

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00108

• 短篇论著 •

优化的高效毛细管电泳法测定肝力保胶囊中苦参碱和氧化苦参碱的含量

Determination of matrine and oxymatrine contents in Ganlibao capsule by optimized high performance capillary zone electrophoresis

张国庆¹, 吕 磊¹, 赵 亮¹, 王 彬¹, 龚纯贵¹, 徐丽丽¹, 柴逸峰^{2*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

2. 第二军医大学药学院, 上海 200433

[摘要] **目的:**建立优化的高效毛细管电泳法,并将其应用于测定肝力保胶囊中苦参碱和氧化苦参碱的含量。**方法:**采用 Agilent^{3D}CE 高效毛细管电泳仪、未涂渍熔融石英毛细管(68.5 cm×75 μm,有效长度 60 cm),缓冲液 50 mmol/L Na₂HPO₄ (水:甲醇=4:1,pH=5.5),运行电压 25 kV,温度 25℃,检测波长 214 nm,以氨茶碱为内标,建立优化的高效毛细管电泳法,并测定 3 批次肝力保胶囊中苦参碱和氧化苦参碱的含量。**结果:**苦参碱和氧化苦参碱均能够基线分离,符合含量测定要求;回归方程分别为 $Y=222.80X+3.6353$ ($r=0.9999$) 和 $Y=213.02X+34.2686$ ($r=0.9999$);线性范围分别为 33.98~339.8 μg/ml 和 47.35~473.5 μg/ml。苦参碱和氧化苦参碱的日内和日间精密度(RSD)均<3.0%,最低检测限分别为 13.60 μg/ml 和 18.90 μg/ml,加样回收率结果分别为 102.3%(RSD=0.57%, $n=3$)和 101.1%(RSD=0.41%, $n=3$)。3 批样品中苦参碱的含量(%)分别为 2.78 ± 0.043 、 2.50 ± 0.069 、 2.56 ± 0.040 ;没有检测到氧化苦参碱的峰。**结论:**优化的高效毛细管电泳法稳定简便,结果可靠,能够用于测定苦参碱和氧化苦参碱含量;优化的高效毛细管电泳法测定的苦参碱含量可作为肝力保胶囊质量控制指标。

[关键词] 毛细管电泳;苦参碱;氧化苦参碱;肝力保胶囊**[中图分类号]** R 917 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0108-03

苦参为豆科植物 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根,具有清热燥湿、杀虫、利尿的功效。《本草纲目》记载:苦参,苦、寒、无毒,主治心腹结气、症瘕积聚、黄疸、溺有余沥、逐水,补中明目,养肝胆气,并具有清热、解毒祛风燥湿、杀虫、治皮肤烦燥生疮、治肠风、泻血并热痢等功效^[1]。苦参的主要有效成分为苦参碱和氧化苦参碱,具有镇静、镇痛、解热、降温、抗炎、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用^[2]。

肝力保胶囊主要成分为苦参提取物、茵陈、虎杖、茯苓、黄芪等,可以清热处理,利水渗湿,疏肝健脾,补肝益肾,主要用于各种急慢性病毒性肝炎、肝癌所致肝脾肿大、肝硬化腹水、肝昏迷等症和经放、化疗所致白细胞减少症的辅助治疗。

苦参碱和氧化苦参碱的测定方法有多种,包括:高效毛细管电泳法^[2]、高效液相色谱法^[3]、气相色谱法^[4]、薄层扫描法^[5]及酸性染料比色法^[6]等。前期实验中曾尝试采用高效液相色谱法来控制肝力保胶囊的质量,但不能很好地分离苦参碱和氧化苦参碱,且色谱图中干扰峰较多,样品峰和对照品峰的保留时间不能完全吻合。为更准确地测定肝力保胶囊中苦参碱和氧化苦参碱含量,本研究对以往高效毛细管电泳法进行改进,并对改进后的方法进行评价。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent^{3D}CE 高效毛细管电泳仪,Agilent Chem-Station 工作站(美国 Agilent 公司)、二极管阵列检测器、Model 828 型 pH 计(美国 Orion)。未涂渍熔融石英毛细管(河北永年光学纤维厂),68.5 cm×75 μm(有效长度 60 cm)。

