

HPLC法同时测定人血浆中苦参4种生物碱的含量

李志红*(解放军第324医院药剂科,重庆 400020)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2504-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.03

摘要 目的:建立同时测定人血浆中苦参4种生物碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Agilent ZORBAX NH₂(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液(81:10:9, V/V/V),流速为1 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为室温。结果:槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱的进样量分别在0.034 72~0.258 60、0.012 84~0.113 65、0.023 77~0.240 93、0.452 48~4.520 63 μg范围内与待测物峰面积积分值呈良好线性关系($r \geq 0.999 3$);槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱精密度的RSD均小于2.0%;短期、长期、循环稳定性的RSD均小于3.20%;重复性试验的RSD均小于3.0%;提取回收率分别为1.14%~2.35%、1.45%~2.32%、1.29%~2.51%、1.62%~2.47%。结论:该方法灵敏度高、精密度高,可用于苦参中4种生物碱的药动学研究。

关键词 苦参;高效液相色谱法;生物碱;血浆

Content Determination of 4 Kinds of Alkaloids in *Sophora flavescens* in Human Plasma by HPLC

LI Zhi-hong(Dept. of Pharmacy, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 4 kinds of alkaloids in *Sophora flavescens* in human plasma. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ZORBAX NH₂(4.6 mm×150 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-absolute alcohol-3% phosphoric acid solution (81:10:9, V/V/V) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was room temperature. RESULTS: The linear ranges were 0.034 72-0.258 60 μg for sophoridine, 0.012 84-0.113 65 μg for sophocarpine, 0.023 77-0.240 93 μg for matrine and 0.452 48-4.520 63 μg for oxymatrine ($r \geq 0.999 3$). RSDs of precision tests of them were all lower than 2.0%. RSDs of short-term stability test, long-term stability test and cyclic stability test were less than 3.20%; RSD of repeated test was lower than 3.0%; extraction recoveries were 1.14%-2.35%, 1.45%-2.32%, 1.29%-2.51% and 1.62%-2.47%. CONCLUSIONS: The method is sensitive and accurate, and can be used for the pharmacokinetic study of 4 kinds of alkaloids in *S. flavescens*.

KEYWORDS *Sophora flavescens*; HPLC; Alkaloid; Plasma

- 胞的保护作用[J].中草药,2004,35(8):921.
- [3] 田琳琳.复方丹参有效成分对神经细胞氧化损伤的保护作用机制[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2009.
- [4] Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, et al. The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2001(11):449.
- [5] Gu H, Wall SC, Rudnick G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(10):7 124.
- [6] 谢利霞,赵飞宇,李晖,等.左旋多巴与丹参注射液联合用药对鱼藤酮诱导的分化PC12细胞凋亡的保护作用[J].今日药学,2013,23(7):404.
- [7] Katsube N, Sunaga K, Aishita H, et al. ONO-1603, apotential antidementia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288(1):6.
- [8] 皮荣标,颜光美.3-磷酸甘油醛脱氢酶与神经元凋亡[J].中国神经学杂志,2000,16(1):73.
- [9] Huang J, Hao L, Xiong N, et al. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: relevance to protein misfolding and aggregation[J]. *Brain Res*, 2009, 1 279.
- [10] 陈春暖,王涛.3-磷酸甘油醛脱氢酶与帕金森病[J].中国临床神经科学,2011,19(5):539.
- [11] 陈生弟,周海燕.帕金森病的发病机制研究机制进展[J].中国实用内科杂志,2006,26(4):246.
- [12] 杨丽,吕娥,付文玉,等.泛素蛋白酶体系统功能缺陷致帕金森病的机制研究[J].国际病理科学与临床杂志,2009,29(4):324.
- [13] 郑华平.20S蛋白酶体对帕金森病的诊断意义[D].重庆:重庆医科大学,2012.

(收稿日期:2013-08-27 修回日期:2013-10-17)

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:023-68762848。
E-mail:hu_shili0831@sina.com

苦参,别名苦骨、地槐等,为豆科植物豆参 *Sophorae flavescens* Ait. 的干燥根^[1]。生长于海拔1,500米的地区,多生在山坡、沙地、草坡、灌木林中和田野附近,目前尚未由人工引种栽培。其具有清热燥湿、杀虫、利尿之功效,中医临床常用于治疗热痢、便血、黄疸尿闭、赤白带下、阴肿阴痒、湿疹等。现代药理研究表明,苦参具有调节血脂和抗脂质氧化^[2-3]、抗肿瘤^[4]、抗肝纤维化^[5]、抗炎^[6]、抗病毒^[7]、及免疫调节作用^[8]。苦参中多种生物碱是其主要的药理学成分,其中以槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱较为重要(见图1)。目前,对人血浆中苦参碱检测多集中于2种或单种成分^[9-10],未见4种成分同时测定的报道。为此,笔者建立了在人血浆中同时测定槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱的高效液相色谱(HPLC)测定法,以为苦参碱体内药动学的研究提供支持。

