

苦参生物碱类成分的HPLC指纹图谱研究

易远红^{1*}, 郝月蕾²(1.成都中医药大学附属医院药剂部, 成都 610072; 2.成都中医药大学中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1772-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.14

摘要 目的:建立苦参生物碱类成分的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:色谱柱为Kromasil NH₂(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-乙醇(8:1, V/V)-3%磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为1 ml/min, 检测波长为220 nm; 采用《中药色谱指纹图谱评价系统》(2004A版)对3批样品进行相似度评价。结果:建立的HPLC指纹图谱中,苦参生物碱类成分各峰分离度较好,一共确定了17个共有峰,并对其中5个峰进行了定位指认;3批样品的相似度均>0.9。结论:该方法可得到精密度、重复性、稳定性较好的苦参生物碱类成分的HPLC指纹图谱,为苦参提取物的质量控制提供另一种检测方法。

关键词 苦参;生物碱;指纹图谱;高效液相色谱法

Study on HPLC Fingerprints of Alkaloids from *Sophora flavescens*

YI Yuan-hong¹, HAO Yue-pu²(1.Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; 2.Key Lab for Systematic Study and Utilization of TCM Source, Chengdu University of TCM, Ministry of Education, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of alkaloids from *Sophora flavescens*. METHODS: The determination was performed on Kromasil NH₂(250×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-ethanol (8:1, V/V)-3% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 220 nm. The similarity of 3 batches of samples was evaluated by using *TCM Chromatographic Fingerprint Evaluation System* (2004 A edition). RESULTS: In HPLC fingerprints, the chromatographic peaks of alkaloids from *S. flavescens* were well-separated, and there were 17 common peaks, among which 5 peaks were positioned and identified. The similarity of 3 batches was more than 0.9. CONCLUSIONS: HPLC fingerprint of alkaloids from *S. flavescens* can be obtained with good precision, reproducibility and stability, providing another detection method for quality control of alkaloids from *S. flavescens*.

KEYWORDS *Sophora flavescens*; Alkaloid; Fingerprint; HPLC

苦参(*Sophora flavescens* Ait.)为豆科槐属植物苦参的干燥根,全国各地均有出产,是我国常用中药。苦参具有清热燥湿、泻火解毒、祛风止痒的功效,同时还具有抗肿瘤^[1-2]、抑菌^[3]等作用,其主要含有生物碱类、黄酮类和皂苷类成分,发挥疗效的是生物碱类成分。苦参生物碱大多为喹诺里西啶类结构,碱性较强,酸性流动相条件下,它在C₁₈柱色谱峰拖尾严重^[4]。目前尚未发现采用正相柱对生物碱类成分进行指纹图谱的系统研究。本研究采用氨基柱为分离柱,以乙腈-乙醇(8:1, V/V)为有机相,3%磷酸水溶液为水相,梯度洗脱,测定苦参生物碱类指纹图谱,以为苦参生物碱类指纹图谱的测定提供另一种检测方法。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱(HPLC)仪,包括四元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样针、恒温柱箱、DAD 二极管阵列检测器、Agilent 化学工作站(美国 Agilent 公司);BS224S 型十万分之一型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

* 主管药师。研究方向:医院药学、中药学。E-mail: 895239295@qq.com

1.2 试剂

AB-8 大孔吸附树脂购自南开大学化工厂;苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱对照品(批号分别为110805-200508、110780-201007、110783-200115、110779-201046、110784-20303)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、磷酸为分析纯,乙腈、乙醇为色谱纯,水为双蒸水。

1.3 药材

苦参药材(批号:101003)购自四川科伦天然药业有限公司,经笔者鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 试液的制备

2.1.1 苦参生物碱的提取 参照文献^[5],取苦参药材粗粉适量,渗漉法制备样品,以1 g/ml的适量浓度浓缩后,上样于AB-8大孔吸附树脂(径高比1:3),用1.5倍体积水洗除杂,再用6倍体积50%乙醇以每小时2倍体积的流速洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,真空干燥,即得生物碱类提取物。

