

TLC 和 HPLC 法同时测定苦豆子总碱中槐定碱和苦参碱的体系优化

周星辰¹, 李 鹏², 顾沛雯¹

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 省部共建天然气转化国家重点实验室培育基地, 宁夏 银川 750021)

摘 要:采用薄层层析法(TLC), 展开剂为氯仿-甲醇-氨水=8:2:0.1; 同时采用高效液相色谱法(HPLC), 色谱柱为 Ultra II™ C₁₈ (5 μm×250 mm×4.6 mm)、流动相为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液-甲醇(45:55)、检测波长为 216 nm、流速为 1.0 mL/min、柱温为 30℃、进样量为 10 μL; 建立 TLC 和 HPLC 同时分离测定苦豆子生物碱体系的优化方法。结果表明:槐定碱和苦参碱在 200~900 μg/mL 浓度范围内呈良好的线性关系, R^2 分别为 0.9994 和 0.9996。平均回收率($n=9$)分别为 99.47% 和 99.82%; 试验表明可通过 TLC 和 HPLC 法同时测定苦豆子总碱中槐定碱和苦参碱的含量, 并可用该方法进行苦豆子药材及含苦豆子药用成分的质量控制。

关键词:苦豆子; 生物碱; TLC; HPLC

中图分类号:Q 946.8 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)18-0041-03

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.) 属豆科槐属植物, 主要分布于我国北方的荒漠、半荒漠地区。近年来研究发现苦豆子中富含生物碱, 其主要成分为苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱、氧化槐果碱、苦豆碱等 20 多种生物碱^[1], 具有清热解毒、驱风燥湿、抗菌杀虫、抗肿瘤、免疫等多种功效, 具有重要的药用价值和经济价值^[2]。目前已经有了关于苦豆子中生物碱的种类及其含量分析的报道, 但由于苦豆子中各生物碱单体的化学结构和极性较为接近, 对生物碱单体的分离和含量测定仍是一个难点^[3-4]。该试验建立了 TLC 和 HPLC 法同时测定苦豆子总碱中槐定碱和苦参碱 2 种主要生物碱的体系优化, 此方法专属性强、检测准确、分离快速, 可用于苦豆子相关产品生物碱的质量监测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苦豆子总碱购于宁夏盐池县都顺生物化工有限公司; 槐定碱对照品(批号:13032002)、苦参碱对照品(批号:1302194)、氧化苦参碱对照品(批号:13021902), 对照品均为上海融禾医药科技有限公司购置。

高效液相色谱仪(AGILENT1100, 美国安捷伦公

司); 紫外光谱仪(UV2450, 日本岛津公司)。

1.2 试验方法

以硅胶 G-0.5% CMC(1B5) 铺板, 自然干燥后放入 105℃ 烘箱活化 30 min; 展开剂为氯仿-甲醇-氨水(8:2:0.1 V/V)^[5], 显色液为碘化铍钾^[6], 将苦豆子总碱样品点样进行 TLC 检测。

HPLC 色谱柱: Ultra II™ C₁₈ (5 μm×250 mm×4.6 mm); 流动相: 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(K₂HPO₄ 5.59 g/L, KH₂PO₄ 0.41 g/L, pH 8.5)-甲醇(45:55 V/V); 检测波长: 216 nm; 柱温 30℃; 流速: 1.0 mL/min。

2 结果与分析

2.1 TLC 法初检

精密称取 0.5 g 苦豆子总碱溶于 10 mL 甲醇中, 用毛细管沾取适量点于薄层层析板上, 用氯仿-甲醇-氨水(8:2:0.1 V/V) 作为展开剂充分展开, 得到 2 个橘红色斑点, R_f 值分别为 0.67 和 0.99(图 1)。

2.2 线性关系考察

精密称取 0.5 g 苦豆子总碱溶于 10 mL 甲醇中, 加入 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, 置于 25 mL 容量瓶中, 并加流动相定容, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为样品溶液。

将 20 mg 槐定碱和苦参碱对照品分别溶于 10 mL 甲醇中, 加入 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, 摇匀, 作为对照品储备液。

精密吸取槐定碱和苦参碱对照品储备液各 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 mL, 加入流动相定容至 10 mL, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按上述色谱条件进样分析, 进样量为 10 μL。以浓度为横坐标(c)、峰

第一作者简介:周星辰(1988-), 男, 辽宁丹东人, 硕士研究生, 研究方向为生物防治与微生物资源利用。

责任作者:顾沛雯(1969-), 女, 宁夏银川人, 博士, 教授, 现主要从事植物病理学等教学与科研工作。E-mail: gupeiwen2013@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260452)。

