

高效毛细管电泳法测定苦参碱和氧化苦参碱

第二军医大学东方肝胆外科医院肿瘤免疫
和基因治疗中心(上海 200438)

罗 明* 贺 平 吴孟超
李琳芳 郭亚军

摘 要 建立了测定苦参碱和氧化苦参碱含量的高效毛细管电泳法。20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=8.0)为电泳电解质,电压为 30 kV(运行电流为 100~110 μ A),检测波长为 214 nm,内标氨茶碱。苦参碱 0.126~1.26 mg/mL、氧化苦参碱 0.10~1.0 mg/mL 其浓度与峰面积之比呈良好的线性关系, r 均为 0.9998,日内、日间变异系数均小于 5.7%,常用 22 种药物除地塞米松外其余的对其无干扰。用本法测定了 2 批苦参提取物,其中苦参碱为(45.19 $\pm$ 0.058)%, (62.81 $\pm$ 0.123)%;氧化苦参碱为(8.71 $\pm$ 0.03)%, (6.81 $\pm$ 0.086)%。结果表明,该方法简单、灵敏、特异性和重现性良好,具有较强的实用价值。

关键词 高效毛细管电泳 苦参碱 氧化苦参碱 含量检测

高效毛细管电泳法(HPCE)是近年发展起来的一种新的分离分析方法^[1]。苦参碱和氧化苦参碱是常用中草药苦参及广豆根等的主要有效成分,具有镇静、镇痛、解热、降温、抗炎、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用^[2]。已有报道用 HPLC 方法检测苦参碱和氧化苦参碱的方法^[3],但相比 HPCE 而言又不及后者快速、简便、高效。本实验用 HPCE 中的毛细管区带电泳法同时测定苦参碱和氧化苦参碱的含量,结果较为满意。

1 实验材料

P/ACE5000 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司),IBM4460DXZ 型电脑,Epso LQ-300 型打印机,石英毛细管 57 cm $\times$ 50 μ m(美国 Beckman 公司),有效长度 50 cm。对照品苦参碱和氧化苦参碱购于中国药品生物制品检定所,批号分别为 0805-9703 和 0780-9703。试剂均为国产分析纯试剂,水为去离子双蒸水,待测的两份苦参碱样品是分别用乙醇法和酸水法从苦参中自行提取的^[4]。

2 方法与结果

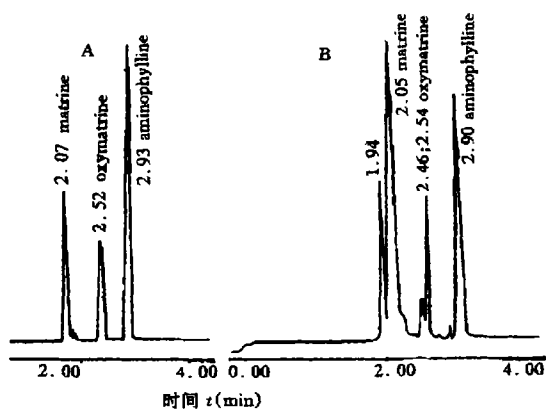
2.1 测定条件:以 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=8.0)作为电泳电解溶液。每次开机后用 0.1 mmol/L 盐酸、0.1 mmol/L 氢氧化钠、20 mmol/L 磷酸盐缓冲液和水各冲洗 4 min。两次进样之间以磷酸盐缓冲液和水各冲洗 2 min。真空进样时间为 5 s,恒定电压为 30 kV,运行电流为 100~110 μ A,柱温 23 $^{\circ}$ C,检测波长 214 nm,设定时间 10 min,由计算机记录并处理峰面积。

2.2 标准液的配制及样品的处理:精确称取对照品苦参碱和氧化苦参碱一定量,去离子双蒸水溶解,定容,最后用 0.2 μ m 的滤膜过滤,得贮备液。待测的两份苦参碱样品干燥恒重后,分别称取一定量溶解于一定的去离子双蒸水中,分别用 0.2 μ m 滤膜过滤,作为待测样品。

