

苦参与苦豆子中生物碱的高效液相层析法 与薄层光密度法测定

崔建芳 章观德 王慕邹

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 本文报道苦参与苦豆子中五种生物碱的两种微量测定方法——高效液相层析法与薄层光密度法。前法重现性好, 纯品的回收率为 98.2~99.3%, 后法操作简便不需净化, 线性范围为 1~4 μg 。方法的变异系数分别为 0.68~1.74% 及 1.62~2.77%, 两法测定结果一致。

关键词 苦参; 苦豆子; 高效液相层析法; 薄层光密度法; 槐果碱; 苦参碱; 槐定; 氧化苦参碱; 氧化槐果碱

苦参(*Sophora flavescens* Ait.)与苦豆子(*Sophora alopecuroides* Linn.)均为豆科槐属植物, 是常用中药。具有清热利湿, 祛风杀虫作用。

苦参生物碱的化学、药理和临床应用等方面已进行了大量研究⁽¹⁾, 从苦参中分离出槐果碱(sophocarpine, I)、苦参碱(matrine, II)、槐定(sophoridine, III)、氧化苦参碱(oxymatrine, IV)、氧化槐果碱(oxysophocarpine, V)等十七种生物碱^(2,3)。苦豆子中也分离出包括上述五种在内的二十二种生物碱。近年来, 经药理实验与临床观察证明, 氧化苦参碱具有抗肿瘤⁽⁴⁾、平喘和升白作用; 苦参碱具有抗肿瘤⁽⁴⁾、平喘和抑菌作用⁽¹⁾; 槐定具有止痢作用⁽⁵⁾。

苦参中生物碱的分析, 有薄层层析比色法⁽⁶⁾与高效液相层析法⁽⁷⁾。前法操作费时, 灵敏度较低, 后法用 Lichrosorb NH_2 固定相及两种不同 pH 的流动相测定了苦参根中的安那吉碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱和苦参碱的含量。未见槐定和槐果碱的分离和测定。苦豆子中生物碱的测定也未见报道。为此对苦参和苦豆子中五种生物碱的分析方法进行了研究, 使用了两种微量测定方法——高效液相层析法与薄层光密度法。各成分均达到基线分离, 方法的变异系数分别为 0.68~1.74% 及 1.62~2.77%。用拟定方法测定了苦参根、苦豆根及苦参素针剂中各生物碱的含量, 两法结果一致。

实 验 部 分

一. 仪器与药品

苦参碱 mp 76~77°C; 槐定 mp 106~108°C; 氧化苦参碱 mp 162~163°C; 氧化槐果碱 mp 202~204°C; 槐果碱 mp 78.5°C。阿托品(BDH, 英); 辛可尼丁(Light, 英)。苦参(甘肃); 苦豆子(甘肃); 苦参素针剂(酒泉钢铁公司职工医院)。氧化铝(中性, 200~300目, 上海五四农场化学试剂厂); 硅胶G(青岛海洋化工厂); 三乙胺(AR, 北京化工厂, 加氢氧化钠回流3小时后, 收集89°C馏分)。

高效液相层析仪 Consta Metric HIG 泵 (LDC, 美); Spectromonitor II 可调波长检测器 (LDC, 美); Rheodyne 7125 进样阀; C-RIA Chromatopac 数据处理机(岛津, 日)。不锈钢层析柱: 内径 4 mm, 长 20 cm, 填充剂为硅胶 (青岛海洋化工厂高效液相层析用, 10 μm), 用高压匀浆法填充。CS-910 型双波长薄层扫描仪、Chromatopac EIB 数据处理机与自动喷雾器(岛津, 日); 点样毛细管(Microcap, Drummond, 美)。

二、高效液相层析法

(一) 条件的选择

曾先后试验了十八烷基键合相柱、己二氨基柱、离子交换柱、硅胶柱(5, 10 μm), 并采用多种溶剂系统层析, 确定用硅胶(10 μm)作固定相, 下述流动相分离效果较好。