收稿日期:2014-04-22

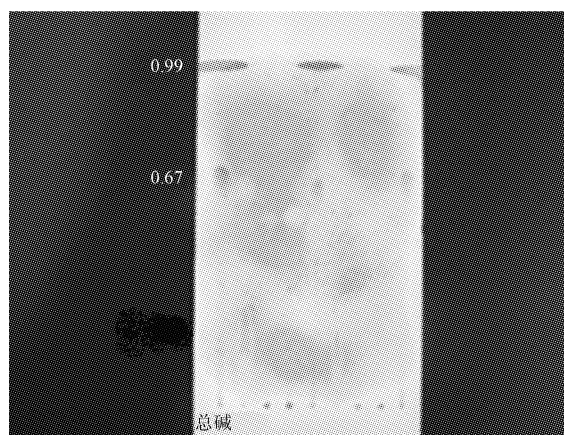


图1 苦豆子总碱的 TLC 检测

Fig. 1 Detection of total alkaloid of *Sophora alopecuroides* L. by TLC

面积值为纵坐标(A)进行线性回归,得槐定碱、苦参碱的回归方程分别为: $A=11.0531c+0.5462, R^2=0.9994$; $A=10.7394c+0.4389, R^2=0.9996$,线性范围均在 200~900 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 精密度试验

分别精密吸取槐定碱和苦参碱对照品储备液各 2.5 mL,用流动相定容至 10 mL,得混合对照品溶液。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按上述色谱条件重复进样 6 次,进样量为 10 μL ,记录峰面积。槐定碱和苦参碱峰

面积的 RSD 分别为 1.11% 和 0.73%。

2.4 稳定性试验

在室温条件下,取苦豆子总碱样品溶液,按 0、2、4、6、8、10、12 h 时间间隔分别测定色谱峰峰面积。槐定碱和苦参碱峰面积的 RSD 分别为 0.73% 和 0.62%,表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验

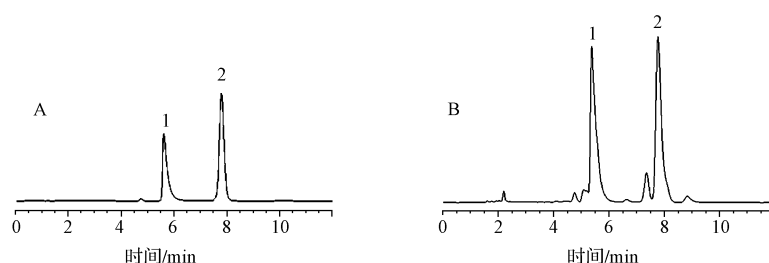
按 2.2 项下方法制备样品溶液 5 份,按上述色谱条件进行分析,测得苦豆子总碱样品中槐定碱和苦参碱的浓度分别为 324.61、415.31 $\mu\text{g/mL}$,RSD 分别为 1.32% 和 1.45%。

2.6 回收率试验

取已知浓度的苦豆子总碱样品 9 份,每份 30 mg,精密称定。分别精密加入槐定碱和苦参碱对照品溶液,使对照品的加入量分别为 5、10、15 mg,按 2.2 项下方法制备含对照品为高、中、低 3 种浓度的样品溶液,每组样品 3 份,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按上述色谱条件进样分析,进样量为 10 μL ,测定回收率。槐定碱和苦参碱的平均回收率($n=9$)分别为 99.47% 和 99.82%。

2.7 样品测定

精密吸取样品溶液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按上述色谱条件进样分析,进样量为 10 μL ;另取 2 种对照品适量,按 2.3 项下方法制备成含槐定碱和苦参碱浓度均为 1 mg/mL 的混合对照品溶液,同时测定,色谱图见图 2。



注:1. 槐定碱;2. 苦参碱。

Note: 1. Sophocarpine; 2. matrine.

图2 对照品(A)和样品(B)的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

3 结论与讨论

TLC 展开剂的选择过程中,曾经试用过乙酸乙酯-乙醇-氨水(5:1:0.5 V/V)展开剂^[6],采用乙醇溶解苦豆子总碱,但由于苦豆子总碱中的几种主要生物碱成分在该展开剂条件下展开距离较近,虽然试用过多种展开剂组成和比例进行了调整和摸索,但都不能达到氯仿-甲醇-氨水(8:2:0.1 V/V)作为展开剂的展开效果。

通过高相液相色谱法对苦豆子总碱所含生物碱成分的分离可知该苦豆子总碱样品中氧化苦参碱含量较少,其对照品色谱图见图 3,在苦豆子总碱色谱图相同的位置没有明显的氧化苦参碱色谱峰,结果与 Zong 等^[7]研究结果一致。

