

RP-HPLC法同时测定鸡骨草药材中的相思子碱和下箴刺桐碱*

黄平, 莫虎, 马雯芳, 韦善新

(广西中医药研究院, 南宁 530022)

摘要 目的: 建立测定鸡骨草药材中相思子碱和下箴刺桐碱含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-甲醇-乙腈-冰醋酸-三乙胺 (82: 13: 5: 0.2: 0.3), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 220 nm, 柱温为室温。结果: 相思子碱和下箴刺桐碱线性范围均为 1.1~55 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$); 平均回收率 ($n=6$) 分别为 104.6% 和 103.5%。结论: 所建方法简便、快速, 结果准确, 为鸡骨草药材的质量评价提供了可靠的方法。

关键词: 鸡骨草; 相思子碱; 下箴刺桐碱; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1702-03

RP-HPLC simultaneous determination of abrine and hypaphorine in *Abrus cantoniensis**

HUANG Ping MO Hu MA Wen-fang WEI Shan-xin

(Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of abrine and hypaphorine in *Abrus cantoniensis*. **Methods** An HPLC method was adopted. Chromatographic assay was performed on Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at room temperature with water-methanol-acetonitrile-glacial acetic acid-triethylamine (82: 13: 5: 0.2: 0.3) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 220 nm. **Results** The abrine and hypaphorine had a good linearity in the range of 1.1~55 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$), the recoveries ($n=6$) were 104.6% and 103.5%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible. It can be used for quality control of *Abrus cantoniensis*.

Key words *Abrus cantoniensis*; abrine; hypaphorine; RP-HPLC

豆科相思子属植物鸡骨草 *Abrus cantoniensis* Hance 为中国药典收载的常用中药, 有清热利湿、解毒止痛的功效。除民间配方用药外, 鸡骨草是生产鸡骨草胶囊、鸡骨草丸、鸡骨草肝炎冲剂等多种中成药的原料, 也是我国出口中草药品种之一。两广民间还有用鸡骨草煲汤、煮凉茶的习俗^[1]。为了加强对鸡骨草药材及其制剂的质量控制, 前人已对鸡骨草中相思子碱的含量测定进行了研究^[2-3], 但对鸡骨草中下箴刺桐碱的含量测定研究尚未见报道。由于下箴刺桐碱是豆科相思子属和刺桐属植物中常见的生物碱, 并有一定的生理活性^[4-6], 可作为鸡骨草质量控制的指标之一。作者采用反相高效液相色谱法同时测定了鸡骨草药材中的相思子碱和下箴刺桐

碱, 获得满意结果。所建方法简便、灵敏、准确, 为鸡骨草药材质量评价提供了科学依据。

1 仪器与试剂

1200 高效液相色谱仪, 包括二极管阵列检测器、Chem station 色谱工作站 (美国安捷伦公司); 超声波清洗器 (必能信超声有限责任公司)。相思子碱对照品 (美国 SIGMA-ALDRICH 公司, 纯度 99%), 下箴刺桐碱对照品 (纯度 > 98%, 自制, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR、HSQC、HMBC 和 MS 鉴定结构); 甲醇和乙腈均为色谱纯, 三乙胺和冰醋酸均为分析纯, 水为纯净水。所用鸡骨草药材分别采购自广西南宁、桂林、梧州等市县以及广州市和珠海市, 经广西中医药研究院中药室方鼎研究员鉴定品种为

* 广西科技攻关项目 (0424008-2A)

第一作者 Tel: (0771) 5868986 E-mail: hping1208@yahoo.com.cn

Abrus cantoniensis Hance.

2 溶液的制备

2.1 对照品混合储备液 精密称取对照品相思子碱和下箴刺桐碱各 5.5 mg 置于 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解, 定容, 摇匀, 制成每 1 mL 含相思子碱和下箴刺桐碱各 0.11 mg 的混合溶液。

2.2 供试品溶液 取过 40 目筛的鸡骨草药材粉末约 1.0 g 精密称定, 置锥形瓶中, 加流动相 50 mL, 称定重量, 浸泡过夜。超声处理 (80 W, 50 kHz) 30 min 放冷, 再称定重量, 用流动相补足减失的重量, 摇匀, 用注射器取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 续滤液即为供试品溶液。