流动相(I) 甲醇—水(100:32), 每 100 ml 加三乙胺 1 μl 。

流动相(II) 乙醇—甲醇—己烷(12:3:4), 每 100 ml 加 28% 氨水 1.2 ml。

标准品加内标的乙醇溶液及经氧化铝柱净化后并加入内标的生药样品乙醇溶液, 分别进样 1 μl , 用流动相层析[I, II 以辛可尼丁(VI)为内标, 用流动相(I)层析; III~V 以阿托品(VII)为内标, 用流动相(II)层析], 如图 1, 2。保留时间(t_R)、容量因子(K')、相邻谱带的分离度(R_s)见表 1。

(二) 标准曲线的绘制

内标溶液: (1) 辛可尼丁乙醇溶液 (3 mg/ml); (2) 阿托品乙醇溶液 (20 mg/ml)。

标准品溶液: 精密称取 I, II 各 10 mg 以及 III 5 mg, IV 20 mg, V 10 mg, 分别置 A (I+II), B(III+IV+V)二个 2 ml 容量瓶中, 用乙醇溶解并定容。分别精密吸取 A, B 溶液各 100, 200, 300, 400, 500 μl 置 1 ml 容量瓶中, A 溶液加内标溶液(1) 100 μl , B 溶液加内标溶液(2) 100 μl , 分别加乙醇至刻度。取各标准品溶液 1 μl 进样, 同上层析。以各标准

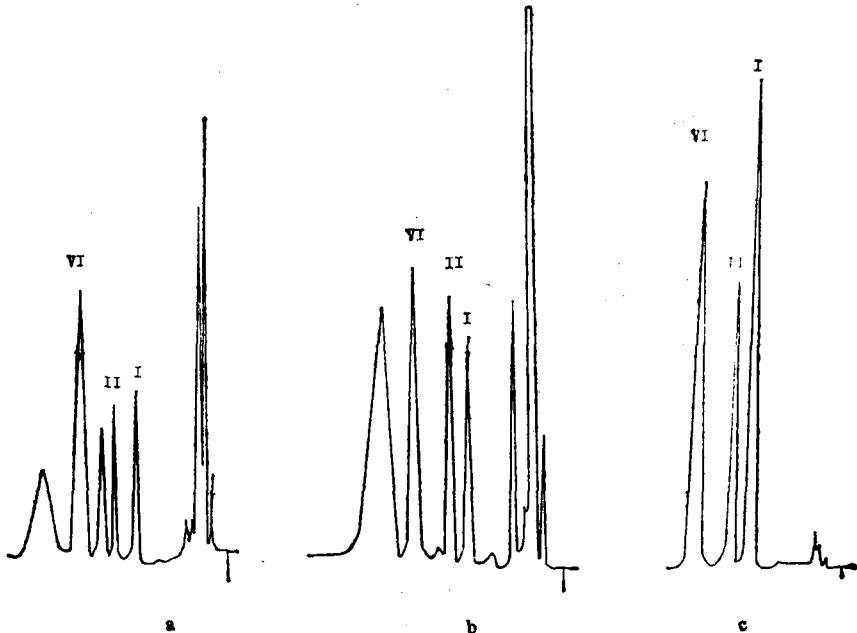


Fig 1. HPLC of samples (use mobile phase I)