1.2 试剂 肝力保胶囊由第二军医大学东方肝胆外科医院制剂室生产(批号:060101,060401,051001),苦参碱和氧化苦参碱对照品购自中国药品生物制品检验所,磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)、磷酸、甲醇等均为国产分析纯,水为纯化水。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取苦参碱对照品 33.98 mg,氧化苦参碱对照品 47.35 mg,分别加甲醇定容至 50 ml,即得 0.6796 mg/ml 苦参碱和 0.9470 mg/ml 氧化苦参碱对照品溶液。分别精密吸取苦参碱和氧化苦参碱对照品溶液 5、2.5、1、0.83、0.50 ml,加入 25 mg/ml 氨茶碱溶液 20 μl 作内标,用水定容至 10 ml,得不同浓度标准系列溶液。

2.2 样品溶液的制备 取肝力保胶囊 10 粒,取出其中的粉

[收稿日期] 2007-07-11 **[接受日期]** 2007-10-29**[作者简介]** 张国庆,副主任药师。E-mail:guoqing_zhang91@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070373, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

末状药品(约 3 g),混匀后精密称定药粉约 0.3 g,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液 0.5 ml,精密加入 CHCl₃ 20 ml,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定其质量,用 CHCl₃ 补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 ml,即得。

2.3 电泳条件的选择

2.3.1 检测波长的选择 参考文献^[2]得知苦参碱和氧化苦参碱的最大吸收波长为 214 nm,并通过对照品的全波长扫描证实,确定检测波长为 214 nm。

2.3.2 缓冲液种类和浓度的选择 选用不同浓度的硼砂缓冲液(20~60 mmol/L,pH=6.0)进行电泳。结果发现,使用低浓度硼砂缓冲液时对照品出峰时间较早,可以将苦参碱和氧化苦参碱两者完全分开,但峰形较差,且氧化苦参碱出现双峰甚至是多峰。改用不同浓度 Na₂HPO₄ 缓冲液(20~60 mmol/L)发现,随着缓冲液浓度的升高,分离度及峰形得到明显改善,且在 50 mmol/L 时出峰时间较早、分离效率高、峰形最佳。确定 50 mmol/L Na₂HPO₄ 作为运行缓冲液。

2.3.3 pH 值对分离度的影响 在 pH 4.5~9.0 的范围内,用 H₃PO₄ 调整缓冲液的 pH 值,分别进行电泳。以分离度为纵坐标,pH 值为横坐标,将电泳所得数据绘制成图。结果(图 1)发现,pH 值对苦参碱和氧化苦参碱的分离度和峰形的影响较大。升高 pH 值,氧化苦参碱的峰形不佳,出现双峰;降低 pH 值,峰形以及分离效果得到明显改善,考虑出峰时间的因素,选择 pH=5.5 作为电泳时运行缓冲液的 pH 值。

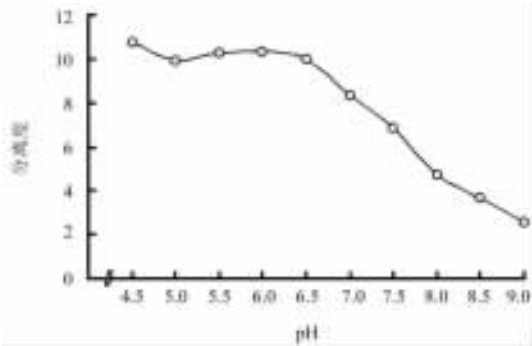


图 1 分离度与 pH 值的关系

2.3.4 温度对分离度的影响 在 20~30℃ 的范围内,考察温度对分离度的影响。结果发现,温度的改变对苦参碱和氧化苦参碱的分离度和峰形基本没有影响。因此,选择常温 25℃ 作为电泳的运行温度。

2.3.5 电压对分离度的影响 在 20~30 kV 的范围内每隔 2 kV 对电压进行调整,考察电压对分离度的影响。结果发现,电压的变化对苦参碱和氧化苦参碱的分离度以及峰形的影响均较小。为避免产生过多的焦耳热,同时保证出峰时间短,所以选择 25 kV 为电泳时的运行电压。