2.1.2 供试品溶液的制备 取苦参生物碱类提取物,精密称定0.100 2 g,溶于25 ml无水乙醇中,超声处理30 min,滤过,定容至50 ml容量瓶中,精密吸取1 ml,定容至10 ml容量瓶中,稀释至刻度,即得供试品。

2.1.3 对照品溶液的制备 取苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化

槐果碱、槐定碱,分别精密称定0.011 20、0.01532、0.013 40、0.016 6、0.010 01 g,置于10 ml容量瓶中,加乙腈-甲醇溶液(80:20, V/V)至刻度,精密吸取1 ml,置于10 ml容量瓶中,稀释至刻度,即得对照品溶液;将槐定碱和氧化苦参碱对照品等量混合,制得混合对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱:正相柱Kromasil NH₂(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:有机相为乙腈-乙醇(8:1, V/V),水相为3%磷酸水溶液,梯度洗脱(程序见表1);流速:1 ml/min;检测波长220 nm;进样量:10 μl;柱温:30 ℃。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient dilution procedure

时间, min	有机相, %	水相, %
0~20	100	0
>20~40	90	10
>40~50	80	20
>50~60	100	0
>60	100	0

2.3 参照峰的选择

将苦参碱对照品溶液和供试品溶液各进样10 μl,对比图谱中保留时间约为32 min的色谱峰为苦参碱,因其色谱峰易于辨认、与其他的峰分离良好,且峰形稳定、保留时间适中,故采用此峰为参照峰。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度的试验 取苦参生物碱类成分供试品溶液适量,按“2.1.2”项制备,连续进样6次,以苦参碱峰为标准峰,考察色谱峰的相对保留时间和峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<0.15%,峰面积的RSD<2.5%,表明精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取“2.4.1”项下供试品溶液适量,从制备到放置0、2、4、8、16 h后,分别测定。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<1.97%,峰面积的RSD<5.0%,说明生物碱类成分在室温条件下16 h内稳定。

2.4.3 重复性试验 取苦参生物碱类提取物适量,精密称定0.1002、0.1003、0.1001、0.1003、0.1002、0.1005 g,共6份,按“2.1.2”项下操作法制备供试品溶液,分别进样测定。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<1.3%,峰面积的RSD<3.5%,表明此方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.1 样品指纹图谱的测定 分别取3个批次的苦参生物碱类提取物适量,按“2.1.1”项下操作法制备供试品溶液,在HPLC色谱仪中按上述色谱条件进样,记录60 min HPLC色谱峰,以峰出现率100%计,确定17个共有峰。色谱见图1。

2.5.2 共有峰的标定与确认 将3批苦参提取物的色谱数据导入国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱评价系统》(2004 A版)^[6],设定匹配模板,进行谱峰多点校正,并生成对照指纹图谱,见图2。确定比较稳定的共有峰17个,3批的相似度均>0.9,平均值为0.997,表明所建立的指纹图谱技术指标稳定,重复性好,见表2。

2.5.3 主要色谱峰的指认 根据同一化合物相同色谱分离条件下保留时间相同,紫外光谱图一致的原则,分别指认出5个色谱峰,分别是12号峰(槐果碱)、13号峰(苦参碱)、14号峰(氧化槐果碱)、15号峰(槐定碱)和16号峰(氧化苦参碱)。槐定碱和氧化苦参碱的极性相似,保留时间差异不大,故将槐定

碱和氧化苦参碱混匀测定,结果见图3。

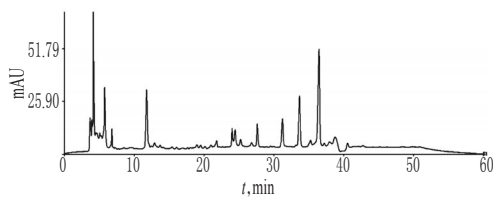


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

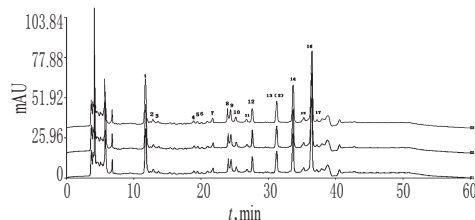


图2 3批苦参生物碱类成分的HPLC指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprints of 3 batches of alkaloids from *S. flavescens*