Flow rate 1.3 ml/min, detect UV 220 nm

a. *S. alopeculoides* b. *S. flavescens* c. Standard

I. Sophocarpine II. Matrine VI. Cinchonidine.

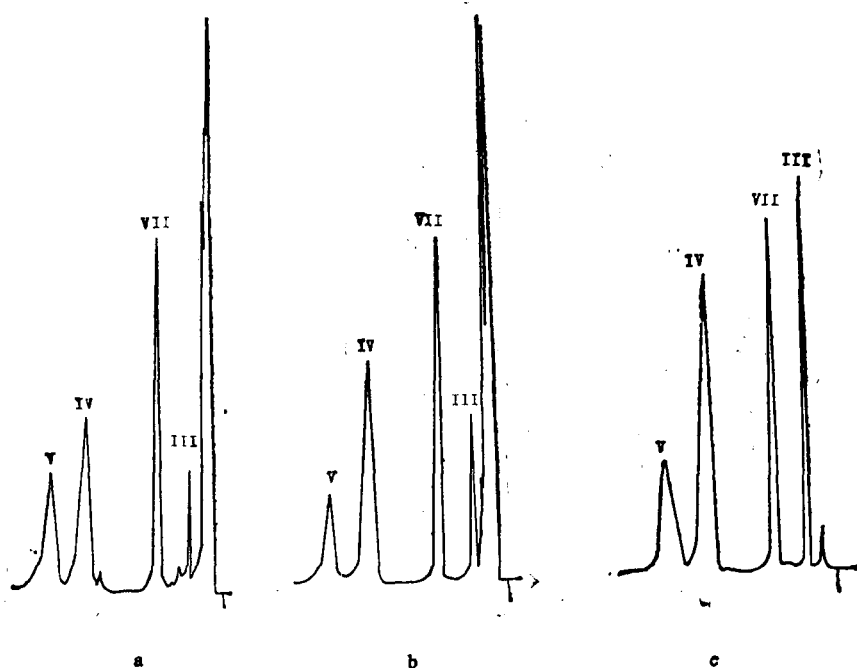


Fig 2. HPLC of samples (use mobile phase II)

Flow rate 2.2 ml/min, detect UV 220 nm

a. *S. alopecuroides* b. *S. flavescens* c. Standard

III. Sophoridine IV. Oxymatrine V. Oxysophocarpine VII. Atropine

Tab 1. HPLC data

Alkaloid	t_r (min)	K'	R_s
III	2.01	1	4.00
VII	4.27	3.27	
IV	8.99	7.99	
V	11.76	10.76	
I	5.81	2.52	1.50
II	7.06	3.76	
VI	9.58	4.81	2.37

品与内标峰高的比值(H_i/H_1)为纵坐标, 标准品重量(W_s)为横坐标作图, 分别得到 5 条通过原点的直线, 如图 3。

取标准品溶液 $1 \mu\text{l}$, 连续进样 9 次, 测得标准品与内标峰高的比值, 其平均值(\bar{X}), 标准偏差(δ), 变异系数(CV%)如表 2。

(三) 样品分析

1. 生药

(1) 预处理 苦参和苦豆子的氯仿提取物含有黄酮和色素等杂质, 干扰测定, 需用氧化铝柱净化, 用氯仿洗脱 I 和 II; 氯仿-甲醇(7:3)洗脱 III, IV, V, 可得到较满意的结果,