2.3.6 有机改性剂对分离度的影响 在缓冲液中加入甲醇 10%、15%、20%、25%、30%,考察其对分离度的影响。结果

发现,缓冲液中甲醇的含量对苦参碱和氧化苦参碱的分离度和峰形影响不大,但可以使苦参碱和氧化苦参碱的出峰时间提前并有效的提高柱效。所以,选取甲醇的含量为 20%。

最终确定的电泳条件为:50 mmol/L Na₂HPO₄ (水:甲醇=4:1),H₃PO₄ 调 pH=5.5;运行电压 25 kV;温度 25℃;检测波长 214 nm;内标为氨茶碱;压力进样:50 mbar×3 s(补进缓冲液 3 s)。运行前用 0.1 mol/L NaOH 和缓冲液各冲洗 5 min,运行时间为 12 min。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系的考察 分别将不同浓度的对照品混和溶液依次连续进样,重复 3 次,以对照品溶液的浓度(X, μg/ml)对对照品与内标的峰面积比(Y)进行线性回归。苦参碱的回归方程为 Y=222.80X+3.635 3(r=0.999 9),在 33.98~339.8 μg/ml 之间的线性关系良好;氧化苦参碱的回归方程为 Y=213.02X+34.268 6(r=0.999 9),在 47.35~473.5 μg/ml 之间的线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 采用对照品与内标的迁移时间之比和峰面积之比考察苦参碱和氧化苦参碱的精密度(RSD),通过日内和日间 5 次重复进样,分别计算苦参碱和氧化苦参碱的相对迁移时间和相对峰面积的 RSD(表 1)。苦参碱和氧化苦参碱的相对迁移时间和相对峰面积的 RSD 都在 3% 以内,表明此方法测定苦参碱和氧化苦参碱的精密度良好。

表 1 苦参碱和氧化苦参碱的
日内和日间精密度结果

	(%)			
	日内精密度		日间精密度	
	相对迁移时间	相对峰面积	相对迁移时间	相对峰面积
苦参碱	0.84	0.92	2.31	2.75
氧化苦参碱	0.96	0.70	2.80	2.69

2.4.3 检测限考察 将苦参碱和氧化苦参碱的对照品按一定倍数无限稀释进行电泳分析,以信噪比 3:1 确定最低检测限。当对照品稀释到 25 倍左右时,苦参碱和氧化苦参碱的最低检测限分别是 13.60 μg/ml 和 18.90 μg/ml。

2.4.4 加样回收率试验 将苦参碱和氧化苦参碱含量已知的样品溶液用甲醇稀释为原浓度一半,加入内标溶液 20 μl 及对照品溶液适量,用甲醇定容。按照相同电泳条件操作,分别重复实验 3 次。苦参碱和氧化苦参碱的加样回收率结果分别为 102.3%(RSD=0.57%)和 101.1%(RSD=0.41%)。

2.5 样品测定 取 3 批肝力保胶囊样品,按电泳条件检测样品中苦参碱和氧化苦参碱的含量,每个样品重复 3 次,结果 3 批样品中苦参碱的含量(%)分别为 2.78±0.043、2.50±0.069、2.56±0.040。空白、对照品和样品的电泳图见图 2,从图中可以看出,样品中只出现苦参碱的峰,没有检测到氧化苦参碱的峰。

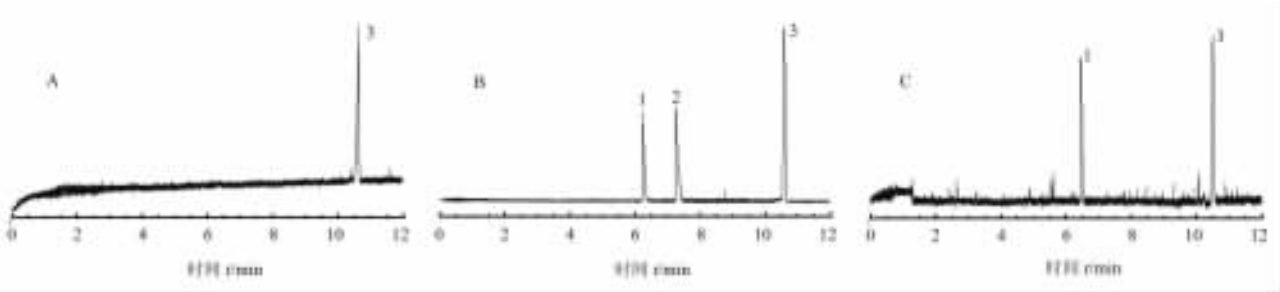


图 2 空白(A)、对照品(B)和样品(C)的电泳图
1:苦参碱;2:氧化苦参碱;3:氨茶碱(内标)

