

反相高效液相色谱法同时分析龙葵 中3种甾体生物碱

袁海建^{1,2}, 陈宜刚¹, 蔡宝昌³, 贾晓斌^{2*}, 陈彦²

(1. 泰州职业技术学院, 江苏 泰州 2253001;

2. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 江苏 南京 210028;

3. 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 2100292)

[摘要] 目的: 利用反相高效液相色谱法快速测定龙葵中3种甾体生物碱的含量。方法: 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-1% 磷酸为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C, 205 nm 条件下检测, 以梯度洗脱方式在 30 min 内分离了澳洲茄碱、澳洲茄边碱和 khasianine 3 种生物碱。结果: 澳洲茄碱含量测定的线性范围为 0.860 ~ 10.320 μg (r = 0.999 7); 澳洲茄边碱含量测定的线性范围为 0.726 ~ 8.710 μg (r = 0.999 7); khasianine 含量测定的线性范围为 0.696 ~ 8.352 μg (r = 0.999 8)。方法的平均回收率分别为 100.18%、99.08%、99.88%。结论: 方法简便快速、准确度高, 可用于龙葵药材的质量评价。

[关键词] 反相高效液相色谱法; 龙葵; 澳洲茄碱; 澳洲茄边碱; khasianine

龙葵是茄科 Solanaceae 植物龙葵 *Solanum Nigrum* L. 的干燥地上部分, 曾载于《中国药典》(1977年版), 味苦、微甘, 性寒, 能清热解毒, 消肿散结, 消炎利尿。该药材中的甾体生物碱类成分具有较好的抗肿瘤的活性^[1], 主要包括澳洲茄碱 (solasanine), 澳洲茄边碱 (solamargine) 及 khasianine 等, 其苷元均为澳洲茄胺。目前在对龙葵药材有效成分定量分析的研究中^[2-4], 同时测定该药材中3种有效成分的文献尚未见报道。为了更好的控制龙葵药材的质量, 本研究建立了快速测定3种甾体生物碱的方法, 在实际样品的分析中取得了满意的结果。

1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括柱温箱、在线脱气机、四元泵及二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); Buchi 旋转蒸发器(瑞士, Buchi 公司); AT3204-N 电子分析天平(梅特勒-托利多(上海)有限公司)。

[稿件编号] 20101027003

[基金项目] 江苏省中医药局项目(LB09079); 教育部高等学校青年骨干教师国内访问学者项目

[通信作者] * 贾晓斌, 研究员, 博士生导师, E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

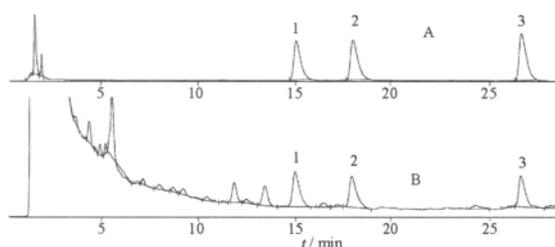
[作者简介] 袁海建, 讲师, 研究方向为中药新剂型与新技术, E-mail: yuanjian8101@163.com

澳洲茄碱对照品、澳洲茄边碱对照品、khasianine 对照品(郑州牧业工程高等专科学校化学教研室提供, 经高分辨质谱鉴定并用 HPLC 检测纯度 > 98%); 龙葵药材(分别采自南京江宁、南京栖霞、泰州泰兴、连云港灌南、徐州新沂、镇江丹徒, 采收时间在 2007 年 10 月 16—20 日) 经南京中医药大学药学院吴德康教授鉴定为正品; 乙腈、磷酸(美国 Tedia 公司, 色谱纯) 纯净水(乐百氏公司) 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm)。流动相乙腈(A)-1% 磷酸溶液(B) 梯度条件为 0~5 min, 22% A; 5~20 min, 22%~25% A; 20~30 min, 25%~30% A; 30~31 min, 30%~22% A。流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL, 检测波长 205 nm, 柱温 30 °C。按照上述色谱条件进行测定, 结果显示澳洲茄碱、澳洲茄边碱、khasianine 与其他杂质峰得到很好的分离。各成分理论塔板数不低于 3 000。高效液相色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取澳洲茄碱 10.75 mg, 澳洲茄边碱 9.07 mg, khasianine 8.70 mg, 于 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度摇匀, 配制成质量浓度分别为澳洲茄碱为 1.075 g · L⁻¹, 澳洲茄边碱为 0.907 g · L⁻¹, khasianine 为 0.870 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。



