

HPLC 同时测定苦豆子总碱中 8 种生物碱含量

刘振龙^{1,2}, 张丽², 魏蕾初², 郑堰心², 邓虹珠^{2*}

(1. 广东省食品药品检验所, 广州 510180; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 建立苦豆子总碱中生物碱的含量测定方法。方法: 采用 HPLC, 乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (三乙胺调 pH > 6.45), 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 检测波长 205 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 8 种生物碱分离良好, 8 种生物碱含量 > 50%。结论: 该方法简便, 可以作为苦豆子总碱的含量测定方法, 比原标准中的滴定法测定总碱含量更方便、精确。

[关键词] 苦豆子总碱; 野靛碱; 苦豆碱; 槐定碱; 氧化苦参碱; 氧化槐果碱; 槐果碱; 苦参碱 莱曼碱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)08-0142-04

[doi] 10.11653/syfj2013080142

HPLC Method for Simultaneous Determination of 8 Kinds of Alkaloids in Total Alkaloids of Sophora Alopecuroides

LIU Zhen-long^{1,2}, ZHANG Li², WEI Lei-chu², ZHENG Yan-xin², DENG Hong-zhu^{2*}

(1. Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of alkaloids in the TASA. **Method:** HPLC method was used with acetonitrile-0.05 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (triethylamine adjust pH value greater than 6.45) as mobile phase by gradient elution. The column temperature was kept at 35 °C, and the detection wavelength was set at 205 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Eight kinds of alkaloids were separated well, and the content was greater than 50%. **Conclusion:** The method is simple, more convenient and accurate for determination of the content of TASA than the original standard titration method.

[Key words] total alkaloids in sophora alopecuroides; cytosine; aloperine; sophoridine; oxymatrine; oxysophocarpine; sophocarpine; matrine; lehmannine; content determination

苦豆子为豆科槐属多年生草本植物, 在民间主要用于治疗腹泻、细菌性痢疾等疾患。苦豆子总碱是从苦豆子的干燥全草和种子提取而得的总生物碱, 含槐定碱、苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、槐胺碱、苦豆碱等多种生物碱。近年来的研究发现, 苦豆子总碱具有抗癌、抗炎、抗菌等活性^[1-5]。国内市场上以苦豆子总碱为原料开发的制剂主要用于治疗妇科

炎症、细菌性痢疾、肝炎等^[6]。目前, 由于苦豆子总碱质量受到标准滞后的影响, 缺乏统一的评价标准, 不能满足制剂开发的要求。苦豆子总碱原质量标准^[7]中采用滴定法测定总生物碱含量, 用高效液相法测定槐定碱的含量。为了更精确控制苦豆子总碱中各种生物碱的含量, 我们采用了 HPLC 同时测定苦豆子总碱中主要的 8 种生物碱含量, 为评价苦豆子总碱的质量提供了更科学的标准。

1 材料

Shimadzu 高效液相色谱仪, 型号 C70-15C, LC solution 色谱工作站, DAD 检测器。

乙腈为色谱纯, 三乙胺、磷酸二氢钾、甲醇均为分析纯, 水为超纯水。

槐定碱 (110784-200804)、氧化苦参碱 (0780-

[收稿日期] 20120710(015)

[第一作者] 刘振龙, 博士研究生, 主管药师, 从事药物质量研究, Tel: 13925037601, E-mail: 16531726@qq.com

[通讯作者] * 邓虹珠, 教授, 博士生导师, 国家新药审评专家, 从事中药新药开发与评价研究, Tel: 02061648036, E-mail: denghz@fimmu.com

200004)、苦参碱(110805-200508)、氧化槐果碱(111652-200301)由中国药品生物制品检定所提供,野靛碱、苦豆碱、槐果碱、莱曼碱(由宁夏紫荆花药业提供;纯度均 $\geq 98.0\%$)。

苦豆子总碱(批号110409,110509,110715)由宁夏紫荆花药业提供。

2 方法与结果

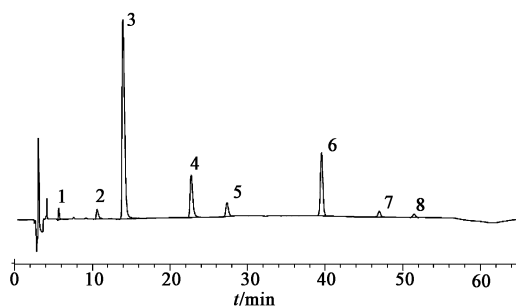
2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 0.05 mol·L⁻¹的磷酸二氢钾(三乙胺调 pH 6.45) 溶液为流动相,洗脱梯度为 0 ~ 10 min (5:95 ~ 5:95), 10 ~ 50 min (5:95 ~ 12:88), 50 ~ 55 min (12:88 ~ 5:95), 检测波长 205 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL; 柱温 35 °C, 以苦豆碱峰计,理论板数 $\geq 8\ 000$ 。

