

HPLC 法同时测定山豆根中苦参碱和氧化苦参碱

杨文远, 马丽娟*

(宁夏大学 化学科学与工程系, 宁夏 银川 750021)

山豆根为豆科槐属植物柔枝槐(越南槐、广豆根) *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根及根茎, 是传统中药, 广泛应用于临床。功能清热解毒、消肿止痛。药理研究证明其具有抗肿瘤作用^[1,2]。山豆根主要有效成分为苦参碱和氧化苦参碱^[1~3]。苦参碱和氧化苦参碱均属喹诺里西啶生物碱, 具有广泛生物活性。均具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、抗心律失常、镇咳、平喘作用。氧化苦参碱还具有升白、镇静、降温、护肝作用^[4], 故均具广泛的开发前景。山豆根中上述生物碱的测定有薄层光密度法^[5], 而 HPLC 法则未见报道。由于薄层光密度法操作较繁琐, 精密度和准确度亦不够理想。本研究建立了 HPLC 法同时测定山豆根中苦参碱与氧化苦参碱。本方法简单、灵敏、准确, 为该中药的质量评价提供了科学依据。

1 仪器、试剂与样品

1.1 仪器: 高效液相色谱 LC—6A 系统, SPD—6A V 紫外检测器, SLC—6A 系统控制器, C—R 3A 数据处理系统, SPD—M 6A 光电二极管阵列检测器, 以上均为日本岛津公司生产。Millipore 溶剂过滤系统, 为美国 Millipore 公司生产, CSF—1A 超声波发生器为上海超声波发生器厂出品。

1.2 试剂与样品: 甲醇(优级纯), 北京化工厂出品。氯仿、三乙胺、氯水均为分析纯。色谱用中性氧化铝, 0.070~0.045 mm, 上海五四化工厂生产。苦参碱、氧化苦参碱, 中国药品生物制品检定所提供。山豆根样品由宁夏回族自治区医院药剂科提供并鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Shim-pack CLC-ODS (150 mm × 60 mm, 5 μm) 色谱柱, 带有前置保护性; 流动相为甲醇-水-三乙胺(55:45:0.02), 临用前以微孔滤膜滤过并经超声脱气处理; 紫外检测波长 215 nm; 灵敏度 0.08 AUFS; 流速 0.8 mL/min; 柱温 50℃。色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液的制备: 精密称取干燥的山豆根 0.5 g, 用 0.4 mL 氨水润湿并密封放置 2 h, 然后精密加入 20 mL 氯仿, 密封超声提取 40 min, 精密移

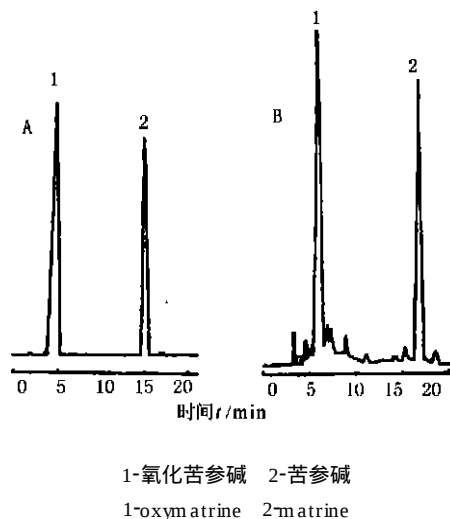


图1 对照品(A)和样品(B)HPLC图
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

取氯仿提取液 10 mL, 通过氧化铝小柱(填充中性氧化铝, 1 cm × 5 cm), 先以 10 mL 氯仿洗脱, 继用 10 mL 氯仿-甲醇(7:3)洗脱, 合并洗脱液, 挥干溶剂, 残渣用流动相溶解, 并移至 10 mL 量瓶中稀释至刻度, 制成供试品溶液, 供试品溶液经 Millipore 滤器滤过后供分析用。

2.3 标准曲线的制备: 精密称取苦参碱 25.0 mg, 氧化苦参碱 35.0 mg, 分别用流动相溶解, 并稀释定容至 10 mL, 得到苦参碱及氧化苦参碱的储备溶液。然后将此溶液稀释成含苦参碱为 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.025 mg/mL 和氧化苦参碱为 3.5, 2.5, 1.5, 0.5, 0.25, 0.05 mg/mL 系列对照品溶液。按上述色谱条件进行测定, 每次进样 2 μL, 以峰面积 A 为纵坐标, 浓度 C 为横坐标作图, 苦参碱浓度范围为 0.025~2.5 mg/mL, 回归方程: $A = 29\,248.56C + 42.07$, $r = 0.9991$; 氧化苦参碱浓度范围为 0.05~3.5 mg/mL, 回归方程为: $A = 22\,964.40C + 76.84$, $r = 0.9993$ 。

2.4 精密度试验: 按上述色谱条件用浓度均为 0.5 mg/mL 的苦参碱和氧化苦参碱的对照品溶液各进样 2 μL, 每种溶液测定 6 次, 苦参碱 RSD = 0.78%,

氧化苦参碱 $RSD = 1.21\%$ 。

2.5 重现性试验: 精密称取同一试样 5 份, 每份 0.5 g, 按 2.2 项下方法制成供试品溶液, 按色谱条件测定, 结果苦参碱的 RSD 为 1.34%, 氧化苦参碱的 RSD 为 1.52%。

