

HPLC 测定苦豆子不同部位中苦豆碱的含量

魏蕾初¹, 邓虹珠^{1*}, 张丽¹, 刘振龙², 易延逵¹

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

[摘要] 目的: 建立苦豆子中苦豆碱的 HPLC 法; 对苦豆子药材不同部位中苦豆碱含量进行考察, 确定药材最佳采收部位。方法: 采用 Kromasil NH₂ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-无水乙醇-3% 磷酸水溶液 (70:15:15) 为流动相, 检测波长 205 nm, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 苦豆碱的线性范围为 11.21 ~ 224.20 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$), 平均回收率 ($n=6$) 98.18% (RSD 4.1%); 苦豆子叶、茎中苦豆碱含量分别为 0.38%、0.02%, 豆荚、花及种子中不含苦豆碱。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 可以作为苦豆子中苦豆碱的含量测定方法; 研究结果显示苦豆碱在叶子中含量最高, 可以将叶子作为提取分离苦豆碱的最佳药材部位。

[关键词] 苦豆子; 苦豆碱; 高效液相色谱法; 药用部位; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0140-04

Determination of Aloperine in Different Parts of *Sophora alopecuroides* by HPLC

WEI Lei-chu¹, DENG Hong-zhu^{1*}, ZHANG Li¹, LIU Zhen-long², YI Yan-kui¹

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC for determination of aloperine in *Sophora alopecuroides* and investigate the content of aloperine in different medicinal parts of *S. alopecuroides* to define an optimum harvest part. **Method:** The separation was carried out on a Kromasil NH₂ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); the mobile phase was acetonitrile-absolute alcohol-3% phosphonic acid water solution (70:15:15); the detective wavelength was set at 205 nm. The column temperature was at kept at 25 °C; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The linear ranges of aloperine was 11.21-224.20 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) and the average recovery ($n=6$) was 98.18% (RSD 4.1%). The content of aloperine in leaf and stem was 0.38% and 0.02% respectively. However, aloperine was not detected in seed, legume and flower. **Conclusion:** The method is simple, accurate with good repeatability. It can be used as a method for determination of aloperine in *S. alopecuroides*; the results show that leaf has the highest content of aloperine. Hence, leaf is the optimum harvest part for aloperine extraction and separation.

[Key words] *Sophora alopecuroides*; aloperine; HPLC; medicinal part; determination

[收稿日期] 0120919(007)

[第一作者] 魏蕾初, 硕士生, 从事中药、天然药物成分分析及质量控制研究, Tel: 020-62789106, 15013155144, E-mail: tottiroma@126.com

[通讯作者] * 邓虹珠, 博导, 主任药师, 从事中药新药及中药保健品研究和开发, Tel: 020-62789106, E-mail: denghongzhu@126.com

苦豆子是豆科槐属植物, 其味苦、性寒, 具清热燥湿、止痛、杀虫等功用^[1], 药用根、根茎、全草及种子, 在西北民间用于治疗痢疾、肠炎、喉炎等杂症。苦豆碱 (aloperine) 是从豆科槐属植物苦豆子中提取的一种喹诺里西定类生物碱。药理研究结果表明, 苦豆碱对多种致炎剂引起的急性炎症和 III、IV 型变态反应及佐剂关节炎有显著的抑制

作用^[2-4],此外还具有良好的抗肿瘤、抗病毒、抑菌、抗心律失常等作用^[5-8]。关于苦豆子药材中苦参碱、槐定碱、氧化苦参碱等喹啉里西啶类生物碱的研究已有报道^[9-16],但有关苦豆碱在苦豆子药材不同部位含量差异的研究尚未见报道。本研究建立了苦豆子中苦豆碱的HPLC测定法,并对药材不同部位的苦豆碱含量进行测定,确定了苦豆碱含量最高的部位,为苦豆子中苦豆碱的含量测定以及最佳药材部位的选择提供科学的依据。

