

# HPLC – DAD 法测定商品苦参根茎和根中 5 个生物碱的含量

张萍<sup>1</sup> 杨璐<sup>2</sup> 王耀欣<sup>2</sup> 殷其蕾<sup>2</sup> 贺锐锐<sup>2</sup> ,  
詹先王<sup>2</sup> 刘勇<sup>2</sup> 袁丽佳<sup>2</sup> 李中杰<sup>2</sup> 韩南银<sup>2\*</sup>

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院中药剂科 北京 100050; 2. 北京大学药学院 北京 100191)

**摘要** 目的: 测定商品苦参根茎和根中苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱的含量, 主要了解苦参根茎中苦参碱和氧化苦参碱总量是否达到中国药典 2010 年版规定的不低于 1.0%。方法: 采用 Welch Materials Xtimate™ C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm 5 μm) 色谱柱 流动相 A 为 10 mmol · L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液 (0.1% 氨水调至 pH 9.2) 流动相 B 为乙腈 梯度洗脱 流速 1 mL · min<sup>-1</sup> 检测波长 220 nm。结果: 苦参碱进样量在 0.1575 ~ 2.205 μg (r = 0.9999), 氧化苦参碱在 0.8985 ~ 12.58 μg (r = 0.9999) 槐果碱在 0.1360 ~ 1.904 μg (r = 0.9999), 氧化槐果碱在 0.4398 ~ 6.153 μg (r = 0.9998), 槐定碱在 0.2092 ~ 2.926 μg (r = 0.9998) 范围内呈良好的线性关系; 加样平均回收率 (n = 3) 分别为 101.0% ~ 102.5% (RSD ≤ 2.1%), 100.8% ~ 101.6% (RSD ≤ 2.8%), 102.3% ~ 103.6% (RSD ≤ 1.2%), 102.2% ~ 103.4% (RSD ≤ 1.1%), 102.4% ~ 103.3% (RSD ≤ 2.9%)。结论: 该方法精密度和准确度均好。苦参根茎和根中苦参碱和氧化苦参碱的总量均不低于 1.0%, 符合中国药典 2010 年版的规定。

**关键词:** 苦参; 根茎; 根; 生物碱; 苦参碱; 氧化苦参碱; 槐果碱; 氧化槐果碱; 槐定碱; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011)12 - 2294 - 04

## HPLC – DAD determination of 5 alkaloids in commercial available Kushen's rhizome and root

ZHANG Ping<sup>1</sup> ,YANG Lu<sup>2</sup> ,WANG Yao - xin<sup>2</sup> ,YIN Qi - lei<sup>2</sup> ,HE Rui - rui<sup>2</sup> ,  
ZHAN Xian - wang<sup>2</sup> ,LIU Yong<sup>2</sup> ,YUAN Li - jia<sup>2</sup> ,LI Zhong - jie<sup>2</sup> ,HAN Nan - yin<sup>2\*</sup>

(1. Beijing Friendship Hospital Affiliate of Capital University of Medical Sciences ,Beijing 100050 ,China;

