

# 愈肠宁胶囊中苦参提取物的生物碱类成分指纹图谱分析

向孙敏<sup>1</sup>, 韩丽<sup>1\*</sup>, 刘李梅<sup>1</sup>, 张超<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 谢兴亮<sup>2</sup>

(1. 成都中医药大学, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;  
2. 成都医学院药学院, 成都 610083)

**[摘要]** 目的: 建立愈肠宁胶囊中苦参提取物生物碱类成分的 HPLC 指纹图谱的检测方法。方法: 采用 Kromasil NH<sub>2</sub> 氨基柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-乙醇(8:1)-3% 磷酸水梯度洗脱, 流速 0.8 min · mL<sup>-1</sup>, 检测波长 220 nm, 对 10 批苦参提取物进行 HPLC 指纹图谱检测, 采用“中药色谱指纹图谱评价系统 2004 年版”进行评价。结果: 苦参提取物采用氨基柱各峰分离效果好, 确定了 15 个共有峰, 并对其中 4 个色谱峰进行了指认, 10 批提取物的相似度均 > 0.9, 提取物与药材指纹图谱间存在相关性。结论: 该方法精密度高、重复性、稳定性较好, 为苦参提取物的质量控制提供了一种检测方法。

**[关键词]** 苦参; 提取物; 生物碱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0013-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013140013

## Fingerprint Analysis of Alkaloids from Extract of *Sophora flavescens* in Yuchangning Capsules

XIANG Sun-min<sup>1</sup>, HAN Li<sup>1\*</sup>, LIU Li-mei<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, XIE Xing-liang<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory Breeding Base of System Research and Development Utilization of Chinese Materia Medica Resources, Chengdou University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;  
2. Pharmaceutical College of Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

**[收稿日期]** 20121228(020)

**[基金项目]** 国家科技重大专项“十二五”重大新药创制项目(2012ZX09102201-103)

**[第一作者]** 向孙敏, 在读硕士, 从事中药新技术、新工艺、新制剂研究, Tel: 13708006953, E-mail: 553121616@qq.com

**[通讯作者]** \* 韩丽, 教授, 硕士生导师, 从事中药新技术、新工艺、新制剂研究, Tel: 028-61800127, E-mail: hanliyx@163.com

测定西红花苷类含量时应尽可能快<sup>[4]</sup>。按优化的炮制工艺得到的焦栀子中西红花苷-I 和 西红花苷-II 含量很低, 与文献报导一致<sup>[5]</sup>。研究表明, 栀子中西红花苷类以西红花苷-I 为主, 西红花苷-I 在大鼠口服给药后, 是以代谢物西红花酸的形式吸入血分的<sup>[6]</sup>, 西红花酸具有抗凝血作用<sup>[7]</sup>, 而栀子炒焦使西红花苷类分解生成西红花酸<sup>[8]</sup>, 因此推断, 栀子炒焦后止血作用的增强是由于西红花酸含量的增加<sup>[9]</sup>。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 231.  
[2] 邓翀, 颜永刚. 多指标综合评价优选大血藤酚酸类化合物的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 12.

[3] 付小梅, 王峥涛. 西红花苷-I 的稳定性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 71.  
[4] 罗光明, 陈岩, 李霞, 等. 不同居群品系栀子中栀和西红花苷-I 含量的比较研究[J]. 中药材, 2010, 33(9): 1378.  
[5] 张村, 肖永庆, 李丽, 等. 不同栀子饮片二帖色素类成分比较研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(21): 2471.  
[6] 张颖, 刘建勋, 林力, 等. 大鼠口服西红花苷-I 后吸收入血成分及药动学[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(2): 136.  
[7] 徐沁蕾, 钱之玉. 西红花酸抗凝血和抗血栓形成作用的实验研究[J]. 中草药, 2008, 38(1): 89.  
[8] 张学兰, 徐苹, 李彬. 炮制对栀子中色素类成分含量的影响[J]. 中国现代中药, 2009, 11(7): 38.  
[9] 李文, 张村, 陈红, 等. 藏红花酸糖苷-I、藏红花酸药理学比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(12): 24.

[责任编辑 全燕]

**[ Abstract ] Objective:** To establish HPLC fingerprint detection for alkaloids from extract of *Sophora flavescens* in Yuchangning capsules. **Method:** Amino Kromasil NH<sub>2</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted, gradient eluted with mobile phase of acetonitrile-ethanol (8:1) -3% phosphoric acid water, flow rate was 0.8 min · mL<sup>-1</sup>, detection wavelength was 220 nm. 10 batches of extract of *S. flavescens* were detected by HPLC fingerprint, then evaluated with 2004 edition of 'chromatographic fingerprint evaluation system of Chinese medicine'. **Result:** By taking Kromasil NH<sub>2</sub> column, peaks separation of extract of *S. flavescens* was better, identified 15 common peaks and 4 of them were assigned. Similarity of these 10 batches extract was more than 0.9, correlation between fingerprints of extract and raw materials existed. **Conclusion:** This method had good precision, repeatability and stability, it could provide a detection method for quality control of extract of *S. flavescens*.

**[ Key words ]** *Sophora flavescens*; extract; alkaloids; fingerprint

愈肠宁胶囊是本实验室自制的胃-结肠分释靶向胶囊剂,由黄芪和苦参组成,主要治疗溃疡性结肠炎。黄芪益气健脾升阳,敛疮生肌以治其本;苦参清热燥湿、祛风止痒,治热痢便血以治其标;两药合用,具有清热燥湿、益气健脾、清热解毒之功效,对溃疡性结肠炎有标本兼治、整体局部兼顾之特点<sup>[1]</sup>。苦参有效组分制备成结肠定位释药系统,直达病灶治疗结肠炎,同时避免了苦参的苦寒伤胃副作用。苦参主要含有生物碱、黄酮、皂苷类成分,该制剂中主要是其生物碱类成分发挥消炎、抗菌等作用,研究证实了苦参碱和氧化苦参碱能有效地对抗三硝基苯磺酸诱导建立大鼠溃疡性结肠炎模型<sup>[2-3]</sup>。为该胶囊的制剂成型,将苦参经 60% 乙醇渗漉,以苦参总碱和苦参碱氧化苦参碱为指标,渗漉液通过 AB-8 型大孔吸附树脂进行分离、纯化,最终得到苦参提取物。为保证该制剂的有效性和工艺稳定性,本实验对生物碱类的指纹图谱进行研究,同时分析苦参提取物和药材指纹图谱的相关性,追踪有效成分变化,以保证制剂的成分可控、疗效安全,为该制剂中生物碱类成分的质量控制提供实验依据。

## 1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),FA1104 型 1/万电子天平(上海天平仪器厂),AE240 型 1/10 万电子天平(德国 Mettler 公司)。苦参碱(批号 110805-200508)、氧化苦参碱(批号 110780-201007)、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱(批号 110784-20303)均购自中国药品生物制品检定所,苦参(产地四川,购自四川科伦天然药业有限公司,批号 101003,经成都中医药大学药学院中药鉴定教研室裴瑾教授鉴定豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根),乙腈、乙醇为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱 0.011 20, 0.015 32, 0.013 4, 0.016 6 g, 分别置于 10 mL 量瓶中,加乙腈-甲醇(8:2)稀释至刻度,分别精密吸取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,用乙腈-甲醇(80:20)稀释至刻度,混匀,即得混合对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 精密称取苦参提取物干膏粉末 0.1 g,加 25 mL 乙醇超声提取,过滤,定容至 50 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,精密吸取 4 mL 至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得。

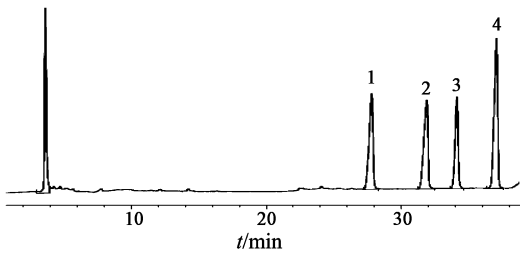
**2.3 药材供试品溶液的制备** 精密称取苦参粗粉 1.006 g,加入氨水-乙醇(2:3)2 mL 浸渍 0.5 h,加入三氯甲烷 100 mL,于约 70 °C 回流提取 1 h,冷却,滤过,挥干溶剂,残渣用无水乙醇定容至 10 mL 量瓶中,精密吸取 6 mL 至 10 mL 量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,即得。

**2.4 色谱条件** Kromasil NH<sub>2</sub> 氨基柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈-乙醇(8:1, A) -3% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱(0 ~ 25 min, 100% ~ 90% A; 25 ~ 45 min, 90% ~ 80% B; 45 ~ 55 min, 80% ~ 100% A; 55 ~ 60 min, 100% A),流速 0.8 min · mL<sup>-1</sup>,检测波长 220 nm,进样量 10 μL,柱温 30 °C,见图 1。

**2.5 指纹图谱中参照物的选择** 采用外标法对照,图谱中保留时间约 36 min 的色谱峰为氧化苦参碱,其色谱峰与其他的峰分离良好,且保留时间适中,故采用此峰为参照峰。

## 2.6 方法学考察

**2.6.1 精密度试验** 取 2.2 项下供试品溶液,连续进样 6 次,考察色谱峰的相对保留时间和峰面积,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1%,



1. 槐果碱; 2. 苦参碱; 3. 氧化槐果碱; 4. 氧化苦参碱

图1 混合对照品 HPLC

相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 表明仪器精密度良好。

**2.6.2 重复性试验** 按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 表明该方法重复性良好。

**2.6.3 稳定性试验** 取 2.2 项下供试品溶液, 分别于室温放置 0, 2, 4, 8, 16 h 后进样测定, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 说明生物碱类成分于室温放置 16 h 内基本稳定。

## 2.7 指纹图谱的建立与分析

**2.7.1 样品指纹图谱的测定** 分别称取 10 批提取物 (S1 ~ S10) 适量, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样, 记录 60 min 的

HPLC, 见图 2。

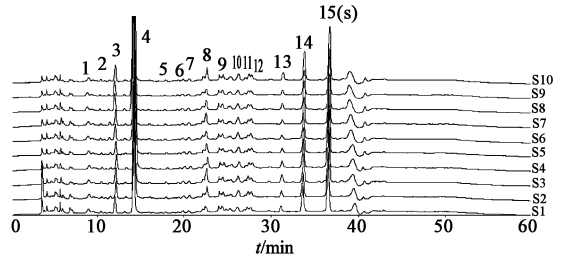


图2 10批苦参提取物的 HPLC 指纹图谱

**2.7.2 色谱峰的指认** 采用对照品对照和在线紫外吸收光谱图对比, 分别指认出 4 个色谱峰, 依次为 12 号峰 (槐果碱), 13 号峰 (苦参碱), 14 号峰 (氧化槐果碱), 15 号峰 (氧化苦参碱)。

**2.7.3 共有峰的标定与确认** 将 10 批苦参提取物的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年版”软件, 设定匹配模板, 进行谱峰多点校正, 并生成对照指纹图谱, 见表 1。结果确定了比较稳定的共有峰 15 个, 10 批苦参提取物的相似度均 > 0.9, 平均相似度 0.961 6, 表明所建立的指纹图谱技术指标稳定, 大孔吸附树脂纯化工艺重复性良好。

**2.7.4 苦参提取物指纹图谱与其药材相关性** 苦参提取物和苦参药材的 HPLC 指纹图谱见图 3。结

表1 10批苦参提取物的指纹图谱共有峰相似度比较

共有峰	$t_R$ /min	峰面积										保留时间 RSD/%	保留峰面积 RSD/%
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	9.0	154.5	129.8	141.1	113.3	129.2	151.1	131.1	126.2	134.3	151.7	0.89	9.69
2	10.9	31.9	30.1	29.3	29.7	29.8	31.7	26.5	32.0	31.9	33.4	0.83	6.36
3	12.1	255.5	227.9	218.6	183.1	229.7	218.2	239.6	212.2	245.0	243.7	0.54	9.13
4	14.2	1700.5	2327.5	2074.8	1885.9	1774.8	1953.2	2065.9	1726.7	2322.4	2411.4	0.70	12.91
5	17.9	19.6	30.2	26.4	33.9	21.7	25.8	27.4	24.4	35.1	33.5	0.55	18.96
6	19.9	49.3	50.4	50.6	53.6	49.5	49.2	51.5	47.5	53.6	50.4	0.41	3.82
7	20.6	52.1	48.4	48.5	55.5	49.9	53.7	48.8	41.2	50.5	46.9	0.37	7.95
8	24.5	112.6	115.9	115.5	107.8	104.9	106.5	118.5	100.3	123.0	117.8	0.21	6.35
9	25.4	89.9	80.7	78.2	73.1	64.5	66.2	72.7	66.4	77.3	69.9	0.20	10.62
10	26.2	184.3	170.6	158.6	159.5	150.9	176.9	152.6	120.6	167.2	161.5	0.17	10.89
11	27.0	45.2	54.9	51.7	43.7	38.0	48.2	50.3	41.2	63.7	56.8	0.19	15.72
12	27.4	95.7	109.6	96.2	68.9	63.0	75.5	86.8	68.1	111.9	110.1	0.17	21.26
13	31.3	103.6	132.4	118.8	81.4	73.9	73.2	96.7	73.8	134.3	153.9	0.20	28.18
14	33.8	406.9	456.9	449.2	532.3	556.8	428.8	461.4	399.6	467.3	593.3	0.17	13.62
15	36.7	821.0	967.9	935.5	952.2	984.7	927.9	975.7	846.5	984.1	108.9	0.19	19.56
相似度	0.911	0.930	0.959	0.947	0.943	0.977	0.982	0.983	0.984	1.000			

