

苦參鹼農藥有效成分 *matrine* 檢驗方法之建立

劉必謙¹ 徐慈鴻¹ 黃鎮華^{1*}

摘要

劉必謙、徐慈鴻、黃鎮華。2017。苦參鹼農藥有效成分 *matrine* 檢驗方法之建立。臺灣農藥科學 2：1-10。

苦參 (*Sophora flavescens* Ait.) 為豆科槐屬植物，其根用於中藥材，苦參中的苦參鹼 (*matrine*) 具有殺蟲效果，故被使用於防治農作物蟲害。苦參鹼之取得係透過苦參根萃取。我國於 2015 年已有苦參鹼之農藥防治蔬菜鱗翅目蝶蛾類及蔬菜、草莓竹蚜蟲之危害。為確保產品中苦參鹼含量確如標稱所示，亟需檢驗方法分析產品確保使用者權益。本研究開發高效液相層析法，使用 Phenomenex HyperClone BDS C18 管柱，以甲醇：水：三乙胺 (45:55:0.02, v/v/v) 為動相，分析流速 0.8 mL/min，注入量 10 μ L，偵測波長 220 nm。建立之檢驗方法可分析市售苦參鹼產品中苦參鹼含量，方法確效結果，苦參鹼 50 μ g/mL 至 250 μ g/mL 呈現良好線性 (R^2 值為 0.9991)，回收率為 99.4% (RSD = 3.24%)，符合 CIPAC 成品農藥分析方法確效指南之標準，稱取樣品六重複分析苦參鹼含量，平均為 3.77%，RSD = 1.85%。本檢驗方法可應用在分析苦參鹼溶液劑型成品農藥之儲架壽命。

關鍵詞：苦參鹼、天然保護資材、高效液相層析法

接受日期：2017 年 5 月 3 日

* 通訊作者。Email: chhuang@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

緒言

苦參 (*Sophora flavescens* Ait.) 又名地槐、野槐，為豆科槐屬植物，苦參根用於中藥材，其藥用價值早於神農本草經中有記載，依據我國國家網路藥典，苦參根具有利尿、解熱、殺蟲、抗真菌、治濕疹、瘡癬、腸炎、疥癬等功效⁽¹⁾。苦參中的生物鹼主要為苦參鹼 (matrine)、氧化苦參鹼 (oxymatrine)，其次為羥基苦參鹼 (sophor-anol)⁽⁷⁾，苦參鹼及氧化苦參鹼具有殺蟲作用，與化學農藥搭配使用可減少化學農藥在防除農作物之蟲害上的藥劑使用量。苦參鹼相關成品農藥劑型大多為溶液 (soluble concentrate, SL)、乳劑 (emulsifiable concentrate, EC)，中國大陸於 1993 年以來已廣泛登記使用於瓜果、蔬菜、小麥、茶樹等作物用於防治蟲害⁽²⁾，臺灣於 2015 年市面已有苦參鹼之相關產品用於蔬菜鱗翅目蝶蛾類及蔬菜、草莓及竹蚜蟲之蟲害防治。

苦參鹼之取得係透過苦參根萃取，屬天然植物保護資材⁽³⁾，故可使用於我國有機農業生產，為確保市售農藥產品中苦參鹼含量符合我國訂定之農藥有效成分含量標準規範，亟需檢驗方法分析產品以確保使用者權益。分析苦參中苦參鹼含量的分析方法主要有滴定法與高效液相層析法，滴定法檢測苦參總鹼之含量⁽⁵⁾，無法針對苦參鹼或氧化苦參鹼各別定量，若需準確計算產品中苦參鹼之含量，則需透過高效液相層析法。C18、NH₂、Phenyl 管柱曾用於分離苦參萃取液中苦參鹼及氧化苦參鹼^(6, 8, 11)，本研究目標為建立一檢驗方法，透過高效