2. School of Pharmaceutical Sciences ,Peking University ,Beijing 100191 ,China)

**Abstract Objective:** To determine the respective content of matrine ,oxymatrin ,sophocarpine ,oxysophocarpine and sophoridine in commercial Kushen's rhizomes and roots so as to find out if the total contents of matrine and oxymatrin meet the request of not less than 1% in ChP( Vol. I) 2010 Ed. **Methods:** The procedure was performed on a C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm 5 μm) column with a gradient elution of mobile phase A( 10 mmol · L<sup>-1</sup> ammonium acetate aqueous ,adjusted to pH 9.2 with ammonia water) and mobile phase B( acetonitrile) . The flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup> and the detective wavelength of DAD was set at 220 nm. **Results:** The linear ranges of matrine ,oxymatrin ,sophocarpine ,oxysophocarpine and sophoridine were 0.1575 - 2.205 μg ( r = 0.9999) ,0.8985 - 12.58 μg ( r = 0.9999) ,0.1360 - 1.904 μg ( r = 0.9999) ,0.4398 - 6.153 μg ( r = 0.9998) ,and 0.2092 - 2.926 μg ( r = 0.9998) ,respectively; The recoveries ( n = 3) were 101.0% - 102.5% ( RSD ≤ 2.1%) ,100.8% - 101.6% ( RSD ≤ 2.8%) ,102.3% - 103.6% ( RSD ≤ 1.2%) ,102.2% - 103.4% ( RSD ≤ 1.1%) ,and 102.4% - 103.3% ( RSD ≤ 2.9%) ,respectively. **Conclusion:** The HPLC method shows a good precision and accuracy. The total contents of matrine and oxymatrine in both Kushen's rhizomes and roots are not less than 1.0% ,which meet the standards in ChP( Vol. I) 2010 Ed.

**Key words:** *Sophora flavescens*; rhizome; root; alkaloids; matrine; oxymatrin; sophocarpine; oxysophocarpine; sophoridine; HPLC

苦参为常用中药,具有清热燥湿、利尿杀虫之功效。建国以来各版中国药典规定苦参均为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根<sup>[1]</sup>。但商品苦参除根外尚有苦参根茎存在<sup>[2]</sup>,全国31个省、市、自治区的苦参药材均为根和根茎并存,且常以根茎为主,此种情况已有相当长的历史<sup>[3]</sup>。据报道<sup>[2,4]</sup>,苦参根茎亦含有生物活性成分苦参碱和氧化苦参碱,但其含量是否达到中国药典2010年版规定苦参碱和氧化苦参碱总量不得少于1.0%的要求而可供药用,这方面的研究尚未见报道,因此,这是本文主要的研究内容。高效液相色谱法用于苦参生物碱的含量测定已有报道<sup>[5-8]</sup>,本文采用HPLC-DAD测定了11个不同产地商品苦参根茎和根中苦参碱和氧化苦参碱的含量,以比较根茎和根上述2个生物碱含量的差异。此外,也测定了其中的槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱的含量。

### 1 仪器与试剂

Waters 2695 自动进样高效液相色谱仪, Waters 2998 DAD 检测器; HANGPING FA2104 万分之一天平(上海梅特勒仪器公司)。

醋酸铵和乙腈(国药集团化学试剂有限公司)、氨水(北京化工厂)均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

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,槐果碱由南京药物研究所提供。

苦参根和根茎均为饮片,产地分别为河北(批号090803)、北京(批号0902017)、辽宁、湖南(批号081237)、四川、河南、吉林、安徽(批号090507)、山西、湖北(批号090323)、甘肃,均经本文第一作者鉴定为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的根及根茎。此外,同产地商品苦参的根和根茎样品均取自同一件样品。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Welch Materials Xtimate<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流动相: A相为 10 mmol · L<sup>-1</sup> 醋酸铵水溶液(0.1% 氨水调至 pH 9.2), B相为乙腈 梯度洗脱(0 ~ 10 min 5:95 → 15:85; 10 ~ 15 min 15:85 → 25:75; 15 ~ 22 min 25:75; 22 ~ 30 min 25:75 → 60:40; 30 ~ 35 min 60:40; 35 ~ 40 min 60:40 → 5:95); 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 220 nm。

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品储备液** 精密称取对照品苦参碱、氧

化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱适量,分别置 10 mL 量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,即得苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱浓度分别为 0.3150, 0.5970, 0.2720, 0.2930, 0.4180 mg · mL<sup>-1</sup> 的单一成分对照品储备液。

**2.2.2 单一成分对照品溶液** 精密量取苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱的对照品储备液各 1 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱和槐定碱的浓度分别为 0.0315, 0.0597, 0.0272, 0.0293, 0.0418 mg · mL<sup>-1</sup> 的单一成分对照品溶液。