1. 澳洲茄碱; 2. 澳洲茄边碱; 3. Khasianine。

图 1 甾体生物碱对照品 (A) 和龙葵药材 HPLC 图 (B)

2.3 供试品溶液制备 精密称取不同居群的龙葵样品粉末各 2 g, 加入 5% 醋酸-甲醇溶液 50 mL, 称重超声提取 30 min, 再次称重, 用提取液补足失重, 摇匀, 过滤, 取续滤液置 50 mL 量瓶中, 用提取液定容至刻度。从中精密量取 25 mL 溶液减压蒸干, 残渣用 10% 醋酸溶液溶解, 定容到 5 mL 量瓶中, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.4 线性关系考察 分别精密移取上述对照品溶液 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 mL 于 5 mL 量瓶中, 用 10% 醋酸溶液稀释至刻度, 摇匀。分别吸取上述对照品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪中, 记录峰面积; 以含量 (μg) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得线性回归方程。澳洲茄碱的线性回归方程: $Y = 282\ 762X - 41.863$, 线性范围 0.860 ~ 10.320 μg, $r = 0.999\ 7$; 澳洲茄边碱的线性回归方程 $Y = 250\ 300X - 42.125$, 线性范围 0.726 ~ 8.710 μg, $r = 0.999\ 7$; khasianine 的线性回归方程: $Y = 356\ 258X - 105.84$, 线性范围 0.696 ~ 8.352 μg, $r = 0.999\ 8$ 。

2.5 稳定性考察 取同一药材 (南京江宁) 供试品溶液, 按 2.1 项下的条件, 分别在保存 0, 6, 12, 24 h 进行测定, 记录峰面积, 3 种对照品在 24 h 内峰面积积分值的 RSD 分别为澳洲茄碱 0.38%; 澳洲茄边碱 0.88%; khasianine 0.45%, 说明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.6 精密度考察 在上述色谱条件下, 对混合对照品溶液, 重复测定 5 次后, 证实 3 种物质在此测定方法下, 测得峰面积的 RSD 为澳洲茄碱 0.011%, 澳洲茄边碱 0.035%, khasianine 0.091%。

2.7 重复性试验 取 2.5 中同产地龙葵药材供试品溶液, 进行测定, 计算各份澳洲茄碱、澳洲茄边碱、khasianine 的含量, RSD 分别为 1.40%, 1.5%, 1.4%, 结果表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量龙葵药材 (南京江宁) 粉末 (过 3 号筛) 6 份, 每份约 1.0 g, 置于 50 mL 三角烧瓶中, 精密加入澳洲茄碱、澳洲茄边碱及 khasianine 对照品, 按照供试品溶液制备, 测定含量并计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 龙葵 3 种甾体生物碱加样回收率 (n = 6)

	样品中含有的量	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
澳洲茄碱	0.722 8	0.750	1.478 0	100.69	100.18	1.3
	0.713 2	0.750	1.448 7	98.06		
	0.744 7	0.750	1.499 3	100.61		
	0.732 0	0.750	1.477 1	99.35		
	0.716 3	0.750	1.473 1	100.91		
澳洲茄边碱	0.721 8	0.750	1.482 8	101.47	99.08	1.6
	1.105 0	1.010	2.094 9	98.01		
	1.090 3	1.010	2.111 3	101.09		
	1.138 4	1.010	2.130 3	98.21		
	1.119 1	1.010	2.133 1	100.39		
khasianine	1.095 0	1.010	2.101 9	99.69	99.88	1.3
	1.103 4	1.010	2.084 1	97.10		
	0.698 5	0.730	1.4156	98.23		
	0.689 2	0.730	1.420 8	100.22		
	0.719 6	0.730	1.442 8	99.07		
0.707 4	0.730	1.437 2	99.98			
0.692 2	0.730	1.419 3	99.60			
0.697 5	0.730	1.443 4	102.18			

2.9 样品的测定 精密称取同一采收期 6 个不同居群龙葵药材全草粉末各 2.0 g (过 3 号筛), 按照“供试品制备”项下制备, 以 20 μL 进样, 测定色谱峰峰面积, 根据标准曲线计算质量分数, 结果见表 2。