3 讨 论

本研究采用了安捷伦公司全自动 3D 高效毛细管电泳仪,测定肝力保胶囊中苦参碱和氧化苦参碱的含量,在操作条件的选择过程中,开始考察了硼砂和磷酸盐缓冲液作为电解质,结果发现在硼砂缓冲液的条件下,苦参碱和氧化苦参碱的峰形均不佳。在确定使用磷酸盐缓冲液后,对其浓度、pH 值、运行电压、温度以及有机改性剂的含量等参数进行了考察,从而确定最终的电泳条件,待测组分可在 5~8 min 内出峰,峰形最佳,两峰之间分离完全,未见其他杂峰。

在方法学的考察过程中,选取氨茶碱作为内标,其性质稳定,不干扰待测组分出峰,重复性好。在含量测定中发现,氧化苦参碱没有出峰,相关文献查阅表明苦参药材入药后苦参碱与氧化苦参碱存在着相互转化^[7],含苦参的复方以苦参碱为主要成分^[8],氧化苦参碱的含量较少,所以未能测到。测定结果与本课题组用 HPLC 法得到的结果(苦参总碱含量 2.80%)相近。综合以上考察可认为,以苦参碱的含量作为指标可用于肝力保胶囊的质量控制。

与以往的毛细管电泳法相比,筛选优化后的毛细管电泳法采用定量更准确的 75 μm 毛细管柱,提高缓冲液的浓度并改用偏酸性的环境有效地提高了分离度,加入甲醇作为有机改性剂显著提高了柱效。实验结果表明,本研究采用的毛细

管电泳法作药物分析具有独特的优势,其分离效率高、选择性强、测定结果可靠,而且方法较常规的 HPLC 法、GC 法简便、快速、低耗,具有较高的实用价值和发展前景。

[参 考 文 献]

[1] 王俊学,王国俊. 苦参碱及氧化苦参碱的药理作用及临床应用[J]. 肝脏,2000,5:116-117.

[2] 罗 明,贺 平,吴孟超,李琳芳,郭亚军. 高效毛细管电泳法测定苦参碱和氧化苦参碱[J]. 中草药,1999,30:261-263.

[3] 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,2006,12:23-24.

[4] 侯伟雄,陈静君,李思华. 气相色谱法测定妇炎平泡腾片中苦参碱的含量[J]. 广东药学院学报,2005,21:254-255.

[5] 布日额,其其格玛,东格尔道尔吉. 薄层扫描法测定苦豆子中的苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国民族民间医药杂志,2005,(74):166-168.

[6] 作文英,刘 硕,张抗怀,田富元,陈亚丽,车晓侠,等. 酸性染料比色法测定苦参碱脂质体中苦参碱的含量[J]. 中国药房杂志,2005,16:1734-1735.

[7] 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,2003,23:90-93.

[8] 陆蕴如,杨钟柯,董育妹. 苦参在复方中化学成分变化的研究[J]. 中国中药杂志,1996,21:412-414,447.

[本文编辑] 尹 茶

• 书 讯 •

《新编皮肤软组织扩张术》已出版

本书由鲁开化等主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0409-3,16 开,定价 120.00 元。

本书全面系统地介绍了皮肤软组织扩张术应用的国内外动态、软组织扩张器的结构和类型、软组织扩张术的理论基础研究及其在全身各部位的应用,突出叙述了手术适应证、手术方法、注意事项、并发症及其防治和护理,是 1991 年版《皮肤软组织扩张术》的全面修订版,并将皮肤软组织扩张术开展以来的国内外相关文献详尽地收录于书内,便于读者检索和查询。本书科学性强,适用范围广,可供从事整形外科、烧伤、骨科、口腔科、修复重建及美容外科等专业临床医师及研究人员使用。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大新华书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

http://www.smmup.com