**2.2.3 混合对照品溶液** 精密量取苦参碱、槐果碱、槐定碱对照品储备液各 1 mL,氧化苦参碱、氧化槐果碱对照品储备液各 3 mL,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱和槐定碱的浓度分别为 0.0315, 0.1791, 0.0272, 0.0879, 0.0418 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.4 供试品溶液** 取苦参药材粉末(过 40 目筛)约 0.1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定重量,回流 0.5 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

### 3 方法学考察

**3.1 线性关系** 精密量取混合对照品溶液 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μL,进样测定各色谱峰峰面积。以对照品量  $x$  (μg) 为横坐标,色谱峰面积  $y$  为纵坐标绘制标准曲线,计算苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱回归方程分别为:

$$y = 3.498 \times 10^4 x - 1.650 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$y = 8.148 \times 10^5 x - 1.423 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

$$y = 8.342 \times 10^5 x - 1.173 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$y = 5.067 \times 10^5 x - 1.553 \times 10^4 \quad r = 0.9998$$

$$y = 8.447 \times 10^5 x - 8.644 \times 10^3 \quad r = 0.9998$$

线性范围分别为 0.1575 ~ 2.205, 0.8985 ~ 12.58, 0.1360 ~ 1.904, 0.4398 ~ 6.153, 0.2092 ~ 2.926 μg。

**3.2 定量限** 取单一成分对照品溶液适量,逐级稀释,进样测定。当信噪比  $S/N = 10$  时求得苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱的定量限分别为 1.3215, 0.5532, 1.966, 0.7283, 8.695 ng。

**3.3 精密度** 精密量取混合对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,测定苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化

槐果碱、槐定碱色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.45%、0.45%、3.4%、0.73%、0.31%。表明精密度良好。

**3.4 稳定性** 取供试品溶液 1 份,分别于 0、2、4、8、12、24、48、72 h 进样测定,结果苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱峰面积的 RSD ( $n = 8$ ) 分别为 2.9%、1.3%、1.0%、1.6%、1.7%,表明供试品溶液稳定性良好。

**3.5 准确度(回收率试验)** 取已测知含量(苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱含量分别为 0.106%、2.127%、0.038%、0.684%、0.061%) 苦参药材约 0.05 g 共 9 份,精密称定,分别置圆底烧瓶中,精密加入“2.2”项下的苦参碱对照品储备液 0.10、0.17、0.24 mL; 氧化苦参碱对照品储备液 1.00、1.80、2.50 mL; 槐果碱对照品溶液 0.40、0.70、1.00 mL; 氧化槐果碱对照品储备液 0.70、1.20、1.70 mL; 槐定碱对照品溶液 0.40、0.70、1.00 mL。再分别加甲醇 7.40、5.40、3.60 mL,按“2.2.4”项下方法平行制备低、中、高浓度各 3 份溶液,分别进样测定各色谱峰峰面积,计算各自的回收率,结果见表 1。

表 1 苦参中 5 个成分的回收率结果 ( $n = 3$ )

Tab 1 Recovery results of 5 components in Kushen

成分 (component)	加入量 (added) / $\mu\text{g}$	回收率 (average recovery) /%	RSD /%
苦参碱(matrine)	0.0426	102.5	0.14
	0.0533	101.4	0.28
	0.0639	101.0	2.1
氧化苦参碱(oxymatrin)	0.8510	100.8	2.8
	1.0638	101.2	1.0
	1.2765	101.6	1.4
槐果碱(sophocarpine)	0.0151	102.4	1.2
	0.0189	102.3	0.23
	0.0227	103.6	1.2
氧化槐果碱(oxysophocarpine)	0.2737	102.7	0.050
	0.3421	103.4	1.1
	0.4106	102.2	0.085
槐定碱(sophoridine)	0.0244	102.4	1.6
	0.0305	103.3	2.9
	0.0366	102.6	1.7

#### 4 样品含量测定

取“2.2”项下的混合对照品溶液及供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,进样测定。结果见图 1 和表 2。