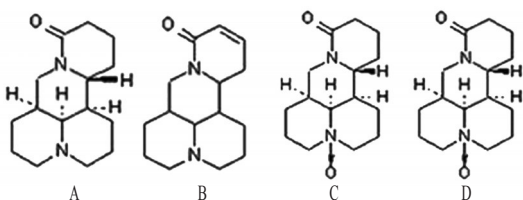


图1 4种生物碱化学结构式

A.槐定碱;B.槐果碱;C.苦参碱;D.氧化苦参碱

Fig 1 The chemic structure of 4 kinds of alkaloids

A.sophoridine;B.sophocarpine;C.matrine;D.oxymatrine

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪,包括Agilent chemstation 色谱工作站、1100DAD型检测器(美国Agilent公司);BSA223S型电子天平(德国赛多利斯公司);TG18G型高速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为1105-200005、1201-2014、1085-9702、1127-7802);十二烷基硫酸钠、乙腈为色谱纯,水为三蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX NH₂(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液(81:10:9, V/V/V);流速:1 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:室温;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒质量的槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱对照品适量,用乙腈-无水乙醇(80:20, V/V)溶解,分别制备成质量浓度分别为0.469 8 mg/ml、0.503 5 mg/ml、0.436 0 mg/ml、0.497 5 mg/ml的对照品母液。精密移取槐定碱对照品溶液3 ml,槐果碱对照品溶液1 ml,苦参碱对照品溶液2 ml,氧化苦参碱对照品溶液5 ml,置100 ml量瓶中,用乙腈-无水乙醇(80:20, V/V)溶解并定容至刻度,制备成混合对照品溶液,4℃贮藏,备用。

精密移取混合对照品溶液10 ml,置20 ml量瓶中,用乙腈-无水乙醇(80:20, V/V)定容至刻度,混匀,即为混合对照品系列溶液①。再分别精密移取混合对照品系列液①10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 ml,置10 ml量瓶中,用乙腈-无水乙醇(80:20, V/V)定容至刻度,分别混匀,得混合对照品系列溶液②~⑧,4℃贮藏,备用。

2.2.2 质控样品的制备 分别取不同质量浓度的混合对照品系列溶液10 μl,置50 μl空白血浆中,得高、中、低质量浓度的质控样品,即槐定碱(1 409.40、352.35、88.09 ng/ml)、槐果碱(503.50、125.88、31.47 ng/ml)、苦参碱(872.00、218.00、54.50 ng/ml)、氧化苦参碱(2 487.50、621.88、155.45 ng/ml)。-20℃贮藏,备用。

2.3 血浆样品的处理

取人血浆100 μl,置10 ml试管中,依次加入混合对照品溶液100 μl,氯仿3 ml,涡旋3 min,以离心半径为13.5 cm、6 000 r/min离心5 min,取有机相于另一试管中,40℃下氮气吹干,残渣以乙腈-无水乙醇(80:20, V/V)溶解,以离心半径为13.5 cm、12 000 r/min离心5 min,取上清液20 μl进样测定。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 取“2.2.2”项下中质量浓度的质控样品溶液适量,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果表明,血浆中所含的内源性物质不干扰被测物和内标的测定,且二者峰形良好。色谱见图2。

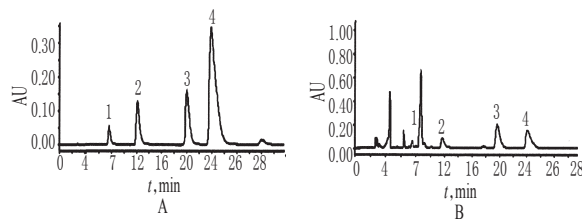


图2 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.质控样品;1.槐果碱;2.苦参碱;3.氧化苦参碱;4.槐定碱

Fig 2 HPLC chromatograms

A.control solution; B. quality control sample; 1. sophocarpine; 2. matrine; 3. oxymatrine; 4. sophoridine

2.4.2 标准曲线的制备 按“2.2.1”项下方法制备混合对照品系列溶液②~⑧,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以各对应指标成分的质量浓度(x)为横坐标,待测物峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归。得槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱回归方程分别为 $y=375\ 412x-45\ 844$ ($r=0.9996$)、 $y=623\ 857x-6\ 425$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=403\ 528x-13\ 792$ ($r=0.999\ 5$)、 $y=400\ 769x-36\ 308$ ($r=0.999\ 3$)。结果表明,槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱进样量分别在0.034 72~0.258 60、0.012 84~0.113 65、0.023 77~0.240 93、0.452 48~4.520 63 μg范围内与待测物峰面积积分值呈良好线性关系。