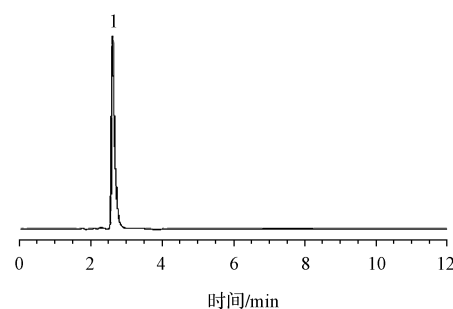


图3 氧化苦参碱对照品的色谱图

Fig. 3 The standard chromatogram of oxymatrine

HPLC 流动相的选择过程中,曾经试用过乙腈-磷酸盐缓冲液-无水乙醇(8:1:1 V/V)流动相^[3],采用该流动相溶解苦豆子总碱,结果只得到洗脱时间初期的杂峰。也试用过磷酸盐缓冲液-甲醇(22:78 V/V)的流动相比例^[8],采用该流动相溶解苦豆子总碱,结果流动相组成能够分离得到几个有效峰,但峰高不明显,而且同样洗脱时间初期杂峰较多,经流动相比比例摸索后得到磷酸盐缓冲液-甲醇(45:55 V/V)作为流动相的洗脱效果最佳。

对苦豆子总碱中单体生物碱的含量测定结果表明,在 1 mg 苦豆子总碱样品中槐定碱和苦参碱的含量较高,分别为 324.61 $\mu\text{g/mL}$ 和 415.31 $\mu\text{g/mL}$,2 种单体生物碱合计约占苦豆子总碱总量的 74%。

参考文献

[1] Qin X G, Yuan Y J. Studies on extraction of alkaloids in seed of

Sophora alopecuroides[J]. Chin Tradit Herb Drugs,2001,32(7):604.

[2] 何美仙. 植物内生真菌作为生防因子的研究进展[J]. 植物保护, 2005,31(1):10-14.

[3] 耿革霞,孙英华,向柏,等. HPLC 法同时测定苦豆子总碱中槐定碱、苦参碱和槐果碱的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(5):671.

[4] Song J Z, Xu H X, Tian S J, et al. Determination of quinolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal drugs by nonaqueous capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A,1999,857:303.

[5] 刘军锋,周沫,欧阳艳,等. 从苦豆子中分离纯化苦参碱和槐定碱的工艺研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版),2011(4):110-114.

[6] 周星辰,郝丽,张伟,等. 产喹诺里西啶碱苦豆子内生真菌的筛选与鉴定[J]. 农业科学研究,2013(1):28-32.

[7] Zong L, Li K L, Ma Y Z, et al. The determination of matrine alkaloids in Kexieling tablets by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm,1998,15(6):38.

[8] 张爱华,张悦晗. 高效液相色谱法同时分离测定氧化苦参碱、槐定碱、槐胺碱、苦参碱、槐果碱[J]. 药物分析杂志,2008(6):964-966.

System Optimization of TLC and HPLC Simultaneous Determination of Sophoridine and Matrine in Total Alkaloid of *Sophora alopecuroides* L.

ZHOU Xing-chen¹, LI Peng², GU Pei-wen¹

(1. Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Breeding Base of National Key Laboratory of Natural Gas Conversion, Province and Ministry Common Construction, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Thin layer chromatography(TLC) was adopted, developing solvent was chloroform-methanol-ammonia=8:2:0.1; meanwhile, the chromatographic column of high performance liquid chromatography(HPLC) included Ultra IITM C₁₈ (5 μm ×250 mm×4.6 mm) and mobile phase consisting of a mixture of 0.01 mol/L phosphate buffer-methanol (45:55), the detection wavelength was 216 nm, the flow rate was 1.0 mL/min; to establish the system optimization of TLC and HPLC methods for simultaneous separation and determination of alkaloids of *Sophora alopecuroides* L. The results showed that, the method had a good linearity and correlation coefficient; the sophoridine and matrine were 200~900 $\mu\text{g/mL}$. The mean recoveries ($n=9$) were 99.47% and 99.82% respectively. The experiment showed that, this method was simple, rapid and accurate assay for the determination of sophoridine and matrine in total alkaloid of *Sophora alopecuroides* L., and suitable for quality control in the production of *Sophora alopecuroides* L.

Keywords: *Sophora alopecuroides* L.; alkaloid; TLC; HPLC

欢迎订阅 2015 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16 开本,国内外公开发行,国内每期定价:10.00 元,全年 60.00 元,邮发代号:14-95。国外每期定价:10.00 美元(含邮资),全年 60.00 美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话:0451-86668735 网址:www.haasep.cn E-mail:dadouxk@sina.com ddkexue@126.com