

苦参药材中生物碱的含量测定

张淑运, 王 焱, 何希荣, 黄璐琦

(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 采用高效液相色谱法, 测定了不同地区市售苦参药材中有效成分苦参碱、槐定碱、氧化苦参碱的含量, 10批药材3种生物碱总量都在1.5%以上。此方法简便易行, 重现性好。

关键词: 苦参; 苦参生物碱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2005)06-0002-03

苦参为豆科植物 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥

根。苦参具有清热燥湿, 杀虫, 利尿等功能。用于热痢, 便血, 黄疸尿闭, 赤白带下, 阴肿阴痒, 湿疹, 湿疮, 皮肤瘙痒, 疥癣麻风, 外治滴虫性阴道炎^[1]。近年来苦参应用不断扩展, 研究发现苦参有抗肿瘤, 平喘, 升高白血球与抑菌等作用^[2]。因此受到越来越多的重视。苦参主要成分苦参生物碱类, 也是主要

收稿日期: 2004-09-07

基金项目: 国家科技部基础性工作专项重点项目 (NO: 2001DEA20010)

通讯作者: 黄璐琦(010) 84044340

有效成分。苦参生物碱至今已发现的至少有 22 种以上^[2], 含量高的有氧化苦参生物碱, 氧化槐果碱, 苦参碱, 槐定碱, 槐果碱。

1 仪器和材料

高效液相色谱仪, (安捷伦 HP-1100, 美国); KQ-100 超声波清洗器: 昆山市超声技术有限公司; 色谱柱: Inertsil-NH₂(日本) 4.6 × 250mm。

乙腈为色谱纯, 中性氧化铝(上海五四化学试剂有限公司 100~200 目), 无水乙醇(分析纯北京化工厂), 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱对照品均为中国药品生物制品检定所提供, 实验用苦参药材收购于各地药材公司, 由我所生药室何希荣鉴定。

2 色谱条件

参照文献报道^[3,4]经多次实验确定了色谱条件。色谱柱: Inertsil-NH₂(日本) 4.6 × 250mm; 检测波长: 220nm; 流动相: 乙腈-3% 磷酸溶液-无水乙醇(80: 10: 10); 流速: 0.8ml/min, 柱温: 室温。

3 方法学考查

3.1 线性关系考查 分别精密称取苦参碱, 槐定碱, 氧化苦参碱对照品, 适量用乙腈-无水乙醇(80: 20)溶解, 摇匀, 注入液相色谱仪, 测定。以进样量为横坐标, 以峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程结果表明, (1) 苦参碱在 0.047μg~0.378μg 呈良好的线性关系。Y= 4755.3X + 1450, r = 0.9999。(2) 槐定碱在 0.050μg~0.398μg 呈良好的线性关系。Y= 4081293X - 35409.7, r = 0.9995。(3) 氧化苦参碱在 0.1340μg~1.2060μg 呈良好的线性关系。Y= 5012932.5X + 26161.3, r = 0.9996。

3.2 氨水用量对苦参生物碱提取的影响 0.3g 苦参细粉末加入 20mL 氯仿, 分别加入氨水 0.1, 0.2, 0.3, 0.5mL, 超声提取 30min, 苦参生物碱测定结果表明, 加入 0.1mL 氨水提取量低于 0.2、0.3、0.5mL 氨水加入量, 加入 0.2、0.3、0.5mL 氨水, 提出量一致。确定 0.3g 苦参细粉加入 20mL 氯仿, 0.3mL 氨水提取。加入氨水的目的是加速使生物碱盐转变成游离生物碱, 氨水量小, 提取时间延长, 杂质增多。

3.3 提取方法的确定 考查室温浸泡和不同超声提取时间对苦参各生物碱提出量的影响, 实验药材(广西), 测定液制备方法同供试液。室温浸泡和超声提取时间为 20、30、40min, 实验结果显示, 苦参各生物碱提出量没有明显差异。确定超声提取时间 30min。

3.4 样品净化 苦参生物碱碱性氯仿提取液浓缩后, 无水乙醇制备的待测液。HPLC 色谱测定, 杂质干扰大, 根本分不开, 样品必需净化。实验结果显示, 5mL 氯仿提取液上 5g 中性氧化铝柱(1 × 10cm), 先用 10mL 氯仿洗脱, 再用 10mL 氯仿-甲醇(7: 3)洗脱, 可得到很好效果。氯仿洗脱部分主要是苦参碱和槐定碱, 氯仿洗脱-甲醇(7: 3)洗脱部分主要是氧化苦参碱。

3.5 精密度、重复性和稳定性实验 按供试液制备方法制备。HPLC 测定, 测定结果见表 1~ 3。

表 1 精密度实验结果(A)

样品	苦参碱	槐定碱	氧化苦参碱
1	716296	367389	3210933
2	714321	368247	3264656
3	725427	368367	3196672
4	722082	373410	3307246
5	708067	371959	3284149
RSD%	0.85	0.64	1.30

表 2 重复性实验结果(%)

样品	苦参碱量	槐定碱含量	氧化苦参碱含量	总量
1	0.253	0.174	1.117	1.544
2	0.262	0.178	1.160	1.600
3	0.254	0.175	1.132	1.561
4	0.261	0.178	1.160	1.599
5	0.251	0.180	1.171	1.602
平均含量	0.256	0.177	1.148	1.581
RSD%	1.74	1.24	1.76	1.52

