

艾愈片中苦参碱含量的 HPLC 测定方法与制备过程中的转化研究

★ 徐惠玲 (江西省人民医院药剂科 南昌 330006)
★ 夏才付 (江西省食品药品检验所 南昌 330000)
★ 刘向荣 (江西省人民医院药剂科 南昌 330006)

摘要:目的:建立艾愈片中的苦参碱含量的 HPLC 测定方法,考察艾愈片在制备过程中苦参碱含量变化情况。方法:采用 SHIMADU-ODS C_{18} 色谱柱($5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$);以乙腈-0.2% 磷酸溶液(以三乙胺调至 pH 8.0)(30:70)为流动相;流速为 $1.0\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为 220 nm;同时考察制备过程中的苦参碱的含量变化。结果:苦参碱在 $0.164\ 96 \sim 8.248\ \mu\text{g}$ 之间呈良好线性($r=1.000\ 0$),在艾愈片中的平均回收率为 99.67%, RSD 为 0.7% ($n=5$)。在水煎煮提取过程中存在氧化苦参碱向苦参碱转化。但在浓缩、干燥及成型过程中不存在苦参碱与氧化苦参碱之间的相互转化。结论:HPLC 法可准确、简便、快速测定艾愈片中苦参碱含量,艾愈片制备过程存在氧化苦参碱向苦参碱转化。

关键词:艾愈片;苦参碱;氧化苦参碱;高效液相色谱法

中图分类号:TQ 460.7⁺2 **文献标识码:**A

艾愈片由山慈姑、白英、淫羊藿、苦参、当归、白术、人参等药物组成,功能为解毒散结、补气养血。用于中晚期癌症的辅助治疗以及癌症放疗引起的白细胞减少症属气血两虚者。苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait 的干燥根,具有清热燥湿、祛风杀虫、利尿等功效,含有多种生物碱与黄酮类成分,在生物碱中主要有苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱,这些生物碱都属于双稠哌啶类生物碱,苦参碱(matrine)为其有效成分之一^[1]。其中氧化苦参碱中氮原子以配位键与氧原子结合。苦参碱与氧化苦参碱在植物体内及中药复方中存在着氧化-还原的动态变化。1996 年陆蕴如等将苦参分别与丹参、茵陈、车前草、茯苓、黄柏相组合,研究了苦参碱与氧化苦参碱的转化。2000 年宋小妹等研究了苦参中化学成分在洁身剂中的转化。本研究采用高效液相色谱法测定艾愈片中苦参碱含量,同时考察制备过程苦参碱的含量变化。

1 仪器与试剂

Waters 系列高效液相色谱仪,包括 Waters 600 四元泵,在线脱气机, Waters 2996 二极管阵列检测器, Waters 717 自动进样器, Waters Empower 色谱工作站; Sartorius BP211D 电子天平(十万分之一)。水为超纯水;甲醇、乙腈为色谱纯;其它试剂均为分析纯。苦参碱对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号:0805-20005,含量测定用)。

2 实验方法和结果

2.1 高效液相法测定苦参碱的含量

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;乙腈-0.2% 磷酸溶液(以三乙胺调至 pH 8.0)(30:70)为流动相;检测波长为 220 nm。理论板数按苦参碱峰计算应不低于 3 000。

2.1.2 检测波长的确定 取对照品溶液、供试品溶液各 20 μL ,注入液相仪,选取二极管阵列检测器在 200~400 nm 范围内扫描,测得在 213.2 nm 处均有一较大吸收峰,考虑到末端吸收基线不容易稳定,参照文献选择 220 nm 作为测定波长。

2.1.3 线性关系 精密称取五氧化二磷干燥至恒重的苦参碱对照品 10.31 mg,置 25 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 1、1、2、4、8 mL 分别置 50、10、10、10、10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。精密吸取上述对照品溶液及母液 20 μL ,注入液相色谱仪,按正文色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,对照品进样量为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为: $y = 1\ 087\ 847.6.941\ 7x + 39\ 284.840\ 9$, $r = 1.000\ 0$,表明苦参碱在 $0.164\ 96 \sim 8.248\ \mu\text{g}$ 之间呈良好线性。

2.1.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液,按正文中液相色谱条件,重复进样 5 次,结果苦参碱峰面积相对标准偏差为 0.4%。

2.1.5 供试品溶液的制备与测定 取本品,除去包衣,精密称定,研细,取 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加流动相 25 mL,密塞,称定重量,超声处理 30 分钟,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;精密吸取对