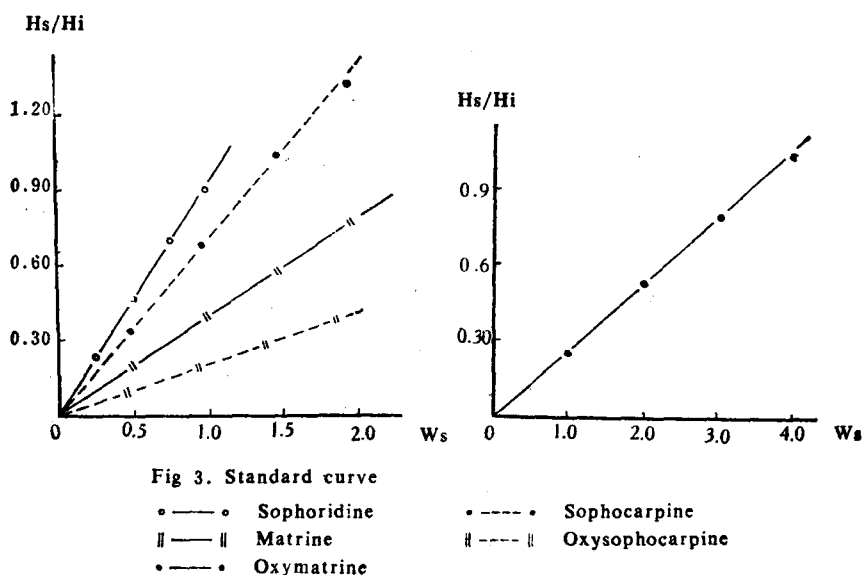


Fig 3. Standard curve

○—○ Sophoridine
 ||—|| Matrine
 ●—● Oxymatrine
 ●---● Sophocarpine
 ||---|| Oxy Sophocarpine

Tab 2. Accuracy of HPLC

Alkaloid	\bar{X}	δ_s	CV(%)
I	1.590	0.026	1.64
II	0.919	0.016	1.74
III	0.985	0.008	0.81
IV	1.033	0.007	0.068
V	0.413	0.007	1.69

其回收率为 98.2~99.3%。

(2) 测定法 精密称取生药粉末(40目) 1g, 置 50 ml 磨口三角瓶中, 用 0.4 ml 28% 氢氧化铵碱化, 准确加入 20 ml 氯仿, 密塞浸泡过夜, 棉花过滤, 弃去初滤液, 收集续滤液。

精密吸取 10 ml 滤液, 通过氧化铝柱(1×9 cm, 内装 4 cm 高中性氧化铝), 用 2 ml 氯仿洗脱(A)。另精密吸取 5 ml 滤液, 通过另一同样的氧化铝柱, 用氯仿-甲醇(7:3) 5 ml 洗脱(B)。分别收集 A 及 B 的洗脱液, 置水浴上挥尽溶剂。残留物分别用乙醇溶解并转移到 2 ml 容量瓶中。A 准确加入内标溶液(1) 200 μ l, B 准确加入内标溶液(2) 200 μ l, 分别用乙醇加至刻度。取 1~3 μ l 进样。A 以流动相(I)层析, B 以流动相(II)层析, 用内标峰高法计算样品中 I, II, III, IV, V 的百分含量。

2. 制剂

精密吸取 100 μ l 苦参素制剂(含苦参总碱 100 mg/ml), 置 2 ml 容量瓶中, 准确加入内标溶液(2) 200 μ l, 加乙醇至刻度。进样 0.5 μ l, 用流动相(II)层析, 内标峰高法计算 IV, V 的含量。

三. 薄层光密度法

(一) 条件的选择

曾用硅胶 G 薄层, 改良碘化铋钾试剂显色, IV 及 V 斑点周围出现白圈, 干扰测定, 改用色素, 碘-碘化铋钾试剂均不满意。采用碱性硅胶 G 薄层较好。斑点集中, 背景为白

色。

薄层的制备 硅胶 G 3g, 加 0.4% 氢氧化钠溶液 9ml, 调成糊状涂板 (15×20cm), 室温干燥过夜备用。薄层厚度为 0.2mm。

展开剂 经多种溶剂系统试验, I 与 II 的 Rf 值均较大, 而 IV 与 V 的 Rf 值太小, 五种生物碱用同一溶剂系统较难分离。采用阶式展开则结果满意。即先用苯—丙酮—甲醇 (8:3:0.5) 展开 (浓氨饱和 10 分钟) 20cm, 取出薄板, 挥尽溶剂, 再展开 10cm (原展开剂中加入 1ml 甲醇)。

显色 薄层自然挥尽溶剂后, 喷改良碘化铋钾试剂 20ml, 立即复盖一块同样大小的洁净玻板, 四周固定。斑点呈棕红色。Rf 值: I 为 0.73, II 为 0.66, III 为 0.46, IV 为 0.23, V 为 0.16。层析图谱见图 4。

测定 显色后, 斑点分别进行单波长扫描, 最大吸收波长均为 505~510nm, 650nm 处无吸收, 故选择样品波长 (λ_s) 510nm, 参考波长 (λ_r) 650nm。图 5 为苦参提取液薄层扫描图。