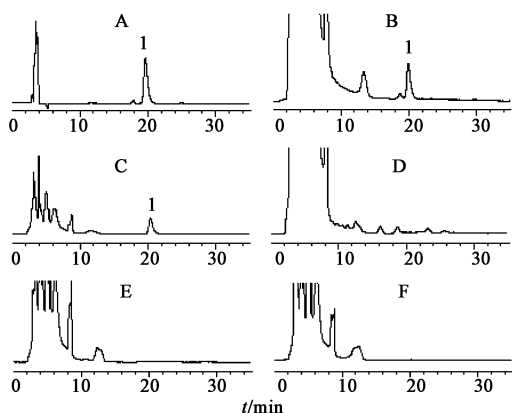
1 材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, Sartorius CP225D 型电子天平(感量 0.1 mg/0.01 mg), KQ-250DB 型超声波清洗器, TU-11901 型紫外分光光度计。

苦豆碱对照品购自宁夏紫荆花药业有限公司,经波谱分析鉴定结构,HPLC 面积归一化法检测纯度 >98.0%。甲醇、乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂为分析纯。苦豆子药材分别 2011 年 5 月上旬、6 月上旬及 8 月上旬采集于宁夏盐池县,经宁夏紫荆花药业有限公司主任药师杜盐婷鉴定为豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 地上部分,花采收于 6 月上旬,种子采收于 9 月中旬,自然阴干,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil NH₂ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-无水乙醇-3% 磷酸水溶液(70:15:15),检测波长 205 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。理论塔板数不低于 4 000。见图 1。



A. 对照品;B. 叶;C. 茎;D. 种子;E. 豆荚;F. 花;1. 苦豆碱
图 1 苦豆子叶、茎、花、豆荚、种子以及对照品的 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称定苦豆碱对照品

11.21 mg 置 100 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容至 100 mL,摇匀,得苦豆碱浓度为 112.10 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取粉碎至一定粒度(过 40 目筛)的苦豆子叶、茎、花、种子、豆荚细粉约 0.5 g,分别置 25 mL 量瓶中,加氨水 1 mL,浸润 30 min,加入甲醇 25 mL,精密称定,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)30 min,放置至室温,用甲醇补足减失质量,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察 按 2.2 项下对照品溶液配制方法,配制质量浓度为 11.21,56.05,112.1,168.15,224.2 mg·L⁻¹ 的一系列对照品溶液,分别吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,所得苦豆碱的回归方程为 $Y = 9.1419X - 35.226$ ($r = 0.9999$)。结果表明,苦豆碱在 11.21 ~ 224.20 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取 2.2 项下对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测得苦豆碱峰面积的 RSD 0.54%。

2.6 重复性试验 按 2.3 项下的供试品溶液的制备方法制备苦豆子叶(采集于 5 月上旬)的供试品溶液 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样,测定,苦豆碱质量分数的 RSD 2.27%。

2.7 稳定性试验 精密吸取 2.3 项下制备的苦豆子叶(采集于 5 月上旬)供试品溶液,在室温下,分别于 0,4,8,12,16,24 h 按 2.1 项下色谱条件进样,测定峰面积,苦豆碱的 RSD 1.41%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取苦豆子叶(采集于 5 月上旬)细粉 0.25 g,共 6 份,置 25 mL 量瓶中,加 1 mL 氨水浸润 30 min 后,分别精密加入 2.2 项下的对照品溶液 5 mL(相当于对照品 0.5605 mg),用甲醇定容至 25 mL,密塞,精密称定,超声处理 30 min,放置至室温,用甲醇补足减失质量,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得加样回收样品液。按上述色谱条件进样测定,计算得苦豆碱的平均回收率为 98.18%,RSD 4.10%,结果见表 1。

2.9 样品含量测定 按 2.3 项下方法分别制备苦豆子茎、叶、花、种子、豆荚样品溶液各 2 份,按 2.1 项下色谱条件进样分析(图 1),以外标法计算苦豆碱的含量,表 2。

表 1 苦豆碱的加样回收率试验 (n = 6)