液相層析有效將樣品中苦參鹼與樣品基質分離，並提升配製樣品效率。

材料與方法

一、材料

(一) 標準品、試藥、耗材與溶劑

1. 苦參鹼標準品 (純度 99.22%，北京恆元啟天化工技術研究院)，氧化苦參鹼標準品 (純度 98%，SIGMA-ALDRICH)。
2. 苦參鹼測試樣品為溶液劑型之成品，為綠寶生物科技股份有限公司提供，外觀為深褐色液體。
3. 甲醇 (methanol) 為 HPLC 級 (Merck, Germany)。
4. 三乙胺 (triethylamine) 為試藥級 (Merck, Germany)。
5. 去離子水，研究室內經由 Millipore 公司的 Milli Q 水淨化系統製造，經 0.22 μm millipore 過濾，比電阻 18.2 MΩ·cm。
6. 0.2 μm 親水性聚丙烯 (hydrophilic polypropylene) 過濾膜 (PALL Life Science GHP 13 mm Acrodisc)。

(二) 器皿與設備

1. 超音波震盪裝置 (頻率 40 ~ 50 kHz) (BRANSON 5510, USA)。
2. 精密天平，d = 0.1 mg (METTLER TOLEDO, XS204, Switzerland)。
3. 精密天平，d = 0.01 mg (METTLER TOLEDO, XS105, Switzerland)。

4. 定量瓶 10、50、100 mL (BLAUBRAND DURAN, A Class 等級, Germany)。
5. 刻度吸管 1、2、5 mL (BLAUBRAND DURAN, AS Class 等級, Germany)。
6. 血清瓶 1000 mL (SCHOTT DURAN, Germany)。
7. 玻璃量筒 1000 mL (PYREX, Germany)。

二、方法

(一) 儀器與分析條件

1. 高效液相層析儀 (HPLC, Agilent 1100) 系統搭配紫外光檢出器 (Variable Wavelength Detector, VWD)。
2. 分析管柱 Phenomenex HyperClone BDS C18 4.6 × 250 mm, 5 μm。
3. 分析溫度為室溫。
4. 動相為甲醇：水：三乙胺 (45:55:0.02, v/v/v)，流速：0.8 mL/min，注入量：10 μL，紫外光檢出器偵測波長 220 nm。

(二) 動相配製方法

以 1000 mL 玻璃量筒分別量取 450 mL 甲醇及 550 mL 去離子水後倒入動相瓶，以 1 mL 刻度吸管精確量取 0.2 mL 三乙胺，加入動相瓶後混合均勻後以超音波震盪除氣 5 min。

(三) 標準液與樣品配製方法

1. 苦參鹼儲存標準液與標準檢量線製備

精確稱取苦參鹼標準品 25.3 mg 於 5 mL 小燒杯中，以 40 mL 甲醇將標準品由小燒

杯洗入 50 mL 定量瓶，超音波震盪 10 min 使之溶解，回至室溫後以甲醇定容至刻度，為含 502.2 μg/mL 苦參鹼之儲存標準液。再以 5 mL 刻度吸管精確量取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 之儲存標準液置於 10 mL 定量瓶，分別以甲醇定容至刻度，經過濾後，為 50.2、100.4、150.7、200.9、251.1 μg/mL 苦參鹼操作標準液。

2. 氧化苦參鹼標準液製備

精確稱取氧化苦參鹼標準品 25.3 mg 於 5 mL 小燒杯中，以 40 mL 甲醇將標準品由小燒杯洗入 50 mL 定量瓶，超音波震盪 10 min 使之溶解，回至室溫後以甲醇定容至刻度，為含 505.2 μg/mL 氧化苦參鹼之儲存標準液。再以 5 mL 刻度吸管精確量取 3.0 mL 之儲存標準液置於 10 mL 定量瓶，分別以甲醇定容至刻度，經過濾後，為 151.6 μg/mL 氧化苦參鹼操作標準液。