2.4.3 精密度试验 按“2.2.2”项下方法制备高、中、低质量浓度的质控样品各6份,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件测定日内精密度(6次)、日间精密度(5 d)。结果,高、中、

低质量浓度的质控样品日内、日间精密度的RSD均小于2.0%,表明本试验方法符合目前生物样品分析方法指导原则中的有关规定。

2.4.4 稳定性试验 取“2.4.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,置于室温保存(25℃)24h后测定,考察血浆样品的短期稳定性;取“2.4.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,冷冻贮藏于-20℃,30d后测定,考察血浆样品的长期稳定性;取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,冷冻贮藏于-20℃,在室温中充分解冻,然后再次冷冻,每次间隔24h,重复3个冻融周期后测定,考察血浆样品的3周期冻融稳定性。结果,被测物在上述贮藏条件下测得实际值均在理论值的90.36%~104.16%范围波动,RSD<3.2%,表明4种成分在血浆样品中稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取“2.4.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份,按“2.1”项下色谱条件测定。结果,槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱峰面积的RSD分别为2.8%、2.6%、1.7%、2.3%,表明本方法重复性较好。

2.4.6 提取回收率试验 取“2.4.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品适量,按“2.1”项下色谱条件测定,得4种样品的峰面积。取空白血浆适量,按“2.3”项下方法离心得上清后加入槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱对照品,以“2.1”项下色谱条件进行测定,得4种峰面积,以前后峰面积比值为槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱的提取回收率。提取回收率试验结果见表1。

表1 提取回收率试验结果

Tab 1 Result of extraction recovery experiments

生物碱	质量浓度, ng/ml	提取回收率, %
槐定碱	88.09	2.06
	352.35	2.35
	1409.40	1.14
槐果碱	31.47	2.32
	125.88	2.27
	503.50	1.45
苦参碱	54.50	2.51
	218.00	2.38
	872.00	1.29
氧化苦参碱	155.45	2.47
	621.88	2.24
	2487.50	1.62

3 讨论

槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱都是喹啉里西啶生物碱,笔者采用Agilent ZORBAX NH₂(150 mm×4.6 mm, 5 μm),测定4种生物碱,发现色谱条件中流动相的pH及磷酸溶液的酸度、用量对4种喹啉里西啶生物碱的分离影响较大。因此,

笔者试用了各种配比的乙腈-无水乙醇-磷酸溶液,确定了用乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液(81:10:9, V/V/V)可实现4种生物碱基线分离。虽然利用无机盐缓冲溶液也可以达到基线分离的目的,但是考虑到无机盐缓冲溶液可能影响色谱柱的寿命,最终仍采用乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液来进行分离。

2010年版《中华人民共和国药典》(一部)苦参检测项下采用波长220 nm测定苦参碱。本研究中发现,210 nm波长处4种生物碱的吸收峰均比220 nm处更大,更易测定,且不受末端吸收的影响,故采用210 nm为测定波长。

综上所述,本研究采用HPLC法测定人血浆中槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱,方法灵敏度高、精密度好,可用于苦参4种生物碱的药学研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:188.
- [2] 熊建团, 李南, 姜怡邓. 苦参碱调节血脂及抗氧化作用的实验研究[J]. 宁夏医学院学报, 2007, 29(4):352.
- [3] 袁良杰, 卢霞, 王君, 等. 苦参碱对高脂肥胖大鼠体重、血脂和过氧化能力的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9):2062.
- [4] Song G, Luo Q, Qin J, *et al.* Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 48(1):1.
- [5] 韦卉, 李金万. 肝纤维化指标联合检测与临床意义[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(19):1182.
- [6] Zheng P, Niu FL, Liu WZ, *et al.* Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine index transulfate sodium-induced colitis of rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(31):4912.
- [7] 王维伟, 王江蓉, 沈艳, 等. 苦参类生物碱对HBV转基因小鼠抗病毒作用的比较研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2007, 1(1):24.
- [8] 李建国, 伍斌, 谢红付, 等. 氧化苦参碱对CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(Tr)和淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(8):993.
- [9] 刘为萍, 阮征, 白梅. HPLC法测定复方神安颗粒中苦参碱含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14):1818.
- [10] 田娟, 王智民, 王维皓. HPLC测定苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2):23.

(收稿日期:2014-03-21 修回日期:2014-05-27)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊, 欢迎投稿、订阅