

HPLC 同时测定苦豆草中 7 种生物碱的含量

马玲¹, 王俊卿², 田杰², 王坤¹, 李巍³, 王英华^{1*}

(1. 宁夏回族自治区药品检验所, 宁夏 银川 75001; 2. 宁夏回族自治区中医研究院, 宁夏 银川 75004;
3. 日本东邦大学, 千叶 船桥 274-8510)

[摘要] 目的:建立了用 HPLC 对苦豆草中苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱和莱曼碱同时定量的方法。方法:采用 HPLC 检测方法,色谱柱 Waters X-Brige C₁₈(4.6 mm×250 mm 5 μm);流动相为乙腈-0.05 mol·L⁻¹的磷酸二氢钾溶液(2.0 mL·L⁻¹三乙胺)进行梯度洗脱;检测波长为 205 nm,柱温 25℃,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱和莱曼碱的浓度与峰面积,分别在 20.66~103.32 μg (r=0.998 8), 22.82~114.12 μg (r=0.999 7), 25.10~125.52 μg (r=0.999 1), 23.88~119.40 μg (r=0.997 5), 5.00~24.99 μg (r=0.998 6), 4.69~23.46 μg (r=0.999 6) 和 4.60~23.01 μg (r=0.997 8) 范围呈良好的线性关系;平均加样回收率分别为 97.12%, 97.47%, 96.21%, 94.64%, 98.04%, 96.24% 和 101.31%;RSD 分别为 7.3%, 3.0%, 4.5%, 5.2%, 5.4%, 5.8%, 4.3%。结论:该方法准确、简便、灵敏,为苦豆草的质量评价提供了依据。

[关键词] 苦豆草;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;HPLC

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 是豆科 Legu-
minosae 槐属植物,民间以全草、种子、根茎和根供药
用。性寒,味苦;全草功用为清热解毒,止痢。种子
功用为清热燥湿,止痛,杀虫。根茎和根功用为清
热解毒,消肿止痛,止痢^[1]。生物碱类成分是苦
豆子药材的主要成分,其测定方法有薄层色谱法^[2]、
高效液相色谱法^[3-6]等,但用高效液相色谱法同时
测定 7 种生物碱的研究未见报道,本研究首次采用
反相高效液相色谱法对苦豆子中 7 种生物碱类成
分进行了定量分析,为苦豆子药材质量控制提供了
新的指标成分,对于其产业链的开发利用及质量
评价提供了科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 高效液相色谱仪,Agilent 1100
LC 色谱工作站;G1313A 自动进样器;G1316A 柱温
箱;GB15B DAD 检测器;G1311A 四元泵;G1379A
脱气机。乙腈、三乙胺为色谱纯,磷酸二氢钾、甲
醇、乙醇、氯仿、甲苯均为分析纯,水为纯净水。
七种对照品:苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、
槐定碱(由

中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 110805-
200306, 0780-200004, 111652-200301, 110784-
200303),苦豆碱、槐果碱、莱曼碱(由宁夏紫荆花
药业提供,并经波谱分析鉴定结构,HPLC 归一化
法检测纯度均≥99.0%)。苦豆草药材采于宁夏
各地,经宁夏药品检验所王英华主任药师鉴定为
豆科槐属植物苦豆子 *S. alopecuroides* 花期的
干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取苦参碱
7.81 mg、槐果碱 7.33 mg、莱曼碱 7.19 mg 置 25
mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照
品溶液 I;精密称取苦豆碱 8.61 mg、槐定碱 9.51
mg、氧化苦参碱 10.46 mg、氧化槐果碱 9.95 mg
置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为
对照品溶液 II;精密量取对照品溶液 I 2 mL,对
照品溶液 II 3 mL 至 25 mL 的量瓶中,用甲醇定
容至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液,放置备
用。

2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末约 0.5 g,
精密称定,置具塞的锥形瓶中,加 10% NaOH 溶
液浸润 12 h 后,精密加入甲醇 20 mL,密塞,称
重,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz) 40 min,
放置至室温,再称重,用甲醇补足失重,摇匀,用
0.45 μm 的滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶
液。