3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水-甲醇-乙腈-冰醋酸-三乙胺 (82:13:5:0.2:0.3), 临用前经过滤超声脱气处理; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长为 220 nm; 柱温为室温; 进样量为 10 μL。在此色谱条件下, 对照品和样品的色谱图见图 1。

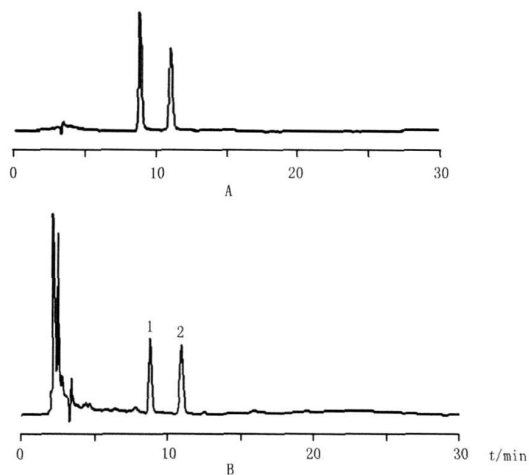


图 1 对照品 (A) 和 9 号鸡骨草样品 (B) 的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), No. 9 sample of *Abrus cantoniensis* (B)

1. 相思子碱 (abrine) 2. 下箴刺桐碱 (hypaphorine)

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 精密吸取对照品混合储备液 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得系列浓度对照品混合溶液。精密吸取各对照品混合溶液 10 μL 进样, 在“3”项色谱条件下测定。以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线并进行回归计算, 相思子碱、下箴刺桐碱回归方程分别为:

$$Y = 14.3X + 77.1 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 10.4X + 64.5 \quad r = 0.9999$$

结果表明相思子碱和下箴刺桐碱浓度均在 1.1~55 mg·L⁻¹ 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系。

4.2 精密度试验 精密吸取同一对照品混合溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果相思子碱和下箴刺桐碱峰面积的 RSD (n=6) 分别为 1.4% 和 1.6%, 表明仪器精密度良好。

4.3 重复性试验 精密称取同一批鸡骨草样品 (7 号样品, 广西南宁) 6 份, 按“2.2”项的方法操作, 测定并计算各份供试品溶液中相思子碱和下箴刺桐碱的含量。结果相思子碱的平均含量为 0.34 mg·g⁻¹, RSD=2.4%; 下箴刺桐碱的平均含量为 0.20 mg·g⁻¹, RSD=2.7%。表明方法的重复性良好。

4.4 稳定性考察 精密吸取同一批供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 进样测定, 计算相思子碱和下箴刺桐碱的含量, RSD (n=5) 分别为 1.6% 和 2.0%。结果表明, 供试品溶液在室温条件下 12 h 内稳定。

4.5 回收率试验 取已知含量 (相思子碱含量为 0.34 mg·g⁻¹, 下箴刺桐碱的含量为 0.20 mg·g⁻¹) 的同批鸡骨草药材 (7 号样品, 广西南宁) 粉末 0.5 g 共 6 份, 精密称定, 分别加入浓度为 0.17 mg·mL⁻¹ 的相思子碱对照品溶液和浓度为 0.10 mg·mL⁻¹ 的下箴刺桐碱的对照品溶液各 1.0 mL, 按“2.2”项下方法制备供试溶液。各取 10 μL 进样测定, 结果相思子碱和下箴刺桐碱的平均回收率 (n=6) 分别为 104.6% 和 103.5%, RSD 分别为 2.3% 和 2.1%。

5 样品测定

分别取不同产地的鸡骨草样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“3”项色谱条件下进行分析, 以峰面积按外标法计算含量。不同产地鸡骨草中相思子碱和下箴刺桐碱的含量见表 1。

6 讨论

6.1 提取方法的选择 有文献报道用甲醇为提取溶剂, 用索氏提取器加热回流提取约 2~3 h^[2], 但经实践觉得此方法操作比较复杂, 提取物中叶绿素杂质等也较多。本文改用超声波提取法, 操作较简便, 可以缩短提取时间。以流动相作为提取溶剂, 其中的醋酸有利于生物碱类成分的溶出, 叶绿素等杂质的干扰也相对较少。分析超声提取时间在 15~60 min 内的提取效果, 发现超声提取时间超过 30 min 后, 提取液中的相思子碱和下箴刺桐碱含量变化不大, 但杂质明显增加。因此选用超声提取时间为 30 min。