2.3 内标的选择:实验中考察了氢化可的松、甘草酸二胺作为内标的可能性,但二者在 10 min 内无吸收峰出现,而氨茶碱在碱性环境中稳定,并且不干扰待测成分出峰,重复性好,故选作检测苦参碱和氧化苦参碱的内标(图 1-A)。

* Address: Luo Ming, Oriental Hepatobiliary Surgery Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai

罗 明 35 岁,博士学位,主治医师和讲师。1986 年毕业于湖北中医学院中医系,先后在同济医科大学和第二军医大学获硕士及博士学位。长期从事中西医结合科研、临床及教学工作,已发表论文 4 篇。



A-对照品 B-样品

图 1 电泳图

2.4 干扰试验:在本试验条件下,检测临床上常用的 22 种药物:维生素 C、维生素 B₆、维生素 B₁₂、维生素 K₁、维生素 K₃、青霉素钠盐、氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、红霉素、盐酸麻黄碱、氨甲苯酸、甘草酸二胺、三磷酸腺苷二钠、肌苷、肝泰乐、酚磺乙胺、地塞米松、氢化可的松、利多卡因、氟尿嘧啶对测

表 2 回收率和精密度试验($\bar{x} \pm s$)

药品	加入量 (mg/mL)	测得量 (mg/mL)	回收率 (%)	日内 RSD (%)(n=3)	日间 RSD (%)(n=6)
苦参碱 1	0.12	0.1133±0.0065	89.89±5.12	5.7	4.23
苦参碱 2	0.63	0.6282±0.0030	99.91±0.48	0.48	0.81
苦参碱 3	1.26	1.233±0.0059	97.88±0.17	0.47	0.87
氧化苦参碱 1	0.10	0.1026±0.0018	102.63±1.76	1.72	3.41
氧化苦参碱 2	0.50	0.512±0.003	102.4±0.59	0.58	1.02
氧化苦参碱 2	1.0	1.0068±0.003	100.68±0.30	0.30	0.77

2.7. 重现性:为确定上述分析条件下定量分析的精密度,通过 6 次重复进样,考察了苦参碱和氧化苦参碱的相对迁移时间和峰面积之比的重现性,结果见表 3。

表 3 苦参碱、氧化苦参碱的相对迁移时间和峰面积之比(n=6)

药物	相对迁移时间		峰面积比	
	$\bar{x} \pm s$ (min)	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
苦参碱	2.068±0.034	1.644	0.3617±0.0032	0.885
氧化苦参碱	2.525±0.017	0.673	0.2860±0.0021	0.734

2.8 最低检测限:当信噪比大于 2 时,苦参

定苦参碱和氧化苦参碱的干扰。结果表明,除地塞米松对氧化苦参碱在出峰时间上有干扰外,其余药对其均无影响。

2.5 标准曲线和线性范围:精密移取标准贮备液不同量,加氨茶碱(25 mg/mL)液作内标,用水定容,得不同浓度的标准系列溶液,按开始设定的工作条件检测,每个样本重复 3 次,以药物浓度为纵坐标(Y),药物与内标峰面积之比为横坐标(X),进行线性回归。结果见表 1。

表 1 苦参碱和氧化苦参碱的线性关系和线性范围

药物	线性关系	线性范围 (mg/mL)	r
苦参碱	$Y=3.5 X-0.024$	0.126~1.26	0.9998
氧化苦参碱	$Y=3.64 X-0.041$	0.10~1.0	0.9998

2.6 回收率及精密度:用苦参碱和氧化苦参碱分别配制成表 2 所示的高、中、低 3 种不同浓度,按相同的方法操作,计算回收率及日内,日间精密度(RSD),结果见表 2。

碱和氧化苦参碱的最低检测限分别是 1.0 和 0.5 μg/mL。

2.9 应用:取配制好的两批待测苦参碱样品,分别加入相同的氨茶碱内标。照开始设定工作条件开始检测样品中苦参碱和氧化苦参碱的含量,每个样品重复 3 次,结果见表 4。

3 讨论

开始考察了 4 种不同浓度的缓冲液作为电泳电解质的可能,结果发现 30 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.7)和 10 mmol/L 的醋酸缓冲液(pH=3.0)完全不能将苦参碱