3. 精密性試驗樣品配製

稱取樣品 376.3、375.3、389.1、378.5、375.4、375.9 mg 六重複置於 100 mL 定量瓶內，加入 90 mL 甲醇以超音波震盪，待定量瓶回至室溫後以甲醇定容至刻度，過濾作為檢液。

4. 回收率樣品配製

稱取樣品 376.3、375.3、389.1 mg 三重複置於 100 mL 定量瓶，加入 90 mL 甲醇超音波震盪，待回至室溫後以甲醇定容至刻

度。取 5 mL 刻度吸管精確量取 5 mL 檢液置於 10 mL 定量瓶中，再取 2 mL 刻度吸管量取儲存標準液 1.5 mL 添加於 10 mL 定量瓶中，以甲醇定容至刻度，過濾後為添加 75 µg/mL 回收率之樣品。

結果

一、檢量線分析

將苦參鹼 150.7 µg/mL 標準液注入 10 µL 以儀器分析，確認滯留時間為 23.874 min 如圖一。將標準檢量線之標準液注入 10 µL 以儀器分析，檢量線濃度為 X 軸，波峰面積為 Y 軸進行相關分析，求得公式 $Y = 12.75X - 18.722$ ($R^2 = 0.9991$) 呈現良好線性，檢量線如圖二。

二、精密性試驗

秤取六重複苦參鹼之樣品於 100 mL 定量瓶，加入 90 mL 甲醇後超音波震盪溶解，回至室溫以甲醇定容至刻度，並經濾膜過濾後以儀器分析，結果如表一。六重複樣品經本方法分析所得苦參鹼含量平均為 3.77%，RSD 值為 1.85%，小於 Horwitz 管制值 2.20% (表一)。Horwitz 管制值為國際農藥協會 (Collaborative International Pesticides Analytical Council, CIPAC) 為成品農藥分析方法確效指南⁽¹⁰⁾對於實驗室內部秤取 3 重複樣品分析結果可接受最大之 RSD 值，其公式為 $0.67 \times 2^{(1-0.5 \cdot \log(\text{平均值}))}$ ，將平均值 0.0377 代入計算後即得 2.20%。上述 RSD 值小於管制值，代表數據可採納。