表 1 不同产地鸡骨草样品中相思子碱和下箴刺桐碱含量测定结果 (mg·g⁻¹)

Tab 1 Contents of abrine and hypaphorine in *Abrus cantoniensis* from different habitats

编号 (No.)	产地 (origin)	相思子碱 (abrine)	下箴刺桐碱 (hypaphorine)
1	广东广州 (Guangzhou Guangdong)	0.22	0.07
2	广东珠海 (Zhuhai Guangdong)	0.29	0.09
3	广西玉林 (Yulin Guangxi)	0.20	0.17
4	广西钦州 (Qinzhou Guangxi)	1.40	0.42
5	广西金秀 (Jinxiu Guangxi)	0.29	0.39
6	广西凭祥 (Pingxiang Guangxi)	1.19	0.46
7	广西南宁 (Nanning Guangxi)	0.34	0.20
8	广西横县 (Hengxian Guangxi)	0.75	0.31
9	广西梧州 (Wuzhou Guangxi)	0.39	0.42
10	广西桂林 (Guilin Guangxi)	0.18	0.09

6.2 检测波长的选择 利用 DAD 检测器在 190~400 nm 范围内扫描,发现相思子碱和下箴刺桐碱样品的最大吸收波长为 220、278、290 nm,分别在三处波长下对样品进行测试,发现在 220 nm 处灵敏度较高,峰形较好。因此,选择 220 nm 作为检测波长。

6.3 流动相的选择 参考文献 [2],选择水-甲醇-乙腈-冰醋酸-三乙胺溶剂系统,并对其中各成分比例进行了相应的调整;采用本文水-甲醇-乙腈-冰醋酸-三乙胺 (82:13:5:0.2:0.3) 为流动相,相思子碱和下箴刺桐碱达到基线分离,峰形对称,分离度好。

6.4 小结 比较 10 批鸡骨草药材的测定结果可发现,不同产地的样品中生物碱的含量也不相同,部分样品中下箴刺桐碱的含量大于相思子碱。下箴刺桐碱是豆科刺桐属、相思子属及黄芪属植物中常见生物碱,可影响一些叶螨的生育^[4],也是一种霉菌性

激素拮抗剂^[5]。它曾被认为是一种具有神经毒,可导致惊厥的化合物^[6]。目前在一些动物实验中虽然未能观察到下箴刺桐碱的毒性^[7],但它仍是一种值得关注的化合物。

参考文献

1

BAI Long-hua(白隆华), DONG Qing-song (董青松), FU Rui-ling(蒲瑞翎). Study on Chinese medicine Chicken-bone herbal(中药鸡骨草研究概况). *Guangxi Agric Sci*(广西农业科学), 2005, 34(5): 476

2

WANG Tian-yong(王天勇), YANG Wen-yuan(杨文远). Separation and determination of abrine in *abrus cantoniensis* Hance by reversed phase high performance liquid chromatography(鸡骨草和相思子中相思子碱的反相高效液相色谱分离和测定). *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 1996, 15(6): 29

3

SHI Hai-ming(史海明), HUANG Zhi-qin(黄志勤), WEN Jing(温晶), et al. HPLC determination of abrine in *Abrus cantoniensis* Hance(HPLC 法测定鸡骨草药材中相思子碱含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(11): 1716

4

Ometry NZ, El-Gengahi S, Reda AS, et al. Biological effects of some isolated *Abrus precatorius* L. alkaloids towards *Tetranychus curti-ae* Koch. *Anz Schadlingside Pflanzenschutz Umweltschutz*, 1992, 65(5): 99

5

Kawano T, Kowano N, Lapeyrie F. A fungal auxin antagonist hypaphorine prevents the indole-3-acetic acid-dependent irreversible inactivation of horseradish peroxidase: inhibition of compound III-mediated formation of P-670. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(3): 553

6

Budavari S. The Merck Index. 11th ed. Rahway: Merck & Co Inc, 1989. 773

7

Bel-Kassoufi B, Lamnaouer D, Abdennebli EH, et al. Role of hypaphorine in the toxicity of *Attagalus lusitanicus*. *Nat Prod Res*, 2008, 22(5): 461

(本文于 2008 年 6 月 5 日收到)