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.594 5	0.560 5	1.154 9	99.98	98.18	4.10
2	0.586 4	0.560 5	1.107 9	93.03		
3	0.597 0	0.560 5	1.164 2	101.20		
4	0.590 3	0.560 5	1.122 4	94.93		
5	0.589 5	0.560 5	1.130 0	96.44		
6	0.597 4	0.560 5	1.177 6	103.53		

表 2 苦豆子不同药用部位苦豆碱的质量分数 (n = 3) %

部位	采收月份	苦豆碱
叶子	5 月上旬	0.41
	6 月上旬	0.38
	8 月上旬	0.36
茎	5 月上旬	0.03
	6 月上旬	0.02
	8 月上旬	0.02
花	6 月上旬	-
豆荚	9 月中旬	-
种子	9 月中旬	-

注：“-”表示不含苦豆碱。

3 讨论

取用甲醇溶解的苦豆碱对照品溶液,以甲醇为空白,在 200 ~ 400 nm 进行光谱扫描,可见苦豆碱在 205 nm 波长处有最大吸收,因此选择 205 nm 作为检测波长。

曾尝试用 C₁₈ 色谱柱,分别以①甲醇/乙腈-水-三乙胺;②甲醇/乙腈-0.2% 磷酸水;③甲醇/乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(2.0 mL·L⁻¹三乙胺)为流动相进行等度、梯度洗脱以及流动 pH 的调整,结果发现苦豆碱在 C₁₈ 柱上保留性很弱,出峰较早与杂质难以达到分离,而且拖尾严重,可能与苦豆碱相对于其他喹啉里西啶类生物碱而言具有较特殊的化学结构有关。后期改用 NH₂ 柱后,苦豆碱具有较强的保留性,而且能有效的克服拖尾现象,在本实验条件下,苦豆碱与杂质达到基线分离,基线稳定。

因生物碱溶于稀酸水、醇类以及亲脂性有机溶剂,分别以 0.1% 盐酸溶液、氯仿、甲醇为提取溶剂,结果甲醇的提取效率较高,杂质干扰较少,在提取之前用适量碱水浸润药材粉 30 min,提取效果更好;分别对冷浸、超声、回流提取进行比较,测得超声提取

苦豆碱含量较高;对超声时间(20,30,40 min)也进行了考察,发现超声 30 min 已能将苦豆碱基本提取完全。因此采用甲醇超声提取 30 min(提取之前加适量氨水浸润药材粉 30 min),作为提取方法。

从苦豆子中提取的苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱等生物碱,国内已形成产业化,其相应的制剂已应用于临床^[17]。但对在抗炎、抗肿瘤、抗病毒等方面有良好药理活性的苦豆碱的开发尚处于起步阶段。本研究结果表明,苦豆碱在叶子中含量最高,茎中次之;而在花、豆荚及种子中则不含苦豆碱。因此,在今后苦豆碱的开发过程中,可以以叶子作为最佳采收部位,达到药材药用部位的高效、科学合理利用。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海:上海人民出版社,1977.
- [2] 周重楚,高洪波,孙晓波,等. 苦豆碱的抗炎、抗变态反应作用 [J]. 中国药理学报,1989,10(4):360.
- [3] 王晓娟,邓虹珠,姜斌,等. 苦豆碱对急性期溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用 [J]. 中国新药杂志,2010,19(10):877.
- [4] Yuan X Y, Ma H M, Li R Z, et al. Topical application of aloperine improves 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 658(2/3):263.
- [5] Lin Z, Huang C F, Liu X S, et al. *In vitro* anti-tumour activities of quinolizidine alkaloids derived from *Sophora flavescens* Ait [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 108(5):304.
- [6] 焦河玲. 苦豆碱抗结肠癌的作用及机制研究 [D]. 广州:南方医科大学,2011.
- [7] 周福生,穆青. 野生植物苦豆子的化学成分和主要药理作用 [J]. 中国野生植物资源,2006,25(4):1.
- [8] 冯慧,周远鹏. 苦豆子八种生物碱抗心律失常作用研究概况 [J]. 中药药理与临床,2000,16(3):47.
- [9] 任衍菊,张玉萍,金敏,等. 氧化苦参碱体外抗乙型肝炎病毒作用 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):175.
- [10] 彭燕,韩凌,孙静,等. 氧化苦参碱对结肠癌 LoVo 细胞 c-myc, PSMD9, CDK4 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):220.
- [11] 田真真,万红娇,杨翠萍,等. 槐定碱对内毒素致急性肺损伤小鼠免疫调节及抗氧化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):179.
- [12] 杨文远,杨宁莲,王天勇. HPLC 法同时测定苦豆子中的苦参碱与氧化苦参碱 [J]. 宁夏大学学报:自然科学版,1996,17(4):13.