三、安定性試驗

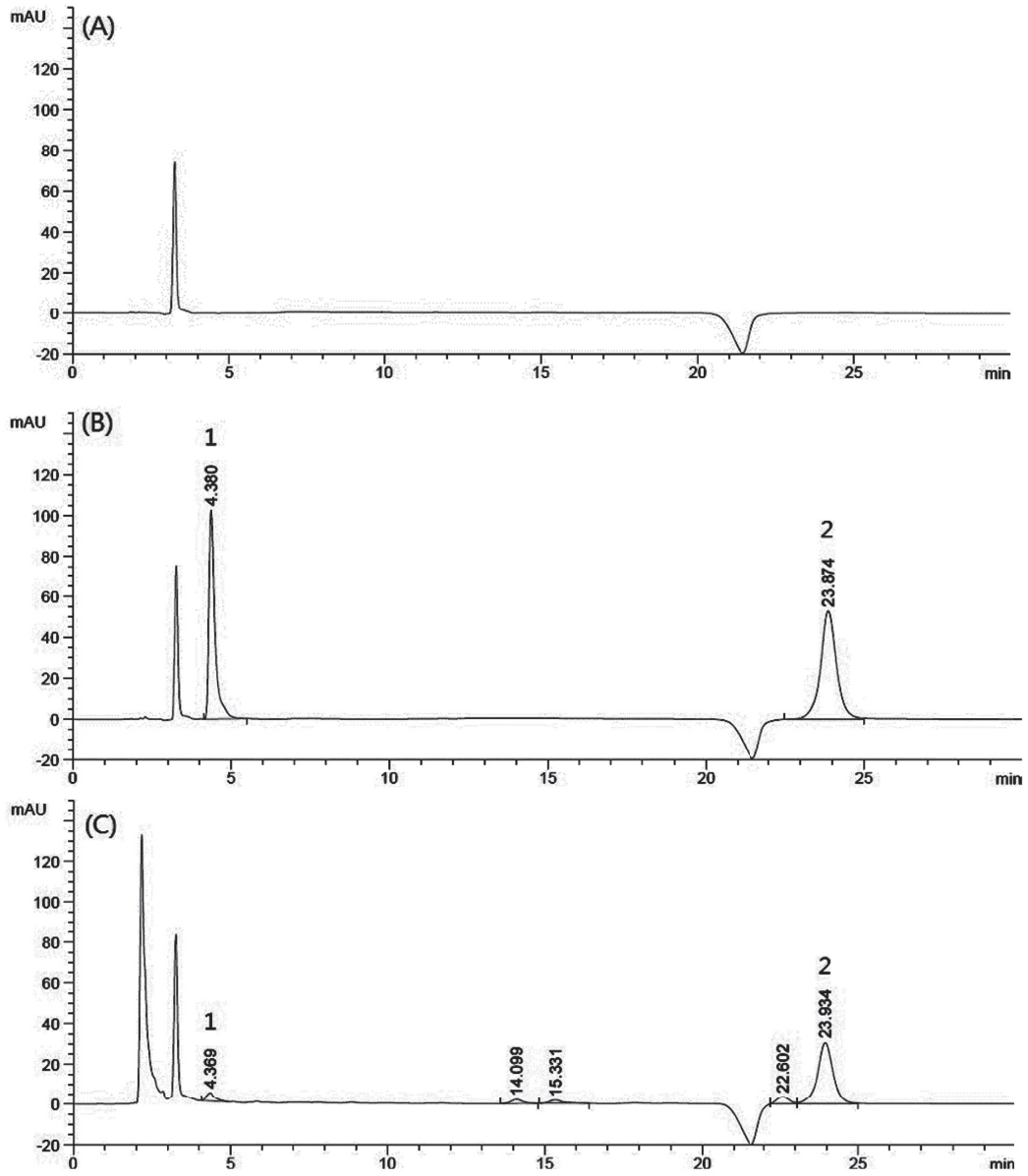
將苦參鹼之標準液檢量線第三點 (150.7 µg/mL) 與精密性第四重複樣品各分裝為 18 個樣品瓶，放置於室溫下 0、6、12、18、24 及 30 h 以儀器分析，透過面積計算其安定性。以第 0 h 苦參鹼三重複面積平均值為分母，第 6 至 24 h 苦參鹼三重複面積平均值為分子，相除後乘以 100% 即得安定性。由表二及表三可知放置第 18 h 後標準品與樣品相較第 0 h 已降解約 2%，第 24 h 相較於第 0 h 已降解近 5%，代表檢液或標準液在配製後 18 h 內穩定。