2.6 稳定性试验: 取一供试品溶液在室温下放置, 分别于当天, 次日及第 3 天进样分析, 结果苦参碱的 RSD 为 1.04%, 氧化苦参碱的 RSD 为 1.32%, 表明制好的供试液 3 d 内稳定。

2.7 回收率试验: 精密称取已知含量的生药材样品 3 份, 每份均为 0.5 g, 加入苦参碱和氧化苦参碱各 5.0 mg, 按样品分析相同的方法进行测定。测得苦参碱的平均回收率为 96.9%, RSD 为 1.19%; 氧化苦参碱的平均回收率为 98.9%, RSD 为 1.28%。

2.8 样品的测定: 按 2.2 项制备的供试品溶液经 Millipore 溶剂过滤器滤过后在上述色谱条件下进样, 每次 2 μ L, 每种样品测定 5 次, 样品分析结果见表 1。分析结果表明, 各地生药样品中均含有相当的苦参碱和氧化苦参碱, 其中以广西样品中含量最高。不同地区样品含量有较大差异。

表 1 样品分析结果

Table 1 Result of sample determination

样 品	苦参碱/(mg · g ⁻¹)	氧化苦参碱/(mg · g ⁻¹)
广 西	10.194	16.135
贵 州	9.856	13.085
云 南	9.262	10.486

3 讨论

3.1 用光电二极管阵列检测器测定对照液及样品溶液的 HPLC 的三维谱图和等高线谱图, 由谱图确定以 215 nm 作为检测波长时, 分析方法的灵敏度高, 干扰少, 样品的色谱图图形良好。

3.2 用反相柱进行样品的 HPLC 分析, 首选甲醇-水二元系统。经样品实验测定, 必须加大流动相中水的比例, 以使干扰组份与待测生物碱达到分离。加入少量三乙胺, 可使生物碱的色谱峰减少拖尾, 改善峰形, 以利于准确进行定量测定。经实验优化, 得到甲醇-水-三乙胺为 55 : 45 : 0.02 体积比时分离效果最佳。

3.3 在反相键合相色谱分析中, 使用 50 ~ 60 柱温, 可减少流动相的黏度, 降低柱压, 提高柱效, 改善分离效果, 而并不影响柱寿命。本研究采用 50 柱温, 在样品实际分析中可实现降低柱压, 改善分离效果, 得到的色谱图分离情况良好。

3.4 由于样品所含成分复杂, 氯仿提取液中含有各种干扰组份, 若直接进行测定, 一方面干扰组份将影响上述生物碱的准确定量测定, 另一方面污染色谱柱, 影响柱寿命, 故样品溶液在进行测定之前需要净化。本研究采用氧化铝柱色谱法进行净化, 操作简便, 净化良好。

References

- [1] Xiong W Y, Wang J Z, Shi T D, et al. *Chinese Woody Officinal Plant* [M]. Shanghai: Shanghai Education Publishing House, 1993.
- [2] Wang J M, Wang H F, Xu C Z, et al. *Chinese Traditional Medicine Research and Document Index* (中药研究与文献检索) [M]. Shanghai: Shanghai Far East Publishing House, 1994.
- [3] Lin Q S. *Constituent Chemistry of Chinese Herbal Medicine* (中草药成分化学) [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [4] Information Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituents in Phytochemistry* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.
- [5] Zhang Y M, Fang L Q, Guo J X. Determination of matrine and oxymatrine in *Sophora tonkinensis* Gapnep. by TLC densitometry [J]. *Modern Applied Pharmacy* (现代应用药学), 1994, 11(1): 38-40.

2004 年全国医院药学(制剂研究与开发)学术会议征文通知

中国药学会医院药学专业委员会拟在 2004 年 8 月主办以制剂研究与开发为重点的全国医院药学学术会议。现向全国医院药学专业人员、临床医师、临床护师和医院管理干部征文, 有关内容如下。

1 征文内容

医院药物制剂研究与开发中的新成果、新经验, 包括处方筛选、制备工艺优化、制剂质量标准和控制、药物制剂的临床疗效观察和评价、药物动力学研究等。

2 征文要求

2.1 未公开发表的论文均可作为征文稿件, 全文控制在 3 000 字内, 研究论文需附中英文摘要(书写格式请按中国医院药学杂志投稿要求), 综述不超过 4 000 字。所有征文均需另附 800 字摘要, 请附软盘, 并用 Word 格式打印 2 份后加盖公章。

2.2 论文截止日期: 2004 年 4 月 30 日。

3.3 论文请通过邮局寄至中国医院药学杂志编辑部, 也可发电子邮件, 请注明作者详细联系地址和电话。地址: 武汉市胜利街 155 号, 邮政编码: 430014, 电话: (027) 82836596 E-mail: pharmacy@public.wh.hb.cn。请在信封和论文稿件或电子邮件上注明“会议征文”字样, 以免同杂志正常稿件混淆。

3 说明

会议录用后均给第一作者发会议通知; 会议将编辑论文集, 会后并出版增刊; 会议设优秀论文一、二、三等奖; 与会代表将获得国家继续教育学分证书。会议地点待定。