表 4 样品中苦参碱和氧化苦参碱的含量
($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

样品	苦参碱(%)	P	氧化苦参碱	P
1	45.19 $\pm$ 0.058		8.71 $\pm$ 0.03	
2	62.81 $\pm$ 0.123	<0.01	6.81 $\pm$ 0.086	<0.01

和氧化苦参碱分离;而 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.37)又分离不彻底。相比之下,20 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH=8.0)分离效果较好,待测成分及内标均可在 2~4 min 内出峰,而且相互之间分离完全(图 1-A)。通过干扰试验发现临床上与苦参碱和氧化苦参碱相关的 22 种常用药物中除地塞米松对氧化苦参碱的色谱峰干扰外,其余的均

无干扰。回收率及日内、日间 RSD 均在允许范围之内。所试验的两份样品,尽管样品不纯,含杂质较多,但该系统仍然较好地将各个成分分开(图 1-B)。同时也说明,乙醇法提取的氧化苦参碱含量较高,而酸水渗漉法提取的苦参碱含量较高。经对同一样本的反复测试,证明方法的重现性、精确性均达到要求,较常规的 HPLC 法简便、快速、经济,具有较高的实用价值。

参考文献

- 1 王 杰,等. 中国医药工业杂志,1997,28(7):327
- 2 李 丹,等. 中草药,1996,27(5):308
- 3 金莉霞,等. 药学报,1993,28(2):136
- 4 张守芳. 中草药通讯,1977,1:38

(1998-06-30 收稿)

Determination of Matrine and Oxymatrine by HPCE

Luo Ming, He Ping, Wu Mengchao, *et al.* (Tumor Immunology and Gene Therapy Center, Oriental Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438)

Abstract A method has been developed for the determination of matrine and oxymatrine by high performance capillary electrophoresis (HPCE). Aminophylline was used as internal standard. Complete separation was achieved with 20 mmol/L running phosphate buffer (pH=8.0) at a constant voltage of 30 kV (current of 100~110 μ A) and detected at a wavelength of 214 nm. Good linearity was shown between the concentration and peak area in the concentration range of 0.126~1.26 mg/mL for matrine and 0.10~1.0 mg/mL for oxymatrine, $r=0.9998$. The relative standard deviation (RSD) for within-day and between-day was less than 5.7%. 22 different drugs in common use except dexamethasone showed no interference. Two samples of extract of *Sophora flavescens* Ait. gave results of (45.19 $\pm$ 0.058)% and (62.81 $\pm$ 0.123)% for matrine and (8.71 $\pm$ 0.03)% and (6.81 $\pm$ 0.086)% for oxymatrine on a trial determination. It seemed that the HPCE method is faster, more convenient and economical as compared with HPLC.

Key words high performance capillary electrophoresis (HPCE) matrine oxymatrine

《中草药》杂志 1998 年第 29 卷增刊(总第 310 期)征订启事

为了扩大学术交流,提高新药研究水平,经国家科学技术部(国科发信字[1998]217号文)批准,我们编辑出版了《中草药》杂志 1998 年第 29 卷增刊(总第 310 期)。本增刊共刊载论文 80 篇,并以当今国际研究的热点“银杏叶的开发研究”为专论重点,包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面的科研论文 26 篇,并特邀国内从事银杏叶研究的知名专家和中青年学科带头人撰写综述文章,充分反映了国内、外在“银杏叶的开发研究”方面的新成果、新进展和新动态。另外刊载反映我国中药植化、药理、分析、制剂、药材和临床等方面的新理论、新方法、新成就的科研论文和有关综述文章 54 篇。本增刊选题广泛,内容丰富,学术水平较高,科学性较强,集中反映了我国中草药研究领域近 1~2 年的新进展。

增刊为 16 开本,采用激光照排,胶版印刷,彩色封面,160 页(约 30 万字左右),天津市报刊增刊特准印证(98)第 122 号,本部发行,定价 50 元;另加包装费、邮费 5 元,订阅请向我部索取订单。

电话:(022)27474913 邮政编码:300193 天津市南开区鞍山西道 308 号《中草药》杂志编辑部