四、回收率試驗

成品農藥於計算回收率時，因分析樣品內已有待測物存在，故利用再稀釋的方式添加標準液，並透過面積利用以下公式計算：

$$\text{標準品克數 (實際添加量)} / \text{標準品克數 (理論添加量)} \times 100 = \text{回收率 (\%)}$$

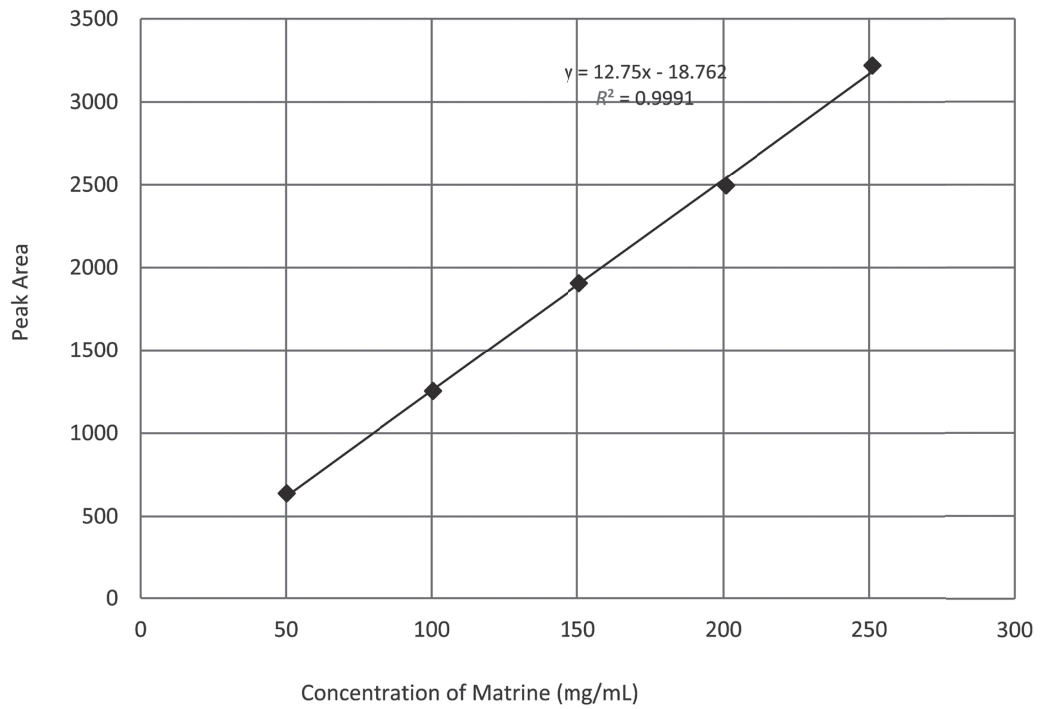
透過面積計算 10 mL 定量瓶中苦參鹼總重為 1.4803、1.4301 及 1.4847 mg。上述總重其中一部分來源為樣品得來，透過精密性平均值 3.77%，可計算秤取樣品 376.3、375.3、389.1 mg 之樣品定容於 100 mL，再取 5 mL 至 10 mL 定量瓶後，苦參鹼重量為 0.70882、0.70693 及 0.73293 mg 即為樣品內之苦參鹼重量，將苦參鹼總重與上述重量相減後，即為添加之標準品重量，為 0.77148、0.72317 及 0.75177 mg。



圖一、溶劑 (A)、標準品 (B) 及檢液 (C) 之層析圖。

Fig. 1. Chromatograms of (A) solvent, (B) standard solution and (C) sample solution.

Peak1: oxymatrine. Peak2: matrine.



圖二、苦參鹼檢量線。

Fig. 2. Calibration curve of matrine in solvent.

表一、苦參鹼樣品中苦參鹼含量及精密性試驗結果

Table 1. Matrine content in product and the RSD value

Sample weight (mg)	Volume (mL)	Content (%)	Average content (%)	RSD ¹⁾ (%)	Horwitz value (%)
376.3	100	3.75			
375.3	100	3.79			
389.1	100	3.90	3.77	1.85	2.20
378.5	100	3.73			
375.4	100	3.74			
375.9	100	3.70			

¹⁾ RSD: relative standard deviation.

表二、苦參鹼標準品室溫安定性

Table 2. Stability of matrine standard solution at room temperature

Storage time (h)	Percent (%)	RSD (% , n = 3)
0	100	1.01
6	99.1	1.00
12	97.5	0.72
18	98.2	0.24
24	95.7	0.68
30	95.5	0.38

表三、苦參鹼樣品室溫安定性

Table 3. Stability of matrine sample solution at room temperature

Storage time (h)	Percent (%)	RSD (% , n = 3)
0	100	0.34
6	100	1.15
12	99.5	0.86
18	99.8	0.08
24	95.8	0.21
30	96.9	0.29

表四、苦參鹼添加回收率

Table 4. Results of recovery assays of matrine added to samples

Weight of matrine (mg)			Theory of standard spike weight (mg)	Recovery (%)	Average Recovery (%)	RSD (%)
Sample + Standard	Sample	Standard				
1.4803	0.70882	0.77148	0.75338	102.3		
1.4301	0.70693	0.72317	0.75338	96.0	99.4	3.24
1.4847	0.73293	0.75177	0.75338	99.8		