供试液在配制后, 分别于 0、2、4、6、8h 测定, 测定结果显示, 供试液在配制后 8h 内基本稳定。

表 3 稳定性实验结果(A)

时间(h)	苦参碱	槐定碱	氧化苦参碱
0	699682	371746	3290829
2	681186	377489	3117584
4	642555	366813	3199958
8	686259	364049	3225054
平均值	677420.5	370024.25	3208356.25
RSD%	3.13	1.38	1.93

3.6 回收率测定 称取苦参药材 0.15g 平均 5 份, 加入相应量的苦参碱、槐定碱、氧化苦参碱, 按苦参药材测定方法, 制备样品 HPLC 测定。计算含量, 测定结果见下表:

表 4 回收率测定结果(%)

样品	平均回收率	RSD
苦参碱	98.40	1.83
槐定碱	98.94	1.85
氧化苦参碱	100.67	1.24

4 样品测定

4.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的苦参碱、槐定碱和氧化苦参碱对照品适量,分别加乙腈-无水乙醇(80:20)溶解,制成每 1mL 含苦参碱和槐定碱各 0.05mg,氧化苦参碱 0.15mg 的溶液,即得。

4.2 供试品溶液的制备 取本品粗粉 0.30g,精密称定,置具塞 50mL 三角瓶中,精密加入氯仿 20mL,浓氨水 0.30mL,密塞,称定重量,超声提取 30min,放至室温后,再称定重量,用氯仿补足减失的重量,摇匀,滤过。精密吸取 5mL 滤液通过中性氧化铝柱(1cm×10cm,填中性氧化铝 5g),以氯仿-氯仿-甲醇(7:3)各 10mL 依次洗脱,合并洗脱液,浓缩至干,残渣用无水乙醇溶解,转移至 10mL 容量瓶中,无水乙醇溶解定容至刻度,摇匀,滤过既得。

4.3 测定法 分别精密吸取上述对照品溶液各 5μL 与供试品溶液 5~10μL,注入高效液相色谱仪,测定,测定结果见表 5。

表 5 不同地区苦参药材中生物碱测定结果(n=2,%)

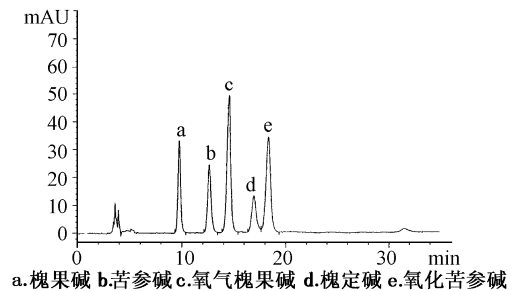
产地	苦参碱	槐定碱	氧化苦参碱	总碱
广西南宁	0.27	0.19	1.18	1.64
宁夏银川	0.15	0.34	1.62	2.11
安徽合肥	0.11	0.19	1.61	1.91
河南郑州市	0.11	0.24	1.93	2.28
重庆市	0.34	0.06	3.35	3.75
河北安国	0.13	0.12	2.22	2.68
山西清徐	0.18	0.22	2.39	2.79
陕西宝鸡	0.20	0.36	3.05	3.61
浙江杭州	0.11	0.12	2.92	3.15
云南昆明	0.13	0.16	1.98	2.27

3 讨论

采用氨基柱,乙腈-磷酸溶液-无水乙醇为流动相分离效果较好,但试验中发现磷酸溶液的酸度及

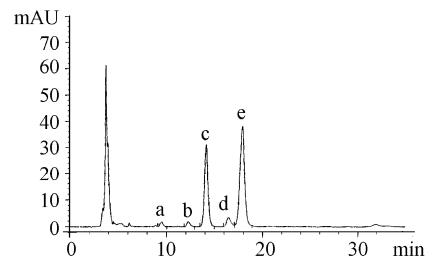
用量对分离效果有较大影响。因此我们试用了各种配比的乙腈-磷酸溶液-无水乙醇,确定用乙腈-3%磷酸溶液-无水乙醇(80:10:10),多种生物碱可得到满意的分离效果(图 1,图 2)。

本试验采用的高效液相色谱含量测定方法,可使 5 种生物碱在同一条件下都得到较好分离,此方法简便易行,重现性好。由于对照品短缺,我们只测了 3 种生物碱,如有槐果碱和氧化槐果碱对照品,可考虑 5 种生物的含量测定(药材中氧化槐果碱含量高于苦参碱和槐定碱)。10 批苦参药材的苦参碱,槐定碱,氧化苦参碱总量都在 1.50% 以上。



a. 槐果碱 b. 苦参碱 c. 氧化槐果碱 d. 槐定碱 e. 氧化苦参碱

图 1 苦参对照品 HPLC 色谱图



a. 槐果碱 b. 苦参碱 c. 氧化槐果碱 d. 槐定碱 e. 氧化苦参碱

图 2 苦参药材(宝鸡) HPLC 色谱图

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2000. 161.
- [2] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社(1), 1993. 425.
- [3] 金莉霞, 崔燕岩, 张观德. 苦参生物碱高效液相色谱法测定[J]. 药学学报, 1993, 28(2): 136-139.
- [4] 马长华, 曹天海. HPLC 法测定山豆根中苦参碱和氧化苦参碱的含量. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 408.