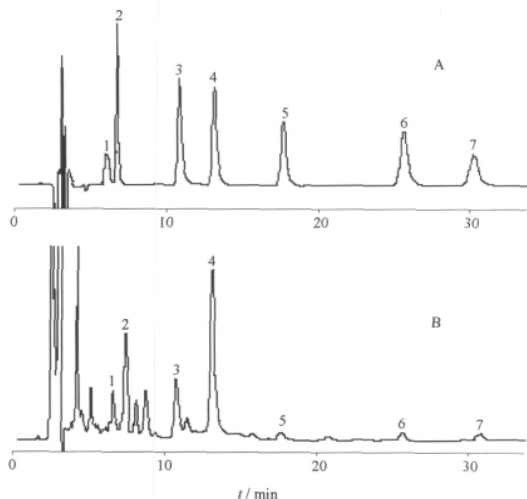
2.3 色谱条件 Waters X-Brige C₁₈ 色谱柱
(4.6 mm×250 mm 5 μm) 色谱柱;以乙腈-0.05
mol·L⁻¹

[稿件编号] 20100519002

[基金项目] 宁夏“十一五”科技攻关项目(宁科计字[2006]74号)

[通信作者] * 王英华, Tel: (0951) 4104813, E-mail: W. yinghua@
263.net

的磷酸二氢钾 ($2.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙胺) 溶液为流动相, 洗脱梯度为 $0 \sim 10 \text{ min} \sim 50 \text{ min} \sim 55 \text{ min}$; $\beta: 94 \sim 6: 94 \sim 13: 87 \sim 6: 94$; 检测波长 205 nm ; 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 $10 \mu\text{L}$; 柱温 25°C 。在此条件下分别取混合对照品、供试品溶液进行分析, 并对系统适用性参数进行考察, 结果这 7 种生物碱理论塔板数均高于 4 000, 分离度均大于 1.5 (图 1)。



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

图1 对照品(A)及样品(B) HPLC图

2.4 线性关系考察 精密量取 2.2 项下的混合对照品溶液 2.0 mL 、 3.0 mL 、 4.0 mL 、 5.0 mL 、 6.0 mL 、 10.0 mL 至 10 mL 的容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得对照品溶液系列, 按上述色谱条件进样测定。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 浓度 (X) 为横坐标绘制标准曲线, 得以下回归方程: 苦豆碱 $Y = 17.559X - 70.917$, $r = 0.9988$, 线性范围 $20.66 \sim 103.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 槐定碱 $Y = 41.778X - 93.592$, $r = 0.9997$, 线性范围 $22.82 \sim 114.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 氧化苦参碱 $Y = 40.354X - 265.525$, $r = 0.9991$, 线性范围 $25.10 \sim 125.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 氧化槐果碱 $Y = 43.251X - 119.271$, $r = 0.9975$, 线性范围 $23.88 \mu\text{g} \sim 119.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 苦参碱 $Y = 53.58X - 27.371$, $r = 0.9986$, 线性范围 $5.00 \sim 24.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 槐果碱 $Y = 53.536X - 25.142$, $r = 0.9996$, 线性范围 $4.69 \sim 23.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 莱曼碱 $Y = 27.204X - 31.317$, $r = 0.9978$, 线性范围 $4.60 \sim 23.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液