表2 3批样品指纹图谱中共有峰的保留时间和峰面积

Tab 2 The retention time and peak area of the fingerprints of 3 batches of samples

峰号	保留时间, min	批号1峰面积	批号2峰面积	批号3峰面积	对照指纹图谱	保留时间RSD, %	峰面积RSD, %
1	11.765	469.852	473.568	477.634	473.685	0.23	0.82
2	12.884	75.086	75.938	76.913	75.979	0.27	1.20
3	13.667	29.700	33.114	32.330	31.715	0.26	5.64
4	18.959	43.040	55.828	45.886	48.251	0.24	13.91
5	19.476	34.299	34.225	33.788	34.104	0.21	0.81
6	20.117	18.558	19.456	18.635	18.883	0.23	2.64
7	21.781	69.198	69.502	79.288	72.663	0.16	7.90
8	23.996	93.603	95.386	95.647	94.878	0.23	1.17
9	24.436	143.758	142.997	144.334	143.696	0.20	0.47
10	25.220	62.441	61.577	65.145	63.054	0.18	2.95
11	26.799	35.142	38.955	39.822	37.973	0.17	6.56
12	27.610	130.143	131.931	134.257	132.110	0.02	1.56
13	31.244	216.127	219.220	220.429	218.592	0.03	1.02
14	33.686	398.012	391.748	393.090	394.283	0.03	0.84
15	35.267	83.485	87.575	88.610	86.557	0.05	3.13
16	36.479	956.307	960.885	957.929	958.374	0.05	0.24
17	37.226	71.324	76.065	70.065	72.485	0.04	4.37

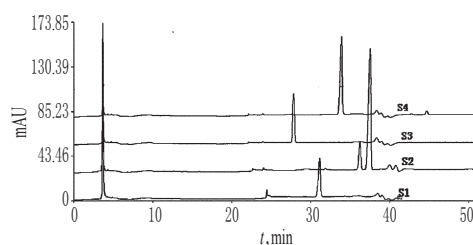


图3 对照品的HPLC图

S1. 苦参碱对照品; S2. 槐定碱与氧化苦参碱的混合对照品; S3. 槐果碱对照品; S4. 氧化槐果碱对照品

Fig 3 HPLC chromatograms of substance control

S1. matrine control; S2. mixed control of sophoridine and oxymatrine; S3. sophocarpine control; S4. oxysophocarpine control

3 讨论

黄颖等^[7]在对山豆根生物碱的指纹图谱研究中发现,采用

短叶决明的化学成分研究

胡碧辉*, 岑乐定(奉化市中医院中药房, 浙江 奉化 315500)

中图分类号 R284.1;R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1774-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.15

摘要 目的:研究豆科决明属植物短叶决明的化学成分,为扩大药用资源提供依据。方法:采用柱色谱和重结晶方法分离纯化短叶决明的乙醇提取物,运用波谱技术鉴定化合物结构。结果:一共分离得到了7个化合物,经鉴定为大黄素-8-O- β -D-龙胆二糖苷(1)、2-甲氧基大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(2)、甾醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(3)、 β -谷甾醇(4)、甾醇(5)、橙黄决明素(6)、和熊果酸(7)。结论:化合物1、2、3、6、7为首次从该植物中得到。本试验结果可为短叶决明的进一步研究提供依据。
关键词 短叶决明;化学成分;分离;鉴定

Chemical Constituents of *Cassia leschenaultiana*

HU Bi-hui, CEN Le-ding (TCM Pharmacy, Fenghua Municipal Hospital of TCM, Zhejiang Fenghua 315500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the chemical constituents from *Cassia leschenaultiana*, and to provide basis for expanding medicinal resources. METHODS: The ethanol extract was isolated and purified by column chromatograph and recrystallization method; the structures were identified by spectrometer. RESULTS: 7 compounds were isolated from *C. leschenaultiana*, and identified as emodin-8-O- β -D-gentiobioside (1), 2-methoxy-chrysoflavone-8-O- β -D-glucopyranoside (2), stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside (3), β -sitosterol (4), stigmasterol (5), aurantio-obtusin (6) and ursolic acid (7). CONCLUSIONS: Compounds 1, 2, 3, 6, 7 are isolated from this plant for the first time. The study provide reference for the further study of *C. leschenaultiana*.

