

高效毛细管电泳测定小果博落回中血根碱 和白屈菜红碱

肖 竦

(贵阳医学院基础医学院化学教研室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:建立测定小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量的新方法。方法:采用高效毛细管电泳法,盐酸小檗碱为内标,运行缓冲液为 25 mmol·L⁻¹磷酸氢二钠与 25 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠的混合体系(磷酸调 pH 为 7.0)-甲醇(2.5:1);运行电压 18 kV;柱温 25 ℃;检测波长 200 nm。结果:血根碱和白屈菜红碱的线性范围分别为 0.0124 ~ 0.0828 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9998$);白屈菜红碱的线性范围 0.0188 ~ 0.1256 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9996$), 平均加样回收率 ($n = 6$) 分别为 98.7% (RSD 1.01%)、98.4% (RSD 1.27%)。结论:高效毛细管电泳操作简便,分析快速,结果准确、重现性好,适用于小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量的测定。

[关键词] 高效毛细管电泳;小果博落回;血根碱;白屈菜红碱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)14-0087-03

Content Determination of Sanguinarine and Chelerythrine In *Macleaya microcarpa* by HPCE

XIAO Song

(Department of Chemistry, Basic Medical College, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a new method for determination of sanguinarine and chelerythrine in *Macleaya microcarpa* (Maxim). **Method:** Sanguinarine and chelerythrine in *Macleaya microcarpa* were determined by using high performance capillary electrophoresis (HPCE) with berberine as internal standard. The background electrolyte system selected was 25 mmol·L⁻¹ disodium hydrogen phosphate and 25 mmol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate buffer at pH = 7-methanol (2.5:1); applied voltage, 18 kV; temperature, 25 ℃. Diode array detector was set at 200 nm. **Result:** The linear range of sanguinarine and chelerythrine was 0.0124-0.0828 g·L⁻¹ ($r = 0.9998$) and 0.0188-0.1256 g·L⁻¹ ($r = 0.9996$), The average recovery was 98.7% (RSD 1.01%) and 98.4% (RSD 1.27%). **Conclusion:** The method is simple, rapid and reproducible, and could be used for content determination of sanguinarine and chelerythrine In *Macleaya microcarpa*.

[Key words] HPCE; *Macleaya microcarpa*; sanguinarine; chelerythrine

小果博落回 *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde 为罂粟科博落回属植物,为多年生草本植物,分布于长江流域中下游各地。药用带根全草,其味辛、苦,性温,有大毒;有祛风、解毒杀虫、散瘀消肿之功^[1]。近代药理研究表明,主要活性成分为生物碱,包括血根

碱(sanguinarine)、白屈菜红碱(chelerythrine)等^[2]。文献报道测定血根碱和白屈菜红碱的方法主要为高效液相色谱法(HPLC)^[3-4],但分析时间长、试剂成本高、样品处理较繁琐。与 HPLC 相比,毛细管电泳(HPCE)法具有分离速度快、分离效率高、样品及试剂消耗量少和毛细管柱寿命长、容易清洗等优点^[5]。本文采用毛细管电泳法测定了小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量,为其质量控制提供了一种快速、简便有效的检测方法。

[收稿日期] 20110227(006)

[作者简介] 肖竦,副教授,硕士,研究方向:分析化学, Tel: 13595020808, E-mail:454208994@qq.com

1 仪器与试药

HD3D 毛细管电泳仪 (Aglient 公司), 配有二极管阵列检测器; 未涂层熔凝石英毛细管 (河北永年光导纤维厂)。

盐酸, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 氢氧化钠均为分析纯, 甲醇 (色谱纯), 水为重蒸馏水。血根碱 (中国药品生物制品检定所, 110201-200804), 白屈菜红碱 (中国药品生物制品检定所, 110607-200809), 对照品纯度均 $\geq 98\%$ 。

药材 2009 年 10 月分别采集于贵州省贵阳市花溪区, 贵州省贵定县, 贵州省清镇市。经贵阳州医学院民族药与中药开发应用教育部工程研究中心鉴定为小果博落回 *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde。试验前将药材自然风干。

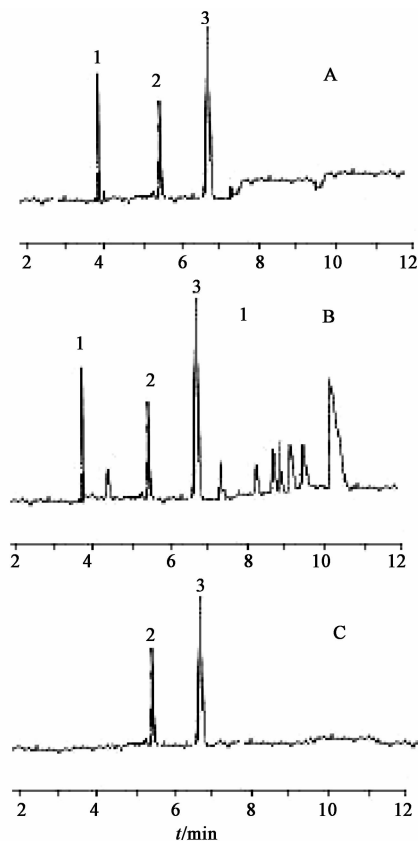
2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品、内标贮备液的制备 精密称取血根碱、白屈菜红碱对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 摇匀, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 甲醇稀释至刻度, 备用, 2 组分的浓度分别为 $0.207, 0.314\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。另称取内标盐酸小檗碱适量, 用甲醇制成 $0.402\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标溶液。测定时精密移取不同量对照品贮备液, 加适量盐酸小檗碱内标液, 用甲醇定容, 得不同浓度标准系列溶液, 按测定条件检测。

2.1.2 供试品溶液 取阴干药材, 磨碎, 过 40 目, 取粉末 1 g, 精密称定。加甲醇 100 mL 超声处理 1 h, 提取 2 次, 过滤, 合并滤液, 滤液水浴蒸干, 所得残渣加稀盐酸 (pH 2) 25 mL 溶解, 滤过, 滤液冷冻干燥, 甲醇溶解并转移至 25 mL 量瓶中, 甲醇稀释至相应刻度, 摇匀。精密吸取 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加入内标溶液 1.5 mL, 用甲醇稀释至刻度, 经微孔滤膜过滤器 ($0.45\ \mu\text{m}$) 过滤, 作为供试品溶液。

2.2 电泳条件 运行缓冲液为 $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠与 $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠的混合体系 (磷酸调 pH 为 7.0)-甲醇 (2.5:1)。柱温 $25\ ^\circ\text{C}$; 电压 18 kV; 采用压进样, 进样压力 10 kPa, 检测波长为 200 nm。柱清洗为每次进样前开机后依次 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 冲洗 10 min, 水冲洗 5 min, 再用运行缓冲溶液冲洗 3 min。进样前样品溶液和运行缓冲溶液过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 并超声脱气。在上述条件下, 样品得到满意的分离, 结果见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 未加内标对照品;
1. 盐酸小檗碱; 2. 血根碱; 3. 白屈菜红碱

图 1 毛细管电泳色谱图

2.3 线性关系 分别吸取对照品溶液贮备液 1.5, 3.0, 4.5, 6.5, 8.5, 10 mL, 内标贮备液 1.5 mL 于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得不同浓度标准系列溶液, 按测定条件检测。以对照品浓度 (X) 为横坐标, 对照品峰面积与内标峰面积比值 (Y) 为纵坐标作回归曲线, 得回归方程血根碱 $Y = 41.31X + 0.011$ ($r = 0.9998$), 线性范围 $0.0124 \sim 0.0828\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。白屈菜红碱 $Y = 25.647X + 0.171$ ($r = 0.9996$), 线性范围 $0.0188 \sim 0.1256\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 稳定性试验 取供试品溶液分别在 0, 2, 8, 12, 24 h 分别进样测定血根碱和白屈菜红碱峰面积与内标峰面积比值, 计算 RSD 为 1.37%, 1.12%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 2.0 mL, 内标贮备液 1.5 mL 于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容。重复进样 5 次, 测定血根碱和白屈菜红碱峰面积与内标峰面积比值, 计算 RSD 为 1.12%, 0.71%。

2.6 重现性试验 对同一批样品 6 份, 按照上述方法分别制备样品供试液, 测定。结果小果博落回中

血根碱和白屈菜红碱平均含量为 1.53, 3.357 mg·g⁻¹, RSD 为 1.01%, 0.87%。试验结果表明, 重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量小果博落回(血

根碱和白屈菜红碱的含量分别为 1.53, 3.357 mg·g⁻¹) 6 份, 每份 0.5 g, 精确加入对照品、内标贮备液适量。按上述供试品溶液制备方法制备, 按照上述电泳条件测定, 计算回收率, 结果见表 1, 2。

表 1 加样回收率试验 (n=6)

成分	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
血根碱	0.500 7	0.766 1	0.612 9	1.368 4	98.27	98.70	1.01
	0.501 3	0.767 0	0.612 9	1.381 3	100.23		
	0.500 3	0.765 5	0.765 5	1.513 0	97.65		
	0.501 7	0.767 6	0.765 5	1.531 6	99.81		
	0.502 1	0.768 2	0.921 8	1.667 6	97.57		
	0.502 0	0.768 1	0.921 8	1.677 5	98.65		
白屈菜红碱	0.500 7	1.680 9	1.344 7	3.016 7	99.34	98.40	1.27
	0.501 3	1.682 9	1.344 7	2.995 2	97.59		
	0.500 3	1.679 5	1.679 5	3.306 4	96.87		
	0.501 7	1.684 2	1.679 5	3.341 7	98.69		
	0.502 1	1.685 6	2.022 7	3.703 9	99.78		
	0.502 0	1.685 2	2.022 2	3.669 4	98.12		

2.8 样品测定 称取 3 批不同产地的小果博落回药材粉末各 1 g, 按照供试品溶液方法制备, 按照上述方法测定, 每个样品测定 3 次, 记录峰面积, 计算 3 份样品血根碱和白屈菜红碱含量, 见表 2。

表 2 不同产地小果博落回中血根碱和白屈菜红碱 (n=6)

产地	mg·g ⁻¹	
	血根碱	白屈菜红碱
花溪	1.534	3.358
贵定	1.559	3.361
清镇	1.498	3.349

3 讨论

3.1 内标物的选择 在选定的电泳条件下, 分别考察了盐酸小檗碱、盐酸麻黄碱、苦参碱在本文条件下的电泳行为, 结果盐酸小檗碱与被测定的样品成分分离完全, 峰形良好故选择盐酸小檗碱内标物。

3.2 工作电压的影响 在 5~25 kV 研究了工作电压的影响。结果表明, 在 5~25 kV, 随着工作电压的升高, 血根碱和白屈菜红碱迁移时间和分辨率降低, 基线噪声增加, 综合考虑分离度、分辨率和灵敏度等因素, 选择 18 kV 为工作电压。

3.3 缓冲液的优化 本试验选择不同缓冲液及浓度、pH 等操作参数对分离的影响。结果发现以 25 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二钠与 25 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠的混合体系(磷酸调 pH 为 7.0)-甲醇(2.5:1) 缓冲液为背景电解质, 缓冲液中加入甲醇, 加大疏水溶质

增溶作用, 提高分离度和选择性, 结果血根碱和白屈菜红碱和内标在较短的时间内达到基线, 样品中的峰均与内标峰完全分开。

4 结论

用高效毛细管电泳测定小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量, 与高效液相色谱法比较, 具有操作简便, 分析快速, 结果准确, 消耗试剂少, 测试费用低, 不用有毒试剂, 不污染环境等优点, 这种方法适用于小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量的测定。

[参考文献]

- [1] 郭小庄. 有毒中草药大辞典. 第 1 版[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1992.
- [2] 曾建国, 张胜, 侯团章, 等. 不同生长期博落回果实中血根碱与白屈菜红碱的含量[J]. 中药材, 1999, 22(5): 229.
- [3] 徐东伟. RP-HPLC 测定小果博落回中白屈菜红碱的含量[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2009, 18(2): 44-47.
- [4] 安彩贤, 杨广德, 叶建涛. RP-HPLC 法同时测定小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量[J]. 中成药, 2001, 23(11): 824.
- [5] 翟梅枝, 沈建国, 林奇英, 等. 中药生物碱成分的毛细管电泳分析[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 55.

[责任编辑 蔡仲德]