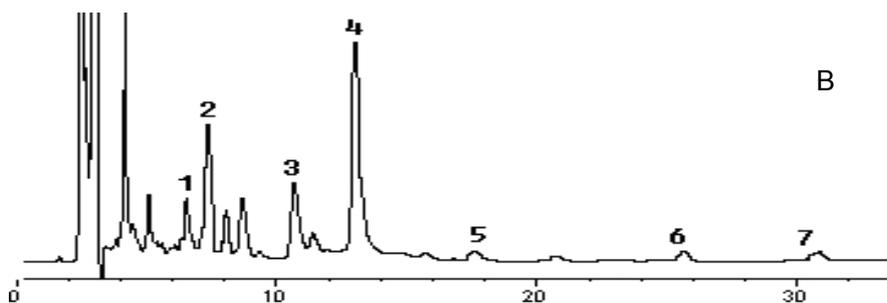
图A2 311nm下苦豆子供试品溶液色谱图

标引序号说明：

1-野靛碱；2-槐胺碱；



图A3 205nm下7种生物碱标准溶液色谱图



图A4 205nm下苦豆子供试品溶液色谱图

标引序号说明：

1.苦豆碱;2.槐定碱;3.氧化苦参碱;4.氧化槐果碱;5.苦参碱;6.槐果碱;7.莱曼碱.