KEYWORDS *Cassia leschenaultiana*; Chemical constituents; Isolation; Identification

短叶决明 *Cassia leschenaultiana* DC. 为豆科决明属植物, 又名夜合草、野皂角、大叶山扁豆、土柴胡, 生于海拔 500~2 200 m 的山坡、草地、灌丛, 多见于浙江、江苏、广东、广西等长江和珠江流域各省区。其根入药, 具有清热解毒、平肝安神、

消肿排脓的功效, 被用于治疗腹痛下痢、咽喉肿痛、夜盲症、失眠、湿疹、疔疮等^[1]。目前, 国内外对于短叶决明的化学成分已经有了较为系统的研究报道, 证实其化学成分主要包括蒽醌、甾醇、各种烷烃及其衍生物等; 然而, 确定短叶决明各单一化

C₁₈ 柱色谱峰易拖尾, 加大磷酸和三乙胺的浓度可以使峰形减少拖尾; 但随着加入浓度的升高, 对仪器和色谱柱的损害也在增大^[8]。赵华等^[9]在对苦参药材生物碱成分的指纹图谱研究中发现, 苦参生物碱碱性较强, 酸性流动相条件下, 它们在 C₁₈ 柱上的色谱峰拖尾严重。在水相中添加氨水可显著抑制峰拖尾, 同时可提高保留强度。可见, 使用 C₁₈ 柱对生物碱的指纹图谱研究都存在色谱峰的拖尾问题, 而且在流动相中到底是加酸还是加碱能够较有效地抑制拖尾等问题也有待研究。

按照上述实验条件对购买的苦参生物碱类成份进行分析, 发现苦参生物碱类成分的色谱峰都集中在 25~40 min 之间, 各色谱峰之间分离度较好, 也证明了生物碱极性都较大, 如果采用 C₁₈ 柱梯度洗脱分离, 生物碱类成分都较集中出现在前半段, 对色谱峰的分离效果较差。

通过查阅文献, 未见采用氨基柱测定生物碱类指纹图谱的报道, 故本研究拟在解决 C₁₈ 柱拖尾问题的同时, 也为生物碱类成分的指纹图谱研究提供另一种方法, 故只对 3 批苦参生物碱类成分进行了指纹图谱的研究, 以后需要增进 10 批苦参生物碱类成分进行系统的指纹图谱考察。

参考文献

- [1] 张力, 李海英, 吴式琇, 等. 苦参碱对人鼻咽癌 CNE₂ 细胞增殖的抑制作用研究[J]. 江西中医药, 2009, 21(6): 75.
- [2] 徐广伟, 满世军, 王志生, 等. 氧化苦参碱对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2001, 8(5): 10.
- [3] 蒋莲芳, 蒋亚生. 苦参药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(3): 278.
- [4] 赵华, 宋敏, 赵画, 等. 苦参药材生物碱成分的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国医科大学学报, 2009, 40(2): 139.
- [5] 王莹, 向孙敏, 王森, 等. 苦参生物总碱纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1 634.
- [6] 刘文, 蒋世云. 中药指纹图谱研究与应用进展[J]. 中国药房, 2011, 22(19): 1 819.
- [7] 黄颖, 王乃平, 陈勇. 广西产山豆根 HPLC 指纹图谱测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 66.
- [8] 宋洁瑾, 陈涛, 李进. 梯度洗脱方法在中药指纹图谱中的应用[J]. 天津药学, 2007, 19(6): 70.
- [9] 赵华, 宋敏, 赵画, 等. 苦参药材生物碱成分的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国医科大学学报, 2009, 40(2): 139.

(收稿日期: 2013-12-09 修回日期: 2014-01-20)

* 主管中药师。研究方向: 中药鉴别。E-mail: sanren8@126.com