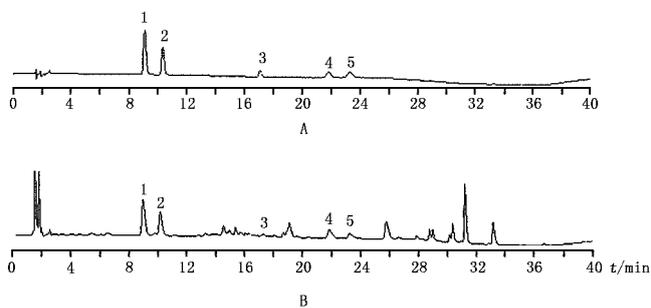


图 1 对照品(A)与北京苦参根茎(B) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and Kushen's rhizome (B) from Beijing

1. 氧化苦参碱(oxymatrin)
2. 氧化槐果碱(oxysophocarpine)
3. 槐定碱(sophoridine)
4. 苦参碱(matrine)
5. 槐果碱(sophocarpine)

#### 5 讨论

**5.1** 从表 1 可以看出,各产地苦参根和根茎苦参碱含量除湖南产苦参根中苦参碱含量为 0.55% 外,其余产地苦参根和根茎中苦参碱含量均在 0.5% 以下,其中根含量略高于根茎;氧化苦参碱在根和根茎中含量各有高低,且均不低于 2%,辽宁、甘肃产苦参根和根茎中其含量均在 3% 以上,可见具有生物活性的氧化苦参碱是苦参药材中最主要的成分。槐果碱和槐定碱于各地产的苦参根和根茎中含量均在 0.5% 以下;氧化槐果碱仅四川产苦参根和根茎、辽宁产苦参根中含量达 1% 以上。

**5.2** 11 个产地的苦参根茎中苦参碱和氧化苦参碱二者总量以甘肃产含量最高(3.28%),北京产最低(2.23%);苦参根中两者总量以辽宁产含量最高(3.59%),北京最低(2.38%)。虽然根茎中的两者总量比根中低,但仍达到中国药典 2010 年版规定苦参碱和氧化苦参碱的总量不得少于 1.0% 的要求。

**5.3** 选择不同的提取方法时,曾尝试过采用超声 0.5 h、1 h,回流 0.5 h、1 h 等方法,最终确立为回流提取 0.5 h。本方法也存在一定的不足,样品进样后出现较多的杂峰,据报道<sup>[5]</sup>在回流之前对苦参碱进行富集,如采用树脂吸附法可减少杂峰。流动相选择时,由于所分离的成分为生物碱,为降低其极性,避免峰的重叠和展宽,故选择在流动相中加入磷酸盐类等方法,尝试过在有机相中加入盐,但发现加入

表 2 11 个产地苦参根和根茎中 5 个生物碱成分的含量( %)  
Tab 2 The contents of the five alkaloids in Kushen's rhizome and root of 11 habitats