$10 \mu\text{L}$, 在上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 结果苦豆碱、槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐果碱和莱曼碱的 RSD 分别为 1.5% 、 0.9% 、 0.8% 、 0.7% 、 1.2% 、 1.3% 、 1.1% 。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0 、 4 、 8 、 12 、 16 、 20 、 24 h 进样 $10 \mu\text{L}$, 依法测定, 结果苦豆碱、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积分值的 RSD 分别为 0.8% 、 1.4% 、 1.0% 、 0.9% 、 0.5% 、 0.4% 、 1.2% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批苦豆草样品 5 份, 按 2.2 项下的方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果苦豆碱、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积分值的 RSD 分别为 1.1% 、 1.5% 、 1.1% 、 0.9% 、 1.2% 、 0.8% 、 0.7% 。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的苦豆草粉末 9 份, 置具塞的锥形瓶中, 加 10% NaOH 溶液浸润 12 h 后, 分别精密加入混合对照品溶液 (混合对照品溶液的制备: 分别精密称取苦豆碱 4.99 mg 、槐定碱 10.33 mg 、氧化苦参碱 12.38 mg 、氧化槐果碱 12.36 mg 置 10 mL 量瓶中, 苦参碱 9.53 mg 、槐果碱 9.78 mg 、莱曼碱 12.67 mg 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 精密量取各对照品溶液 5 mL 至 100 mL 的量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。) 10 、 7 、 4 mL 及甲醇适量至 20 mL , 按 2.2 项下的方法制备样品液, 进样测定, 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分别为 97.12% 、 97.47% 、 96.21% 、 94.64% 、 98.04% 、 96.24% 、 101.31% ; RSD 分别为 7.3% 、 3.0% 、 4.5% 、 5.2% 、 5.4% 、 5.8% 、 4.3% 。结果见表 1。

2.9 样品的测定 精密称取苦豆草样品, 按 2.2 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 2。

3 讨论

分别采用①用 10% NaOH 溶液浸润 12 h 后, 加入甲醇 20 mL 超声提取 40 min , 滤过, 即得; ②用 10% NaOH 溶液浸润 12 h 后, 加入氯仿 20 mL 超声提取 40 min , 滤过, 精密量取滤液 10 mL 至蒸发皿中蒸干, 用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 滤过, 即得; ③用 10% NaOH 溶液浸润 12 h 后, 加入 65% 乙醇 20 mL 超声提取 40 min , 滤过, 即得; ④精密加入

表 1 7 种生物碱的加样回收率($n=9$)

对照品	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
苦豆碱	0.145 5	0.249 5	0.386 7	96.69	97.12	7.3
	0.150 9	0.249 5	0.379 6	91.66		
	0.151 9	0.249 5	0.408 1	102.69		
	0.284 1	0.174 6	0.440 1	89.37		
	0.311 2	0.174 6	0.475 4	94.03		
	0.280 6	0.174 6	0.468 2	107.47		
	0.439 7	0.099 8	0.526 9	87.33		
	0.429 8	0.099 8	0.529 6	100.00		
	0.418 9	0.099 8	0.523 5	104.83		
槐定碱	0.259 8	0.516 5	0.757 9	96.44	97.47	3.0
	0.269 5	0.516 5	0.766 8	96.28		
	0.271 3	0.516 5	0.753 1	93.28		
	0.507 3	0.361 6	0.852 2	95.38		
	0.555 8	0.361 6	0.904 3	96.38		
	0.501 0	0.361 6	0.849 9	96.49		
	0.785 3	0.206 6	0.995 4	101.69		
	0.767 5	0.206 6	0.973 3	99.61		
	0.748 0	0.206 6	0.958 1	101.69		
氧化苦参碱	0.415 6	0.619 0	1.019 2	97.51	96.21	4.5
	0.431 2	0.619 0	1.015 1	94.34		
	0.434 0	0.619 0	1.065 6	102.03		
	0.811 6	0.433 3	1.234 9	97.68		
	0.889 2	0.433 3	1.328 7	101.44		
	0.801 6	0.433 3	1.228 2	98.46		
	1.256 4	0.247 6	1.483 7	91.79		
	1.228 0	0.247 6	1.449 3	89.39		
	1.196 8	0.247 6	1.427 7	93.24		
氧化槐果碱	0.301 3	0.618 0	0.926 9	101.22	94.64	5.2
	0.312 6	0.618 0	0.909 8	96.64		
	0.314 7	0.618 0	0.899 4	94.63		
	0.588 4	0.432 6	0.981 7	90.91		
	0.644 7	0.432 6	1.011 3	84.75		
	0.581 2	0.432 6	1.010 4	99.21		
	0.910 9	0.247 2	1.147 3	95.63		
	0.890 3	0.247 2	1.129 5	96.75		
	0.867 7	0.247 2	1.095 1	91.99		
苦参碱	0.026 0	0.095 3	0.119 4	97.98	98.04	5.4
	0.027 0	0.095 3	0.111 9	89.15		
	0.027 1	0.095 3	0.120 5	97.98		
	0.050 7	0.066 7	0.118 7	101.86		
	0.055 6	0.066 7	0.125 3	104.51		
	0.050 1	0.066 7	0.119 2	103.66		
	0.078 5	0.038 1	0.114 6	94.57		
	0.076 8	0.038 1	0.115 1	100.56		
	0.074 8	0.038 1	0.109 9	92.06		
槐果碱	0.027 0	0.097 8	0.112 9	87.77	96.24	5.8
	0.028 0	0.097 8	0.129 7	103.97		
	0.028 2	0.097 8	0.119 2	93.04		
	0.052 8	0.068 5	0.118 0	95.3		
	0.057 8	0.068 5	0.119 6	90.27		
	0.052 1	0.068 5	0.121 2	100.9		