3 讨论

龙葵中甾体生物碱成分只有一个共轭双键, 全波长扫描结果显示, 其最大紫外吸收在 205 nm 左右。甲醇-水为流动相时, 甲醇本身的紫外吸收会对甾体生物碱的测定有一定的干扰; 而乙腈-水系统分离效果较好, 但峰形拖尾现象较严重; 在水相中加入 H₃PO₄ 后, 峰形得到了一定的改善, 拖尾有所缓解。同时考察了在水相中添加 0.5%, 1.0%, 1.5% 的磷酸, 结果表明, 不同浓度的磷酸对保留时间、峰形基线有一定影响。综合所使用的色谱柱的 pH 范围、色谱峰形等因素, 选择使用 1.0% 磷酸溶液。此时各峰对称性好, 峰形较尖锐。

江苏境内同一采收期 6 个不同居群龙葵地上部分 3 种有效成分的含量有较大差异, 在被检测出结

表 2 不同居群龙葵全草中甾体生物碱量的测定 (n = 3)

产地	澳洲茄碱		澳洲茄边碱		khasianine	
	质量分数 / mg · g ⁻¹	RSD	质量分数 / mg · g ⁻¹	RSD	质量分数 / mg · g ⁻¹	RSD
南京栖霞	0.682 5	0.77	1.630 9	0.98	0.732 8	1.1
南京江宁	0.715 1	1.4	1.084 6	1.6	0.695 3	1.2
镇江丹徒	0.991 4	0.92	1.380 3	1.8	0.485 0	0.79
连云港灌南	1.513 2	1.1	3.249 8	1.1	0.384 0	1.2
泰州泰兴	0.830 1	1.2	1.302 2	0.93	0.331 1	1.1
江苏新沂	1.124 8	0.89	1.738 4	1.1	-	-

果的 6 个不同居群龙葵全草中 , 澳洲茄碱、澳洲茄边碱和 khasianine 的含量差异均较大 , 以澳洲茄边碱的含量差异最高 (高 299.63%) ; 澳洲茄碱和澳洲茄边碱在药材中的含量 , 在江苏境内由北向南大致呈现递减现象 , 而 khasianine 在药材中的含量则相反 , 这些研究数据为合理使用龙葵药材提供依据。

[参考文献]

[1] 王蔚, 陆道培. 龙葵总提取物对多发性骨髓瘤 U266 细胞株的作用[J]. 北京大学学报: 医学版, 2005, 37(3): 240.
 [2] 梁生旺, 王浴铭, 张广强, 等. 薄层扫描法测定龙葵中澳洲茄碱的含量[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(8): 494.
 [3] 袁海建, 贾晓斌, 陈彦. 高效液相色谱法测定龙葵中澳洲茄碱的量[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(1): 96.
 [4] 袁海建, 贾晓斌, 陈彦, 等. 正交试验优选龙葵的提取工艺[J]. 中成药, 2009, 31(1): 120.

Simultaneous determination of three steroidal alkaloids from *Solanum Nigrum* by RP-HPLC

YUAN Haijian^{1, 2}, CHEN Yigang¹, CAI Baochang³, JIA Xiaobin^{2*}, CHEN Yan²

(1. Taizhou polytechnic college, Taizhou 225300, China;

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

3. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: A new method for simultaneous determination of solasonine (1), solamargine (2) and khasianine (3) in *Solanum Nigrum* by reversed-phase HPLC was developed. **Method:** The samples were separated at 30 °C on Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with acetonitrile-water-phosphoric as mobile phase. Flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was 205 nm. **Result:** There was good linearity between the peak area and concentration at the ranges of 0.860-10.320 μg (r=0.999 7), 0.726-8.710 μg (r=0.999 7), 0.856-10.270 μg (r=0.999 7) for 1, 2 and 3 respectively. The average recoveries of 1, 2 and 3 were 101.04%, 99.65%, 100.17%. **Conclusion:** The method is rapid, simple and accurate, and it can be used for the evaluation of *Solanum Nigrum* L.

[Key words] reversed-phase high performance liquid chromatography; *Solanum Nigrum*; solasonine; solamargine; khasianine

doi: 10.4268/cjmm20111219

[责任编辑 丁广治]