样品产地 ( sample habitat)	药用部位 ( medicinal part)	苦参碱 ( matrine)	氧化苦参碱 ( oxymatrine)	槐果碱 ( sophocarp ine)	氧化槐果碱 ( oxysophocarpine)	槐定碱 ( sophoridine)
河北( Hebei)	根茎( rhizome)	0. 113	2. 387	0. 034	0. 895	0. 191
	根( root)	0. 206	2. 578	0. 120	0. 972	0. 489
北京( Beijing)	根茎( rhizome)	0. 106	2. 127	0. 038	0. 684	0. 061
	根( root)	0. 177	2. 208	0. 114	0. 832	0. 350
辽宁( Liaoning)	根茎( rhizome)	0. 106	3. 074	未检出( not detected)	0. 952	0. 045
	根( root)	0. 277	3. 308	0. 146	1. 101	0. 058
湖南( Hunan)	根茎( rhizome)	0. 454	2. 231	0. 282	0. 801	0. 478
	根( root)	0. 554	2. 290	0. 264	0. 828	0. 160
四川( Sichuan)	根茎( rhizome)	0. 0895	2. 4680	0. 0425	1. 1570	0. 1900
	根( root)	0. 094	2. 884	0. 042	1. 444	0. 160
河南( Henan)	根茎( rhizome)	0. 118	2. 450	0. 039	0. 710	0. 098
	根( root)	0. 348	2. 330	0. 050	0. 632	0. 053
吉林( Jilin)	根茎( rhizome)	0. 077	2. 414	0. 021	0. 842	0. 083
	根( root)	0. 129	2. 379	0. 056	0. 867	0. 010
安徽( Anhui)	根茎( rhizome)	0. 168	2. 290	0. 098	0. 650	0. 144
	根( root)	0. 186	2. 904	0. 068	0. 790	0. 214
山西( Shanxi)	根茎( rhizome)	0. 140	2. 872	0. 052	0. 951	0. 134
	根( root)	0. 198	2. 841	0. 054	0. 906	0. 136
湖北( Hubei)	根茎( rhizome)	0. 122	2. 349	0. 035	0. 696	0. 322
	根( root)	0. 220	2. 624	0. 116	0. 962	0. 130
甘肃( Gansu)	根茎( rhizome)	0. 102	3. 181	0. 022	0. 924	0. 072
	根( root)	0. 244	3. 112	0. 122	0. 836	0. 064

之后基线漂移比较严重,故只在水相中加入盐。经色谱图所得结果发现,在流动相中加入醋酸铵则峰形较好,水相 pH 9. 2 时峰形较佳。

参考文献

1 ChP( 中国药典). 2010. VoI I ( 一部) : 188  
 2 ZHANG Ping( 张萍), LI Jiu - dan( 李九丹). Comparative study on Kushen's root and rootstock( 苦参根和根茎的比较研究). *Chin J Pharm Anal*( 药物分析杂志) 2004 24( 3) : 327  
 3 ZHANG Ping( 张萍), LI Jiu - dan( 李九丹). Investigation on the condition of medical use of rootstock of the commodity Kushen( 商品苦参中根茎药用情况调查). *Chin J Pharm Anal*( 药物分析杂志), 2010 30( 11) : 2093  
 4 ZHANG Ping( 张萍). A newly appeared obscured product of Kushen herbs pieces( 商品苦参中新出现的混淆品). *Chin J Pharm Anal*( 药物分析杂志), 1996 16( 5) : 331  
 5 ZHU Li - jun( 朱丽君), LIU Bin( 刘斌). Quantitative determination of four components in alkaloid fraction of *Sophora flavescens* Ait. by

HPLC( HPLC 法测定苦参生物碱部位中 4 种成分含量). *J Beijing Univ Tradit Chin Med*( 北京中医药大学学报) 2007 30( 11) : 780  
 6 LIU Qian( 刘倩), LIU Yong - gang( 刘永刚), ZHENG Yu - sheng( 郑玉胜) et al. Determination of 4 kinds of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by HPLC( 苦参药材中 4 种生物碱的含量测定). *Lish - izhen Med Mater Med Res*( 时珍国医国药) 2006 17( 11) : 2211  
 7 WANG Wen - lai( 汪文来), ZHAO Hong - xia( 赵红霞), JIA Hai - hua( 贾海骅) et al. Determination of matrine and oxymatrine in *Sophora flavescens* from different regions by HPLC( HPLC 法测定不同产地苦参中苦参碱和氧化苦参碱的含量). *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*( 中国中医基础医学杂志) 2007 13( 10) : 799  
 8 TIAN Juan( 田娟), WANG Zhi - min( 王智民), WANG Wei - hao( 王维皓). Determination of matrine and oxymatrine in *Sophora flavescens* by HPLC( HPLC 测定苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量). *Chin J Exp Tradit Med Form*( 中国实验方剂学杂志) 2006 12( 2) : 23

( 本文于 2011 年 10 月 26 日修改回)