而理論添加之標準品重量係由儲存標準液計算，儲存標準液濃度 502.2 $\mu\text{g/mL}$ 取 1.5 mL，苦參鹼重量為 0.75338 mg，將苦參鹼標準品實際重量與添加標準品理論重量相除並乘 100 即得回收率，三重複平均值為 99.4%，RSD 值為 3.24%，符合 CIPAC 成品農藥分析方法確效指南中回收率 97 ~ 103% 之要求 (表四)。

討論

本方法於動相中加入 0.02% 三乙胺主要原因有二：

1. 動相中加入少量三乙胺有助於增加生物鹼在層析分離上訊號的對稱性，但當三乙胺比例超過 0.03% 時，分離效果較差⁽⁹⁾。
2. 藉由加入三乙胺以調整動相的 pH 值以改變苦參鹼與基質在層析上的滯留時間。本研究係分析苦參鹼，樣品中氧化苦參鹼視為基質，故於動相中加入三乙胺後動相即為鹼性 (pH 約 10.2)，氧化苦參鹼滯留時間為 4.369 min，苦參鹼滯留時間

為 23.934 min，進而達到分離之目的（圖一 C）。

安定性方面，以 Hadera NH₂ 管柱 (150 × 5 mm, 4.6 μm) 搭配動相乙腈：乙醇：3% 磷酸溶液 = 80：10：10，流速 1.0 mL/min，波長 220 nm，分析放置第 0、2、4、6、8 h 之苦參萃取液，檢液於 8 h 內穩定⁽⁸⁾；以 Diamonsil C18 ODS (200 × 4.6 mm) 搭配動相 pH3.5 磷酸緩衝液 (0.2% 三乙胺水溶液 1000 mL 以磷酸調整至 pH3.5)：乙腈 = 96：4，檢測波長 207 nm 分析放置第 0、1、2、4 h 之苦參檢液，結果為 4 h 內穩定⁽⁴⁾；以 Kromasil C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 搭配動相 甲醇：水：三乙胺 = 105：95：0.04 (v/v/v)，流速 0.8 mL/min，波長 225 nm 分析放置第 1、2、4、8、16、24 h 之苦參檢液，結果為 24 h 內穩定⁽⁶⁾。本研究配製苦參鹼標準品及樣品，置於室溫（約 27~30°C）分析第 0、6、12、18、24、30 h，觀察相對變化率可知在第 0 至 18 h 間苦參鹼已降解約 2%，第 18 h 後降解約 5%。

為進一步探討苦參鹼產品中有效成分是否會隨儲架時間降解，本研究將樣品分裝約 50 g 至玻璃樣品瓶將樣品瓶外套上鋁箔袋避光，在 54°C 下熱處理 14 d 後分析樣品中苦參鹼 3.34%，RSD 值為 1.81%，另秤取樣品三重複分析未處理樣品苦參鹼含量為 3.26%，RSD 值為 1.78%，均小於 Horwitz 管制值 2.24%，熱處理後苦參鹼含量百分比為 102% 大於我國法規 95% 之規定，表示 2 yr 內產品中有效成分苦參鹼並未隨存放時間而降解。

結論

本研究使用 Phenomenex HyperClone BDS C18 管柱，甲醇：水：三乙胺 (45:55:0.02, v/v/v) 為動相，分析流速 0.8 mL/min，注入量 10 μL，偵測波長 220 nm，建立一 HPLC 檢驗方法可分析苦參鹼產品中苦參鹼之含量。檢驗方法確效，苦參鹼於 50 μg/mL 至 250 μg/mL 間呈現良好線性 (R^2 值為 0.9991)，回收率為 99.4% (RSD = 3.24%)，樣品六重複分析，苦參鹼含量平均為 3.77%，RSD = 1.85%，小於 Horwitz 管制值 2.20%，樣品及標準品之檢液在室溫下儲存 18 h 穩定。本檢驗方法可應用在分析苦參鹼溶液劑型成品農藥之儲架壽命。