照品溶液与供试品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

2.1.6 空白试验和供试品液相色谱分离情况 取去苦参的阴性对照样品, 按正文中供试品溶液制备方法制得空白溶液, 按正文条件测定, 比较供试品溶液色谱及苦参碱对照品色谱, 结果阴性样品中其他成分对苦参峰无干扰, 且苦参碱峰有较好的色谱分离。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 (20041001), 按正文中液相色谱条件, 每隔一定时间进样一次, 结果供试品溶液中苦参碱在 24 小时内峰面积无明显变化, RSD 为 0.9%。

2.1.8 重现性试验 取本品 (20041001), 将样品重复测定 5 次, 结果苦参碱平均含量为 5.450 6 mg/g, RSD = 0.5%。

2.1.9 回收率试验 采用加样回收试验, 取已知含量的本品 (20041001, 苦参碱含量为 5.4506 mg/g) 适量, 研细, 取 0.25 g, 精密称定, 置具塞三角烧瓶中, 分别精密添加苦参碱对照品流动相溶液 (浓度 0.049 488 mg/mL) 25 mL, 按供试品的测定方法测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.69%, RSD 为 0.7%。

2.2 苦参碱的转化研究

2.2.1 苦参药材中苦参碱的含量测定 取本品粗粉 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加氯仿 50 mL、浓氨试液 1 mL, 密塞, 称定重量, 时时振摇, 放置 24 小时后, 再称定重量, 用氯仿补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 蒸干, 残渣加无水乙醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中。

2.2.2 煎煮提取过程中苦参碱的含量测定 按处方比例分别称取山慈姑、白英、苦参、淫羊藿、当归、白术共 380 g, 分别加 10 倍水煎煮, 第一、二次 2 小时, 第三次 1 小时, 煎煮液滤过, 量出体积, 测定每次提取液中苦参碱含量。

2.2.3 干浸膏与成品中苦参碱的含量测定 同 2.1.5。

2.2.4 结果 将上述苦参碱含量按每克苦参药材

计算, 比较苦参碱在整个制备工艺过程的变化, 结果药材中苦参碱含量为 0.9 mg/g, 提取液第 1、2、3 次的苦参碱含量依次为 28.6、17.2、11.5 mg/g, 提取液中总含量为 57.3 mg/g, 干浸膏中含量为 57.6 mg/g, 成品中含量为 57.8 mg/g。

从上述结果可以看出: 从提取液、干浸膏以及艾愈片成品中的苦参碱含量大大高于药材中苦参碱的含量, 可以推测在水煎煮过程中存在氧化苦参碱向苦参碱的转化, 但在提取液的干燥和片剂的成型过程中几乎没有氧化苦参碱向苦参碱或苦参碱向氧化苦参碱的转化。

3 讨论

流动相 pH 值对苦参碱色谱行为影响很大, 仅加入磷酸或三乙胺, 苦参碱保留时间靠前或延后且拖尾较严重, 且不能与其他杂质峰有效分离, 而且过高或过低 pH 会降低对色谱柱的使用寿命。采用本研究色谱系统, 能获得满意结果, 重现性好。

文献报道^[2], 苦参药材中氧化苦参碱含量明显高于苦参碱; 苦参药材水煮后, 氧化苦参碱含量略高于苦参碱, 随水煮时间的延长氧化苦参碱逐渐向苦参碱转化并最终趋于动态平衡; 含苦参药材的处方水煮后, 苦参碱含量远高于氧化苦参碱, 随着时间的延长比例在显著地增大。本片剂提取液中的苦参碱含量与干浸膏、成品的苦参碱含量几乎相同, 表明在水煎煮过程中存在氧化苦参碱向苦参碱的转化, 但在提取液的干燥和片剂的成型过程中几乎没有氧化苦参碱向苦参碱或苦参碱向氧化苦参碱的转化。

苦参药材的不同应用方法对苦参碱和氧化苦参碱的相对转化率有很大影响, 都存在苦参中的氧化苦参碱向苦参碱转化现象, 这就要求我在新药研究的工艺部分, 尤其是考虑成分的转化率时应当考虑这种转化, 否则会出现转化率大于 100% 的情况。

参考文献

- [1] 肖培根. 新编中药志 (第一卷) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 555~561
- [2] 贾敏鸽, 孙文基. 苦参及其复方中苦参碱与氧化苦参碱的转化研究 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(2): 90~93

(收稿日期: 2006-03-14)

专题征稿

《江西中医药》为中医药核心期刊, 新设重点栏目《专题谈荟》, 以专病列专题, 论述该病的病因病机、诊疗方案及临床经验, 要求观点、方法新, 经验独到。专题有: 小儿麻痹后遗症、红斑狼疮、类风湿性关节炎、慢性肾炎、哮喘、糖尿病、老年痴呆、高血压、中风、盆腔炎、萎缩性胃炎、癌症疼痛。欢迎广大中西医结合临床工作者不吝赐稿。