2.2 对照品溶液的制备 取五氧化二磷干燥 6 h 的对照品,分别精密称取野靛碱 2.24 mg、苦豆碱 5.65 mg、莱曼碱 1.81 mg、槐果碱 1.66 mg、氧化槐果碱 5.42 mg、苦参碱 20.24 mg、氧化苦参碱 16.11 mg、槐定碱 76.83 mg,置 50 mL 量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。见图 1。

2.3 供试品溶液的制备 取本品浸膏约 0.1 g,精密称定,甲醇^[8]溶解至 25 mL,用 0.45 μm 的滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。见图 2。

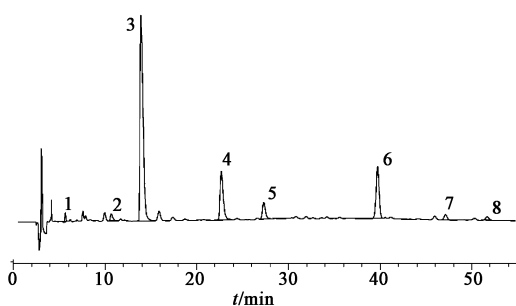
2.4 标准曲线的绘制 取对照品溶液分别以 1,

5,7,10,15,20 μL,按上述色谱条件进样测定。以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1,表明 8 种生物碱线性关系良好。



1. 野靛碱;2. 苦豆碱;3. 槐定碱;4. 氧化苦参碱;
5. 氧化槐果碱;6. 苦参碱;7. 槐果碱;8. 莱曼碱

图 1 8 种生物碱对照品色谱



1. 野靛碱;2. 苦豆碱;3. 槐定碱;4. 氧化苦参碱;
5. 氧化槐果碱;6. 苦参碱;7. 槐果碱;8. 莱曼碱

图 2 苦豆子总碱色谱

表 1 标准曲线

名称	回归方程	相关系数 <i>r</i>	线性范围/μg
野靛碱	$Y = 1\ 149\ 406.68X + 19\ 628.61$	0.999 7	0.044 8 ~ 0.896 0
苦豆碱	$Y = 949\ 860X - 25\ 354$	0.999 7	0.113 0 ~ 2.260 0
槐定碱	$Y = 1\ 505\ 467.22X + 2\ 473\ 289$	0.999 5	1.536 6 ~ 30.732 0
氧化苦参碱	$Y = 1\ 856\ 567.70X - 41\ 528.59$	0.999 9	0.322 2 ~ 6.444 0
氧化槐果碱	$Y = 1\ 804\ 005.17X - 46\ 273.38$	0.999 7	0.108 4 ~ 2.168 0
苦参碱	$Y = 1\ 964\ 862.55X - 110\ 173.66$	0.999 8	0.404 8 ~ 8.096 0
槐果碱	$Y = 2\ 330\ 675.70X - 11\ 362.35$	0.999 8	0.033 2 ~ 0.664 0
莱曼碱	$Y = 1\ 293\ 759.75X - 7\ 447.66$	0.999 9	0.036 2 ~ 0.724 0

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL,在上述色谱条件下,连续进样 6 次,结果:野靛碱、苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱和莱曼碱的峰面积($n = 6$)的 RSD 分别为 1.98%, 1.53%, 0.04%, 0.04%, 1.00%, 0.39%, 1.67%, 0.93%, 表明 8 种生物碱的精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样,依法测定,结果野靛碱、苦豆

碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱和莱曼碱的峰面积的 RSD 分别为 1.29%, 2.38%, 0.45%, 0.40%, 1.71%, 2.95%, 1.79%, 2.37, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批号的苦豆子总碱样品 6 份,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,测定,结果野靛碱、苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱和莱曼碱的含量测定值