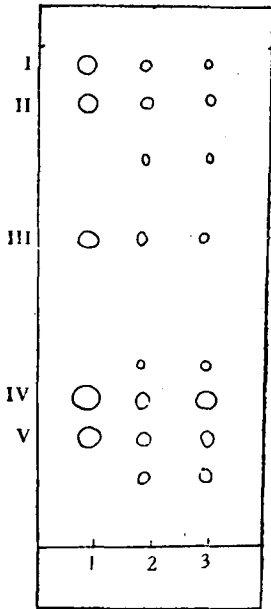


Fig 4. Thin layer chromatogram

1. standard 2. *S. flavescens* 3. *S. alopecuroides*

I. Sophocarpine II. Matrine III. Sophoridine IV. Oxymatrine V. Oxysophocarpine

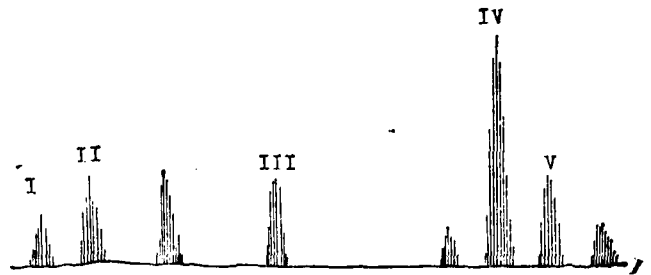


Fig 5. TLC scan of *S. flavescens*

(二) 标准曲线的制备

精密称取五种标准品各 1mg, 置 1ml 容量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度。点 1, 2, 3, 4 μ l 于薄层, 同上展开, 显色后扫描测定。用标准品重量对斑点面积值作图, 得到五条通过原点的直线。

(三) 稳定性试验

生物碱展开、显色后, 每隔一定时间测定斑点面积值, 除槐定随放置时间斑点面积值略有增高外, 其余均略降低。

为了考察放置对测定结果的影响, 在同一薄层上分别点 IV 和样品溶液, 同上展开, 显

色和测定。表 3 说明, 采用随行标准法, 测定结果几无影响。

Tab 3. Influence of time on results of analysis

Time (h)	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Standard	8947	8610	8199	8196	8100	8124	8094
Sample	9956	9531	9001	9014	8954	8868	8785
Content(%)	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59

(四) 分析方法

1. 拟定方法

生药 提取同高效液相层析法, 样品碱化后用氯仿提取, 收集滤液。

若样品中某组分含量较低, 可将滤液浓缩制备成 250mg/ml 生药的乙醇溶液。

针剂 精密取苦参素针剂 100 μ l, 置 1ml 容量瓶中, 加乙醇至刻度。

取上述样品溶液 2~10 μ l, 相间点样品点 3 个和标准品点 2 个于薄层上, 同上展开, 显色、测定斑点峰面积, 随行标准计算含量。

2. 方法的精密度

同一薄层精密度 同一薄层点五个同样量的样品点和两个标准品点, 按拟定方法测定含量, 五种组分变异系数为 1.62~2.77%。

不同薄层精密度 点三个同样量的样品点和两个标准品点, 同上测定。重复五块薄层, 五种组分变异系数为 1.93~5.77%。

四. 样品分析

用拟定方法分析了苦参、苦豆子根及苦参素针剂, 结果见表 4。

Tab 4. Comparison of results determined by HPLC and TLC

Sample	Alkaloid %									
	I		II		III		IV		V	
	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC
<i>S. flavescens</i>	0.058	0.058	0.149	0.156	0.116	0.126	2.160	2.160	0.906	1.040
<i>S. alopecuroides</i>	0.025	0.031	0.026	0.025	0.088	0.080	0.416	0.425	0.389	0.396
Injection	—	—	—	—	—	—	7.27	7.44	1.35	1.26

讨 论

1. 五种生物碱结构相似, 均由两个喹啉里西啶环稠合而成。I 与 II, V 与 IV 均只差一个双键, 层析行为相近, 而 IV 与 V 又分别是 I 与 II 的氮氧化物。前两者的极性较后者大, 用单一溶剂系统或一个流动相都不能很好分离五种组分。因此 HPLC 法采用了两种流动相, TLC 法用阶式展开法可满意地使五种生物碱分离和测定含量。

2. 实验证明 IV 与 V 在薄层上可与改良碘化铋钾试剂作用, 分别还原成 II 与 I。将显色后的 IV 与 V 斑点分别洗脱, 浓缩后点在薄层上, 展开, 出现与 II 及 I 相应的斑点, 而不经显色的 IV 与 V 无此斑点。刮取此两斑点, 洗脱后用 H₂O₂ 氧化, 重新得到 IV 与 V (经

TLC 与 HPLC 确认), 这可能是显色剂中 I⁻ 在酸性条件下具有还原作用所致。由于它们的吸收强度不同, 如采用标准曲线法计算含量将会带来误差, 本法用随行标准则无影响。

3. 两种方法都可用于苦参和苦豆子中五种生物碱的微量分析测定, 结果一致。高效液相层析法与薄层光密度法比较, 前者准确性高, 重现性好, 唯在 220nm 处检测, 有的杂质易产生干扰。后者样品不需净化, 操作简便。

4. 高效液相层析法用碱性流动相对硅胶柱有影响, 因此, 每次试验后, 应用甲醇冲洗至中性。

致谢 中国医学科学院放射医学研究所饶尔昌副研究员提供纯品, 本所冯瑞芝、连文琰同志提供生药及鉴定

参 考 文 献

1. 贵州省防治慢性气管炎办公室. 苦参研究资料汇编(1971~1978). 贵州:1979.
2. 白世泽等. 苦参生物碱成分的研究 II. 氧化苦参碱及其它生物碱成分的分离. 中草药 1982, 13:152.
3. Ueno A. et al. Studies on the lupin alkaloids. VII. Isolation and structure of (-) Δ^7 -dehydrosophoramine. *Chem pharm Bull* 1978, 26:1832.
4. Kojima R, et al. Antitumor activity of leguminosae plants constituents I. antitumor Activity of constituents of *S. subprostrata*. *Chem Pharm Bull* 1970, 18:2555.
5. 陶诗清等. 治疗急性菌痢植物药新资源—苦豆子. 植物学杂志 1974, (3):18.
6. 章育中等. 苦参及其制剂中生物碱的薄层分离和含量测定. 药学报 1981, 16:283.
7. 太田長世、三野芳紀. 漢藥苦參の生薬学的研究(第1報). 高速液体クロマトグラフによる苦參中のアルカロイド組成の検討. 生薬学雑誌 1979, 33:140.

HPLC AND TLC-DENSITOMETRY DETERMINATION OF ALKALOIDAL CONSTITUENTS IN *SOPHORA FLAVESCENS* AND *SOPHORA LOPECUROIDES*

CUI Jian-Fang, ZHANG Guan-De and WANG Mu-Zou

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

ABSTRACT This paper deals with two analytical methods (HPLC and TLC-densitometry) of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. and *Sophora alopecuroides* Linn. Sophocarpine (I), matrine (II), sophoridine (III), oxymatrine (IV) and oxysophocarpine (V) all were fairly separated either on alkaline silica gel G thin layer by step-wise development or on HPLC silica gel column with two mobile phases. Cinchonidine and atropine were chosen as internal standard respectively and quantified by peak height ratio in the HPLC method.

Both methods are sensitive, simple and rapid. The CV% are 1.62~2.77% and 0.6~1.74% respectively. Analytical results obtained by these two methods are in good agreement.

Key words *Sophora flavescens* Ait.; *Sophora alopecuroides* Linn.; TLC-densitometry; HPLC; Sophocarpine; Matrine; Sophoridine; Oxymatrine; Oxysophocarpine