果发现, 苦参药材中 1, 2, 3, 4, 5 处的色谱峰在提取物的相应位置也存在, 说明苦参药材和提取物指纹图谱间存在相关性。

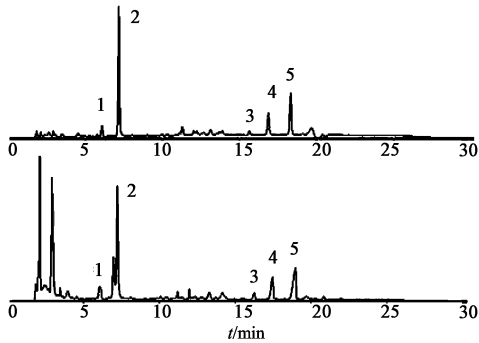


图 3 苦参提取物和苦参药材的 HPLC 指纹图谱

### 3 讨论

供试品溶液制备时, 曾考察了药材粉末加氨水-乙醇(3:2)浸渍 0.5 h 后用三氯甲烷于 70 °C 回流法<sup>[4]</sup>、50% 甲醇超声法、50% 甲醇回流法、85% 乙醇回流法<sup>[5]</sup>, 三氯甲烷加氨水主要提取到生物碱类成分, 50% 甲醇回流法和 85% 乙醇回流法提取时杂质较多, 50% 甲醇超声法提取不完全, 故采用三氯甲烷-氨水回流法提取苦参生物碱类成分, 以保证药材与提取物 HPLC 指纹图谱的相关性。

选取检测波长时, 曾对样品进行全波长扫描, 同时对文献中提供的 210, 280, 220 nm 处进行分析, 结果由于苦参生物碱多为喹诺里西啶类结构<sup>[6]</sup>, 无共轭结构, 当 210 nm 为检测波长时, 由于末端吸收, 基线易受影响; 280 nm 处检测的色谱峰少; 而在 220 nm 处检测, 显示基线较稳定, 色谱峰较多, 信息丰富, 故选择 220 nm 为检测波长<sup>[7-9]</sup>。

考察甲醇、乙醇作为溶剂超声溶解苦参提取物对指纹图谱中色谱峰影响, 结果发现二者的影响较小, 结合试验成本和安全性考虑, 选用乙醇为提取物溶剂。预试验采用乙腈、乙醇、3% 磷酸通过 3 个泵混合洗脱, 结果基线漂移严重, 后将乙腈和乙醇(8:1)超声混合作为有机相, 3% 磷酸作为水相进行梯度洗脱, 结果基线较稳定, 这可能是仪器混合不匀造成的。

### [参考文献]

- [1] 赵强强, 韩丽, 王森, 等. 愈肠宁复方释药系统的研究思路[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 258.
- [2] 谢兴亮, 杨明, 韩丽. pH 敏感双层型苦参结肠靶向微丸在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 128.
- [3] 熊永爱, 韩丽, 苏娟, 等. 氧化苦参碱干预 IkB- $\alpha$  蛋白对溃疡性结肠炎的治疗作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 129.
- [4] 黄颖, 王乃平, 陈勇. 广西产山豆根 HPLC 指纹图谱测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 66.
- [5] 徐今宁, 蒋贵显, 汤建华. 苦参药材高效液相指纹图谱分析方法研究[J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2008, 25(2): 15.
- [6] 赵华, 宋敏, 赵画, 等. 苦参药材生物碱成分的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(2): 139.
- [7] 纪瑛. 苦参化学成分指纹图谱[J]. 中成药, 2010, 32(4): 535.
- [8] 韩颂, 于喜水, 赵敏. 苦参药材质量标准的研究[J]. 中医药学报, 2009, 37(2): 40.
- [9] 陈磊, 刘怡, 梁生旺. 苦参化学成分研究[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(5): 471.

[责任编辑 仝燕]

## 欢迎订阅 2014 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管, 中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物, 已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”; “中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊; 并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月, 本着提高为主, 提高与普及相结合的办刊方针, 主要设置: 工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目, 交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药, 尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者, 以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊, 16 开本, 350 页, 标准刊号: ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期定价 35 元, 全年 840 元。国内外公开发行, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号: 2-417; 国外由中国国际图书贸易总公司办理发行, 代号: SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 《中国实验方剂学杂志》编辑部, 邮编: 100700, 联系电话: (010)84076882, 电子邮件: syfjx\_2010@188.com, 网址: www.syfjxzz.com。