謝辭

本研究承蒙本組品質規格實驗室同仁協助試驗及長官指導，謹此致謝。

引用文獻

1. KingNet 國家網路藥典。2016。苦參根。取自 http://hospital.kingnet.com.tw/medicine/search_cm.html?id=250
2. 付穎、王常波、葉非。2005。我國苦參鹼農藥研究應用概況。農藥科學與管理 26(12)：30-33。
3. 余志儒、陳炳輝。2007。天然防蟲物質。作物蟲害之非農藥防治技術。第 19-28 頁。王清玲、陳淑佩 編，行政院農業委員會農業試驗所。臺中。

4. 余家奇、劉莉、石尚友。2005。高效液相色譜法測定婦炎清栓中苦參鹼含量。遼寧中醫藥大學學報 7：620-621。
5. 吳用彥、寶霞、劉濤、李冬磊。2013。滴定法與高效液相色譜法測定苦參提取液中苦參總鹼含量比較研究。現代醫藥衛生 29：1813-1814，1816。
6. 張蕾、陳曉輝、李娟、唐作峰、畢開順。2005。RP-HPLC 法測定苦參中苦參鹼的含量。瀋陽藥科大學學報 22：33-35。
7. 馮英。2005。苦參鹼的藥用價值。青海大學學報（自然科學版） 23(6)：50-51。
8. 劉羽。2016。不同產地和不同季節苦參中苦參鹼和氧化苦參鹼的含量測定。山東化工 11：72-73。
9. Chen, X., Yi, C., Yang, X., and Wang, X. 2004. Liquid chromatography of active principles in *Sophora flavescens* root. J. Chromatogr. B. 812: 149-163.
10. Collaborative International Pesticides Analytical Council. 2003. Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. Available at <http://www.cipac.org/images/pdf/validat.pdf>
11. Lim S. J., Jeong, D. Y., Choi, G. H., Park, B. J., and Kim J. H. 2014. Quantitative analysis of matrine and oxymatrine in *Sophora flavescens* extract and its biopesticides by UPLC. J. Agric. Chem. Environ. 3: 64-73.

Determination of Matrine Content in Pesticide Product

Pi-Chain Liu¹, Tsyu-Horng Shyu¹, Chen-Hua Huang^{1*}

Abstract

Liu, P. C., Shyu T. H., and Huang C. H. 2017. Determination of matrine content in pesticide product. Taiwan Pestic. Sci. 2: 1-10.

The active ingredient in *Sophora flavescens* root is an alkaloid known as matrine, that possesses insecticidal effects and can be obtained through root extraction. Matrine confers protective abilities to plant and has previously been used to control crop pests. Taiwan has been used to control Lepidoptera moths in vegetable crops and to reduce aphid damage to strawberries. In order to ensure that the matrine in commercial product has been labeled correctly, an analytical method which can accurately characterize the matrine content in these products is required. In this study, we present a method that uses a Phenomenex HyperClone BDS C18 chromatography column and mobile phase comprising methanol:water:triethylamine at ratio of 45:55:0.02 (v/v/v). Method parameters are as follows: a flow rate of 0.8 mL / min, an injection volume of 10 μ L and a detection wavelength of at 220 nm. Method validation as follows: the calibration curve for matrine was found to be linear over a concentration range of 50 ~ 250 μ g/mL ($R^2 = 0.9991$). The recovery of the method was 99.4% (RSD = 3.24%, n = 3) and the matrine content in the tested product was 3.77% (RSD = 1.85%, n = 6). The product sample and standard solution were stable at room temperature over a period of 18 hours. Finally, our proposed analytical method is able to analyze shelf life of matrine product.

Key words: matrine, natural insecticide product, high performance liquid chromatography.

Accepted: May 3, 2017.

* Corresponding author, Email: chhuang@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung.