

HPLC 同时测定鸦胆子中 3 个苦木内酯的含量

周中流^{1,2*}, 石任兵², 刘斌², 邹节明³, 王力生³, 夏敬民¹

(1. 湛江师范学院 化学科学与技术学院制药工程系, 广东 湛江 524048;

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

3. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:建立鸦胆子中3种苦木内酯的高效液相色谱含量测定方法。方法:采用phenomenex C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm), 甲醇-水梯度洗脱, 流速1.0 mL · min⁻¹, 检测波长270 nm。结果:鸦胆苦素D在2.52 ~ 12.60 μg (r=0.999 6), 鸦胆苦醇在2.19 ~ 10.95 μg (r=0.999 6), 鸦胆因H在2.91 ~ 14.55 μg (r=0.999 8) 线性关系良好, 鸦胆因D平均回收率100.01%, RSD 0.31% (n=6); 鸦胆苦醇平均回收率100.95%, RSD 1.7% (n=6); 鸦胆因H平均回收率100.43%, RSD 1.7% (n=6)。结论:3批样品测定结果表明, 该方法简便、准确, 可用于鸦胆子中3种苦木内酯的含量测定。

[关键词] 鸦胆子; 苦木内酯; 高效液相色谱; 含量测定

鸦胆子为苦木科植物鸦胆子 *Brncea javanica* L. Merr. 的灰黑色长圆形或卵形的干燥成熟果实, 是我国民间传统常用中药, 该药材原植物主产于我国南方沿海热带和亚热带地区(广东、海南、广西、云南及台湾)。根据文献报道^[1-2], 中药鸦胆子中主要含有苦木内酯、脂肪酸和生物碱等成分。鸦胆子性味苦、寒, 有毒。我国传统中医将其用于清热、燥湿、杀虫、解毒。据报道, 鸦胆子具有抗疟、抗炎和抗肿瘤等作用^[3-6]。我国于1978年开始研制鸦胆子油静脉乳剂, 并用于治疗各种恶性肿瘤。

国内外文献有关鸦胆子活性成分的报道^[1-2], 发现其果实中含有多种具有抗肿瘤活性的苦木内酯类化合物。为了进一步研究鸦胆子抗肿瘤活性成分, 作者从广东鸦胆子果实中分离得到3个苦木内酯类化合物, 分别鉴定为鸦胆苦素D、鸦胆苦醇和鸦胆因H。经检索文献, 还未发现采用高效液相色谱法同时测定鸦胆子中多个苦木内酯的相关报道。鉴于此, 作者首次建立了高效液相色谱法同时测定3个苦木内酯成分的分析方法, 为中药鸦胆子质量控制提供了依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱系统, Empower 色谱工作

站; Sartorius BT 25S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); 2500DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

对照品3种苦木内酯均为自制(实验室自制, 经UV, NMR, MS, IR 鉴定, HPLC 纯度不低于98%) 符合定量要求。甲醇(色谱纯); 水为屈臣氏蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。中药鸦胆子药材购自广西和广东, 经广西师范大学生命科学院唐绍清教授鉴定为植物 *B. javanica* 干燥果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm); 流动相 甲醇(A)-水溶液(B) 梯度洗脱 28% ~ 32% A (0 ~ 5 min), 32% ~ 40% A (6 ~ 10 min), 40% ~ 40% A (11 ~ 30 min); 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 270 nm; 柱温 25 °C。依上述色谱条件, 分别精密吸取鸦胆苦素D、鸦胆苦醇和鸦胆因H 3种对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 分别进样。在对照品溶液和供试品溶液色谱图相应位置上, 有相同保留时间的色谱峰, 结果见图1。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取鸦胆子干燥果实甲醇提取物 5.140 7 g 置 100 mL 量瓶中, 加流动相超声溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜过滤, 备用。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取对照品鸦胆苦素D、鸦胆苦醇和鸦胆因H 适量, 用流动相配置成质量浓度分别为 0.504 0.438 0.582 g · L⁻¹ 的对照

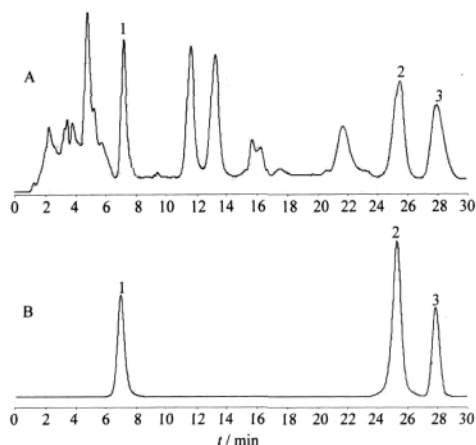
[稿件编号] 20101112001

[基金项目] 湛江师范学院自然科学研究项目博士专项(ZL1009)

[通信作者] * 周中流, Tel: (0759) 3182455, E-mail:

zhou110zhong99@sohu.com

品溶液,备用。



1. 鸦胆苦素 D; 2. 鸦胆苦醇; 3. 鸦胆因 H。

图1 鸦胆子 (A) 和对照品 (B) 的 HPLC 图

2.4 线性关系考察 取鸦胆苦素 D、鸦胆苦醇和鸦胆因 H 对照品溶液,浓度分别为 0.504, 0.438, 0.582 $g \cdot L^{-1}$ 在 2.1 项的色谱条件下,分别精密吸取 5, 10, 15, 20, 25 μL 注入液相色谱仪,测定各色谱峰峰面积。以对照品量(μg)为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标进行线性回归,结果见表 1。

表 1 鸦胆苦素 D、鸦胆苦醇和鸦胆因 H 回归方程和线性范围

对照品	回归方程	线性范围/ μg	r
鸦胆苦素 D	$Y = 71.151X - 2.044.7$	2.52 ~ 12.60	0.999 6
鸦胆苦醇	$Y = 90.339X + 16.186$	2.19 ~ 10.95	0.999 6
鸦胆因 H	$Y = 58.656X + 4.629.1$	2.91 ~ 14.55	0.999 8

2.5 精密度考察 取鸦胆子干燥果实,按 2.2 项下方法,制备供试品溶液。在 2.1 项的色谱条件下,精密吸取供试品溶液 20 μL ,连续进样 6 次,测定鸦胆苦素 D、鸦胆苦醇和鸦胆因 H 色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 1.5%,表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性考察 取 2.5 项下供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样,测定鸦胆苦素 D、鸦胆苦醇和鸦胆因 H 色谱峰峰面积,计算 RSD 分别为 1.2%, 1.4%, 和 2.5%。表明样品在 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性考察 取同一批鸦胆子干燥果实,精密称定 6 份,按 2.2 项下方法,制备供试品溶液,平行

测定,计算鸦胆苦素 D 平均含量为 0.37% (RSD 0.93%),鸦胆苦醇平均含量为 0.28% (RSD 1.3%),鸦胆因 H 平均含量为 0.08% (RSD 0.95%),表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率考察 称取已知含量的鸦胆子干燥果实 6 份,每份约 1 g,精密称定,分别精密加入鸦胆苦素 D、鸦胆苦醇和鸦胆因 H 对照品适量,加流动相超声溶解,并稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜过滤,进样测定,计算回收率。结果见表 2 ~ 4。

表 2 鸦胆苦素 D 加样回收率

药材量 /g	鸦胆苦素 D/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.008 1	3.730 0	3.70	7.421 8	99.78		
1.003 7	3.713 7	3.70	7.420 3	100.18		
0.999 7	3.698 9	3.70	7.419 8	100.56	100.01	0.31
0.998 2	3.693 3	3.70	7.390 1	99.91		
1.008 8	3.732 6	3.70	7.422 1	99.72		
0.998 6	3.694 8	3.70	7.390 9	99.89		

表 3 鸦胆苦醇加样回收率

药材量 /g	鸦胆苦醇 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.012 7	2.835 6	2.80	5.710 9	102.69		
1.009 3	2.826 0	2.80	5.667 1	101.47		
0.999 8	2.799 4	2.80	5.590 3	99.67	100.95	1.7
0.999 1	2.797 5	2.80	5.569 8	99.01		
0.999 8	2.799 4	2.80	5.590 3	99.67		
1.017 5	2.849 0	2.80	5.737 8	103.17		

表 4 鸦胆因 H 加样回收率

药材量 /g	鸦胆因 H /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.998 1	0.798 5	0.80	1.581 6	97.89		
1.003 5	0.802 8	0.80	1.613 4	101.33		
0.999 8	0.799 8	0.80	1.591 1	98.91	100.43	1.7
1.006 4	0.805 1	0.80	1.619 8	101.84		
0.999 1	0.799 3	0.80	1.601 3	100.25		
1.011 6	0.809 3	0.80	1.627 9	102.33		

2.9 样品含量测定 精密称取 3 批鸦胆子干燥果实各 3 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进行测定。以外标法计算各成分的含量。结果见表 5。

表 5 样品含量测定结果 %

批次	鸦胆苦素 D		鸦胆苦醇		鸦胆因 H	
	质量分数	RSD	质量分数	RSD	质量分数	RSD
1	0.34	1.6	0.24	1.08	0.07	2.30
2	0.28	0.7	0.31	1.33	0.12	0.95
3	0.39	1.3	0.26	1.95	0.08	0.67

3 讨论

取鸦胆苦素 D、鸦胆苦醇和鸦胆因 H 对照品混合溶液,采用二极管阵列检测器在 190~400 nm 进行全波长扫描,3 种对照品在 270 nm 左右有吸收且干扰较少,因此选择 270 nm 作为检测波长。试验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水及乙腈-磷酸水等体系。结果表明,在甲醇-水流动相体系中,3 种成分分离良好,且无干扰,故选择该流动相体系。实验结果表明,采用 HPLC 在本试验建立的色谱条

件下,可同时测定鸦胆子果实中 3 种苦木内酯的含量,所测成分色谱峰与其他成分分离良好,方法简便快速,结果准确可靠,可作为其质量控制方法之一。

[参考文献]

- [1] 丁晨旭,索有瑞. 中药鸦胆子化学成分及药理学研究进展[J]. 中成药 2006 28 (1): 117.
- [2] 杨峰,于红,王凤礼,等. 鸦胆子的研究概况[J]. 黑龙江医药, 1998, 11: 2.
- [3] 马杰津. 抗癌药物鸦胆子的研究进展[J]. 医学文选 2001 20 (3): 378.
- [4] 廖文华. 美研究人员发现中药鸦胆子具有抗癌作用[J]. 中国中医药信息杂志 2001 8 (11): 71.
- [5] 孙蓉,杨倩. 基于功效和物质基础的鸦胆子毒性研究进展[J]. 中国药物警戒 2010 7 (3): 159.
- [6] 沈建国,张正坤,吴祖建,等. 臭椿和鸦胆子抗烟草花叶病毒作用研究[J]. 中国中药杂志 2007 32(1): 27.

Quantitative determination of contents of three components in *Brucea javanica* by HPLC

ZHOU Zhongliu^{1,2}, SHI Renbing², LIU Bin², ZOU Jieming³, WANG Lisheng³, XIA Jingmin
(1. Chemistry Science and Technology School, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China;
2. School of Chinese Pharmacy Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
3. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for quantitative determination of three quassinoids in *Brucea javanica*. **Method:** The determination was carried out on a phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm 5 μm) with gradient elution program of methanol-water at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was 270 nm. **Result:** Linearities of bruceine D, brusatol and bruceine H were good ($r = 0.9996, 0.9996, \text{ and } 0.9998$) in ranges of 2.52-42.60, 2.19-40.95, and 2.91-44.55 μg, respectively. The average recoveries of bruceine D, brusatol and bruceine H were 100.01%, 100.95% and 100.43% respectively, and RSD of the above three compounds were 0.31% ($n = 6$), 1.7% ($n = 6$) and 1.7% ($n = 6$), respectively. **Conclusion:** The determination results of three batch samples showed that the method was simple, accurate and could be used in the quantitative determination of three components in the *B. javanica*.

[Key words] *Brucea javanica*; quassinoid; HPLC; quantitative determination

doi: 10.4268/cjcm20111429

[责任编辑 丁广治]