续表 1

对照品	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
莱曼碱	0.081 7	0.039 1	0.119 7	97.3	101.31	4.3
	0.079 8	0.039 1	0.120 1	103.07		
	0.077 8	0.039 1	0.114 8	94.54		
	0.020 8	0.126 7	0.151 4	103.11		
	0.021 6	0.126 7	0.151 0	102.20		
	0.021 7	0.126 7	0.156 0	105.99		
	0.040 6	0.088 7	0.128 2	98.76		
	0.044 5	0.088 7	0.128 9	95.17		
	0.040 1	0.088 7	0.133 8	105.66		
	0.062 8	0.050 7	0.113 0	98.96		
	0.061 4	0.050 7	0.109 8	95.57		
	0.059 8	0.050 7	0.113 8	106.38		

注:苦豆草中槐定碱、氧化苦参碱和氧化槐果碱的含量较高,因此回收率重点兼顾了这 3 种生物碱。

表 2 苦豆芽样品测定结果($\bar{x} \pm s$ $n=5$) %

No.	样品来源	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
1	宁夏盐池县	0.14	0.34	0.42	0.43	0.04	0.03	0.04
2	宁夏盐池县	0.16	0.38	0.48	0.51	0.05	0.03	0.03
3	宁夏灵武县	0.09	0.22	0.32	0.22	0.02	0.02	0.02
4	宁夏灵武县	0.10	0.21	0.31	0.29	0.03	0.02	0.02
5	宁夏红寺堡	0.12	0.24	0.34	0.35	0.02	0.02	0.03
6	宁夏红寺堡	0.11	0.28	0.37	0.32	0.03	0.02	0.02

甲醇 20 mL 超声提取 40 min 滤过,精密量取续滤液 10 mL 过中性三氧化二铝小柱,先用 10 mL 的氯仿洗脱,继用 10 mL 的氯仿-甲醇(7:3)洗脱,合并洗脱液,蒸干,用流动相溶解转移至 10 mL 量瓶中,用 0.45 μm 的滤膜滤过,即得;⑤精密加入甲苯超声提取 2 次(30 $\pm$ 20 mL),滤过,合并甲苯提取液,用 5% 的硫酸萃取 2 次(5% 的硫酸加入量通过 pH 试纸测试使其显弱酸性 pH 6),合并酸液,用 40% NaOH 调节 pH 11,再用甲苯萃取 4 次(20 $\pm$ 20 $\pm$ 10 $\pm$ 10 mL),合并甲苯液,蒸干,用甲醇溶解转移至 25 mL 量瓶中,用 0.45 μm 的滤膜滤过,即得。结果用①的方法提取得到的色谱峰数目多,面积大,分离效果好,因此选择用 10% NaOH 溶液浸润 12 h 后,加入甲醇 20 mL 超声提取 40 min。

流动相条件选择① 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 的磷酸二氢钾-甲醇(83:17);② 甲醇-水-三乙胺(55:45:0.2);③ 甲醇-乙腈-0.02 mol $\cdot$ L⁻¹ 的醋酸铵缓冲液(0.5 mL $\cdot$ L⁻¹ 的三乙胺)(5:19:79);④ 乙腈-0.05 mol $\cdot$

L^{-1} 的磷酸二氢钾($2.0\text{ mL} \cdot L^{-1}$ 三乙胺)(10:90)等流动相及其梯度进行检测。结果流动相①、②、③使7种生物碱无法分离,而以乙腈- $0.05\text{ mol} \cdot L^{-1}$ 的磷酸二氢钾溶液($2.0\text{ mL} \cdot L^{-1}$ 三乙胺)为流动相进行梯度洗脱,样品分离效果好,基线稳定。

分别取适宜浓度的7种生物碱的对照品溶液在190~400 nm波长进行扫描,结果7种生物碱在200~210 nm均有最大吸收。但通过HPLC法,记录色谱图,得到7种生物碱在205 nm波长下色谱峰分离度好、面积较大。因此选择205 nm作为检测波长。

[参考文献]

[1] 邢世瑞. 宁夏中药志上卷[M]. 2版. 银川: 宁夏人民出版社, 2006: 130

- [2] 高剑峰, 蒋建军, 潘晓亮. 苦豆子生物碱总的成份分析及提取工艺的研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 1997, 1(2): 109.
- [3] 杨文远, 杨宁莲, 王天勇, 等. HPLC法同时测定苦豆子中苦参碱与氧化苦参碱[J]. 宁夏大学学报, 1996, 17(4): 13.
- [4] 宋玉琴, 魏玉辉, 武新安, 等. RP-HPLC法测定苦豆子总碱注射液中槐定碱、苦参碱和槐果碱的含量[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2007, 33(4): 24.
- [5] 乔华, 王婷, 梁莉, 等. 苦豆子总碱注射液中苦参碱和槐果碱的含量测定[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2007, 33(3): 59.
- [6] 宋玉琴, 魏玉辉, 刘文静, 等. HPLC法同时测定苦豆子乳膏中槐定碱、苦参碱和槐果碱的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(24): 1878.

Simultaneous determination of 7 alkaloid in Herba *Sophorae Alopecuroidis* by HPLC

MA Ling¹, WANG Junqing², TIAN Jie², WANG Kun¹, LI Wei³, WANG Yinghua^{1*}

(1. Ningxia Institute of Drug Control, Yinchuan 750001, China;

2. Ningxia Academy of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750004, China;

3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohouniversity, 2-2-1 Miyama, Funabashi chiba 274-8510, Japan)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of 7 alkaloid in Herba *Sophorae Alopecuroidis* by HPLC. **Method:** X-Brige C_{18} ($4.6\text{ mm} \times 200\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) column was used with acetonitriles- $0.05\text{ mol} \cdot L^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$ solution ($2.0\text{ mL} \cdot L^{-1}$ triethylamine) with gradient elution as the mobile phase and $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ as the flow rate. The detection wavelength was 205 nm. **Result:** Aloperin curve was linear in the range from 20.66 to 103.32 μg ($r = 0.998\ 8$) and the average recovery was 97.12% (RSD 7.3%); sophoridine curve was linear in the range from 22.82 to 114.12 μg ($r = 0.999\ 7$) and the average recovery was 97.47% (RSD 3.0%); oxymatrine curve was linear in the range from 25.10 to 125.52 μg ($r = 0.999\ 1$) and the average recovery was 96.21% (RSD 4.5%); oxysophocarpine curve was linear in the range from 23.88 to 119.40 μg ($r = 0.997\ 5$) and the average recovery was 94.64% (RSD 5.2%); matrine curve was linear in the range from 5.00 to 24.99 μg ($r = 0.998\ 6$) and the average recovery was 98.04% (RSD 5.4%); sophocarpine curve was linear in the range from 4.69 to 23.46 μg ($r = 0.999\ 6$) and the average recovery was 96.24% (RSD 5.8%); lehmannine curve was linear in the range from 4.60 to 23.01 μg ($r = 0.997\ 8$) and the average recovery was 101.31% (RSD 4.3%). **Conclusion:** The method is accurate, simple and feasible. It can be used as a quality evaluation in Herba *S. Alopecuroidis*.

[Key words] Herba *Sophorae Alopecuroidis*; aloperin; sophoridine; oxymatrine; oxysophocarpine; matrine; sophocarpine; lehmannine; HPLC

doi: 10.4268/cjcm20111117

[责任编辑 丁广治]