($n = 6$) 的 RSD 分别为 1.86% , 2.60% , 2.79% , 2.59% , 2.26% , 2.38% , 2.28% , 2.76% 。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的苦豆子总碱(批号 110509) 0.2 g, 加甲醇溶解至 50 mL 的量瓶中, 精密量取 3 mL, 共 9 份, 分别加入对照品溶液 1.4, 2, 2.4 mL, 加甲醇至 10 mL, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 取续滤液, 按照上述色谱条件检测, 结果野靛碱、苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱和莱曼碱的平均回收率($n = 9$) 分别为 97.72% , 96.11% , 104.13% , 96.12% , 96.07% , 102.79% , 102.81% , 102.03% ; RSD 分别为 1.58% , 0.89% , 0.79% , 1.03% , 2.03% , 1.29% , 1.22% , 1.92% 。见表 2。

表 2 苦豆子总碱加样回收率

生物碱	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均回收率 /%	回收率 RSD /%
野靛碱	0.090 0	0.089 6	0.177 1	97.24	97.72	1.58
	0.090 0	0.089 6	0.177 8	97.97		
	0.090 0	0.089 6	0.179 1	99.46		
	0.090 0	0.062 7	0.150 5	96.52		
	0.090 0	0.062 7	0.150 2	96.04		
	0.090 0	0.062 7	0.149 9	95.50		
	0.090 0	0.107 5	0.196 3	98.82		
	0.090 0	0.107 5	0.197 5	100.01		
	0.090 0	0.107 5	0.195 3	97.93		
苦豆碱	0.251 8	0.226 0	0.466 7	95.07	96.11	0.89
	0.251 8	0.226 0	0.469 0	96.09		
	0.251 8	0.226 0	0.470 0	96.53		
	0.251 8	0.158 2	0.403 7	95.99		
	0.251 8	0.158 2	0.403 1	95.64		
	0.251 8	0.158 2	0.402 4	95.21		
	0.251 8	0.271 2	0.517 4	97.94		
	0.251 8	0.271 2	0.513 5	96.50		
	0.251 8	0.271 2	0.512 2	96.02		
槐定碱	5.240 6	3.073 2	8.431 6	103.83	104.13	0.79
	5.240 6	3.073 2	8.395 4	102.66		
	5.240 6	3.073 2	8.453 4	104.54		
	5.240 6	2.151 2	7.484 4	104.30		
	5.240 6	2.151 2	7.453 4	102.86		
	5.240 6	2.151 2	7.495 7	104.83		
	5.240 6	3.687 8	9.098 8	104.62		
	5.240 6	3.687 8	9.106 4	104.83		
	5.240 6	3.687 8	9.099 9	104.65		
氧化苦参碱	1.181 7	0.644 4	1.801 9	96.24	96.12	1.02
	1.181 7	0.644 4	1.797 3	95.54		

续表 2

生物碱	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均回收率 /%	回收率 RSD /%			
生物碱	1.181 7	0.644 4	1.799 3	95.85	96.07	2.03			
	1.181 7	0.451 1	1.618 1	96.74					
	1.181 7	0.451 1	1.618 6	96.85					
	1.181 7	0.451 1	1.622 9	97.81					
	1.181 7	0.773 3	1.916 9	95.08					
	1.181 7	0.773 3	1.927 4	96.43					
	1.181 7	0.773 3	1.912 7	94.53					
	氧化槐果碱	0.402 7	0.216 8	0.608 5			94.93	96.07	2.03
		0.402 7	0.216 8	0.609 0			95.16		
		0.402 7	0.216 8	0.609 9			95.57		
0.402 7		0.151 8	0.556 0	100.99					
0.402 7		0.151 8	0.549 2	96.51					
0.402 7		0.151 8	0.548 5	96.05					
0.402 7		0.260 2	0.650 1	95.08					
0.402 7		0.260 2	0.652 1	95.85					
0.402 7		0.260 2	0.648 5	94.47					
苦参碱		1.111 5	0.809 6	1.952 8	103.92	102.79	1.29		
	1.111 5	0.809 6	1.940 6	102.41					
	1.111 5	0.809 6	1.943 5	102.77					
	1.111 5	0.566 7	1.694 5	102.87					
	1.111 5	0.566 7	1.698 5	103.59					
	1.111 5	0.566 7	1.703 5	104.48					
	1.111 5	0.971 5	2.095 6	101.30					
	1.111 5	0.971 5	2.117 5	103.56					
	1.111 5	0.971 5	2.085 4	100.25					
槐果碱	0.127 5	0.066 4	0.196 1	103.26	102.81	1.22			
	0.127 5	0.066 4	0.196 5	103.88					
	0.127 5	0.066 4	0.195 6	102.55					
	0.127 5	0.046 5	0.174 7	101.55					
	0.127 5	0.046 5	0.175 9	104.11					
	0.127 5	0.046 5	0.174 7	101.46					
	0.127 5	0.079 7	0.210 6	104.32					
	0.127 5	0.079 7	0.209 7	103.20					
	0.127 5	0.079 7	0.207 9	100.93					
	莱曼碱	0.126 4	0.072 4	0.200 1			101.83	102.03	1.92
0.126 4		0.072 4	0.199 6	101.15					
0.126 4		0.072 4	0.201 4	103.61					
0.126 4		0.050 7	0.179 2	104.18					
0.126 4		0.050 7	0.177 3	100.49					
0.126 4		0.050 7	0.178 2	102.29					
0.126 4		0.086 9	0.216 7	103.98					
0.126 4		0.086 9	0.215 6	102.72					
0.126 4		0.086 9	0.211 6	98.04					

2.9 样品的测定 精密称取苦豆子总碱样品,按2.3项下的方法制备供试品溶液,按上述色谱条件,

进样测定,按外标法计算百分含量。结果见表3。

表3 苦豆子总碱含量

批号	野靛碱	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	总碱	%
110509	0.73	2.03	42.26	9.53	3.25	8.96	1.03	1.02	68.80	
110409	0.95	2.26	40.06	10.81	2.22	8.79	0.59	0.54	66.22	
110715	0.82	0.90	33.02	5.72	0.93	22.30	0.57	0.81	65.07	
均值	0.83	1.73	38.45	8.69	2.13	13.35	0.73	0.79	66.70	

3 讨论

分别采用了以下色谱条件①0.01 mol·L⁻¹磷酸盐(pH 8.5)-甲醇(78:22)^[9];②乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(2.0 mL·L⁻¹三乙胺)梯度洗脱^[10];③乙腈-0.2%磷酸水梯度洗脱^[11],结果以②的分离效果最好,但是苦豆碱分离度达不到1.5,故调整了流动相比例,减少乙腈用量,苦豆碱的分离度有改善。提高柱温,苦豆碱峰分离比较好,达到1.5,故采用柱温35℃检测。流动相的pH对生物碱的出峰时间影响比较大,分离度也受影响,按照条件②配制流动相,pH不恒定,出峰时间变化比较大,改用三乙胺调pH>6.45,相同的pH值出峰时间比较恒定,而且分离度能够达到1.5以上,8种生物碱分离较好。

比较不同波长下的吸收峰面积,以205 nm下的峰面积较大,最稳定,故选择205 nm作为检测波长。

苦豆子总碱中生物总碱的含量>95%,检测的8种生物碱总量在65%左右,>50%,该方法可以作为含量测定方法取代原标准中的滴定法,使苦豆子总碱的检测方法更精确。

不同批次的苦豆子总碱中各个生物碱含量的差别比较大,但是总碱含量差别不大。

[参考文献]

[1] 牟新利,王武宝,巴杭,等. 中药苦豆子化学成分及生理活性的研究进展[J]. 新疆师范大学学报,2005,24

(1):45.

[2] 刘军,熊元君,李勇,等. 苦豆子研究近况[J]. 新疆中医药,2006,24(6):60.

[3] 焦河玲,邓虹珠,王晓娟,等. 苦豆子总碱对S180荷瘤小鼠的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):163.

[4] 杨巧丽,黄华,王雪,等. 苦豆子提取物急性毒性的测定及对实验性肝损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(12):68.

[5] 田真真,万红娇,杨翠萍. 槐定碱的药理研究综述[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):219.

[6] 赵旭,刘卫红,吴冬梅. 阿娜尔妇洁液制备工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):15.

[7] 国家卫生部. 苦豆子总碱质量标准[S]. 编号:WS-10001(HD-1391)-2003.

[8] 梁样红,刘颖男,陈光晓,等. 苦豆子生物碱的提取方法[J]. 吉林医药学院学报,2008,29(3):168.

[9] 田菁,范欣戎,李晓东,等. HPLC法定性定量分析苦豆草药材中多个生物碱成分[J]. 药物分析杂志,2010,30(5):810.

[10] 马玲,王俊卿,田杰,等. HPLC同时测定苦豆草中7种生物碱的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(11):1483.

[11] 古丽娜·沙比尔,吴韬,阿吉艾克拜尔·艾萨,等. 苦豆子HPLC色谱指纹图谱研究[J]. 中药材,2008,31(1):38.

[责任编辑 顾雪竹]