独藤丸质量标准研究

谢暎^{1*}, 赵庆华², 巩伟²

(1. 山东省交通医院, 济南 250031; 2. 济南军区联勤部药品仪器检验所, 济南 250022)

[摘要] 目的: 建立独藤丸质量标控制方法, 为进一步扩大应用提供参考。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对独藤丸中独活、桑寄生、茯苓、甘草药材进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法(HPLC)测定独藤丸中蛇床子素的含量。结果: TLC 定性鉴别斑点清晰, 分离度好, 色谱特征明显; HPLC 测定蛇床子素 20~200 mg·mL⁻¹ 呈良好的线性关系($r=0.9997, n=5$), 平均回收率为 99.57%, RSD 2.309%。结论: 方法简便、可靠、专属性强、重复性好、方法准确, 可用于独藤丸的质量控制。

[关键词] 独藤丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 蛇床子素; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0143-03

Study on Quality Specification of Duteng Pills

XIE Jian^{1*}, ZHAO Qing-hua², GONG Wei²

(1. Traffic Hospitals in Shandong Province, Ji'nan 250031, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control, Joint Logistics Department of the Jinan Military Region, Ji'nan 250022, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the quality control of Duteng pills. **Method:** *Pubescent angelica, Loranthus parasiticus, Poria cocos, Glycyrrhiza uralensis* were identified by thin-layer chromatography (TLC). The osthole of Duteng pills was determined by HPLC. **Result:** The characteristic for identification by TLC was distinct. The linear correlation of osthole was good in the range of 20-200 mg·L⁻¹ ($r=0.9997$) ($n=5$) and the recovery was 99.57% (RSD 2.309%). **Conclusion:** The method is convenient and reliable with good specificity and reproducibility. It can be used for the quality control of Duteng pills.

[Key words] Duteng pills; TLC; HPLC; osthole; quality specification

独藤丸是我院药学科研究人员与临床专家经多年实践研制而成的纯中药制剂, 由独活、桑寄生、茯苓、鸡血藤、甘草等 8 味中药经水提浓缩等工艺制备的浓缩丸, 具有止痛、益气、补气血等功效, 临床上用于治疗腰腿疼取得了较好的效果, 但目前尚缺乏该制剂的质量控制标准。本研究对独藤丸组方药物中独

活、桑寄生、茯苓、甘草药物进行了薄层色谱定性鉴别, 同时利用高效液相色谱法对有效成分蛇床子素进行含量测定, 建立了该制剂的质量标准。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 色谱柱为岛津 VP-ODS 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), BSA223S

[收稿日期] 20120707(002)

[通讯作者] * 谢暎, 主管药师, 从事院内制剂研究与临床合理应用分析, Tel: 15253170177, E-mail: xiejian199008@163.com

[13] 古丽娜·沙比尔, 阿吉艾克拜尔·艾萨, 石明辉, 等. HPLC 同时测定苦豆子中槐定碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24):2619.

[14] 徐今宁, 赵秀华. 苦参有效成分的定量分析和药代动力学研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9):69.

[15] 王铁军, 李绍平, 简家荣, 等. 苦参碱抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4):52.

[16] 刘敬霞, 李建生. 苦参及其有效成分治疗失眠症研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11):284.

[17] 杨巧丽, 顾政一, 黄华. 中药苦豆子的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2011, 26(3):232.

[责任编辑 顾雪竹]