

文章编号: 1006-2858(2010)04-0299-04

HPLC-ELSD 法测定白英中碱苷 A 的含量

齐伟¹, 孙长山¹, 马龄², 张弘颖³, 杨红英¹, 孙立新¹

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳市第七人民医院, 辽宁 沈阳 110003;
3. 天津赛诺制药有限公司, 天津 300122)

摘要: 目的 研究白英化学成分, 建立 HPLC-ELSD 法测定白英中碱苷 A [3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside-(25 \rightarrow)-solanidan-3, 23-diol] 含量的方法。方法 采用硅胶、ODS 柱色谱进行分离纯化。运用 NMR 数据及理化性质鉴定单体化合物的结构。色谱柱为 Elite-ODS C₁₈ (200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈 体积分数为 0.02% 三乙胺水溶液 (体积比为 56:44), 检测器漂移管温度为 95 $^{\circ}$ C, 氮气流速 2.3 L \cdot min⁻¹。结果 从白英提取物中分离得到碱苷 A。碱苷 A 在 0.4~4.0 μ g 线性关系良好 ($r=0.9996$), 平均回收率为 99.6% (RSD = 2.0%)。结论 HPLC-ELSD 法可用于白英中碱苷 A 的测定。

关键词: 白英; 碱苷 A; 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器
中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

白英 (*Solanum lyratum* Thunb.), 茄科植物, 又名白毛藤, 药用全草。白英具有清热利湿、解毒消肿之功效, 用于治疗黄疸、水肿、淋病、胆囊炎、胆结石和风湿性关节炎等症^[1]。文献中报道有关白英质量控制的方法有: 崔建国^[2]等采用质量法测定了白英中脂溶性生物碱、水溶性生物碱及总生物碱的含量; 孙立新^[3-4]等采用高效液相色谱法测定了白英中薯蓣皂苷元以及白英中 16 妊娠双烯醇酮的含量。徐顺^[5]等采用气相色谱法测定了不同产地白英中亚油酸的含量。甄会贤^[6-7]等采用紫外分光光度法分别测定了白英中总黄酮、白英中总皂苷的含量。

目前从白英中分离得到的化合物有甾体皂苷、甾体生物碱及苷、黄酮、有机酸、倍半萜、甾醇及香豆素等。Murakami K 等^[8]从白英茎中分得甾体生物碱 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside-(25 \rightarrow)-solanidan-3, 23-diol (以下简称碱苷 A, glycoalkaloid A), 其化学结构式见图 1, 并发现其具有明显的抑制肿瘤细胞作用。由于碱苷 A 无紫外吸收, 本文作者采用了高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定了不同产地白英药材中碱苷 A

的含量, 为更好地对白英药材进行质量评价和白英制剂的开发提供了依据。

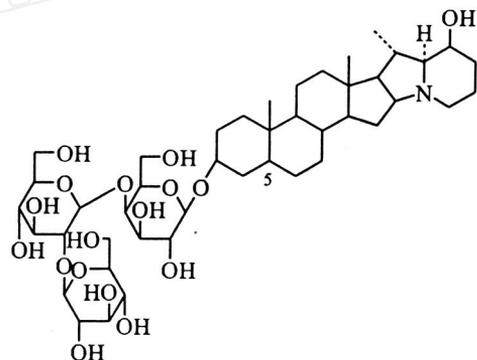


Fig 1 Chemical structure of glycoalkaloid A

1 仪器与材料

依利特 P200 高效液相色谱仪 (大连依利特分析仪器有限公司), Alltech 2000 蒸发光检测器 (美国 Alltech 公司), N3000 色谱工作站 (浙江大学智能信心研究所), TG332A 十万分之一分析天平 (湘仪天平仪器厂), KQ-100 型超声仪 (昆山市超声波仪器有限公司)。

柱色谱、薄层色谱所用硅胶 G (青岛海洋化工厂), ODS (博纳艾杰尔科技有限公司), 碱苷 A 对

收稿日期: 2009-05-19

基金项目: 辽宁省科技厅资助项目 (2007226011); 沈阳市科技局资助项目 (1071164-9-00)

作者简介: 齐伟 (1981-), 男 (汉族), 吉林白山人, 硕士研究生, E-mail py_1982@163.com; 孙立新 (1967-), 女 (满族), 辽宁新宾人, 副教授, 博士, 主要从事药物质量控制方法及药物代谢动力学研究, Tel 024-23986365, E-mail slx04@163.com。

照品为自制 (HPLC-ELSD 法检测纯度质量分数 > 99%), 乙腈 (色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司), 水为纯净水, 其他所用试剂均为市售分析纯。

9 个产地的白英药材购于各产地, 经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为 *Solanum lyratum* Thunb.。

2 方法与结果

2.1 提取分离

白英药材 10 kg, 粉碎后用 10 倍量体积分数为 70% 的乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 减压蒸干。残渣用水分散后经石油醚萃取 3 次, 弃去石油醚层, 减压浓缩, 向浓缩液中加入浓氨水, 调节 pH 至 10.0, 使部分生物碱以沉淀的形式析出, 过滤, 所得沉淀为总生物碱 46.5 g, 总生物碱分别用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 蒸干后得到正丁醇萃取物 4.6 g, 正丁醇萃取物经硅胶柱层析, 氯仿-甲醇 (100:1:0:100) 梯度洗脱得 7 个流分 (Fr 1-Fr 7), Fr 3 经 ODS 柱层析, 水-甲醇为流动相 (5:1:0:100) 梯度洗脱得碱苷 A (230.4 mg)。

2.2 结构鉴定

碱苷 A 白色粉末 (甲醇), ESI-MS m/z 902 $[M + H]^+$ 。Molishd 反映呈阳性。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 0.75 (3H, s, H-18)、0.84 (3H, s, H-19)、0.88 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, H-27)、1.14 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-21)、4.88 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1)、5.06 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1)、5.13 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 12.2 (C-19)、16.8 (C-18)、18.6 (C-21)、20.7 (C-11)、21.4 (C-27)、27.2 (C-25)、28.5 (C-6)、29.2 (C-20)、30.0 (C-2)、31.9 (C-15)、34.2 (C-7)、35.0 (C-8)、35.4

(C-10)、36.7 (C-1 和 24)、38.3 (C-4)、39.8 (C-12)、40.9 (C-13)、44.2 (C-5)、54.0 (C-9)、57.0 (C-14)、58.1 (C-26)、61.7 (C-17)、64.2 (C-23)、69.1 (C-16)、78.3 (C-22)、71.6 (C-3)、103.4 (C-1)、75.0 (C-2)、73.6 (C-3)、79.5 (C-4)、76.5 (C-5)、60.2 (C-6)、104.7 (C-1)、84.0 (C-2)、77.2 (C-3)、73.2 (C-4)、76.7 (C-5)、61.9 (C-6)、101.0 (C-1''')、75.9 (C-2''')、76.6 (C-3''')、73.5 (C-4''')、76.5 (C-5''')、61.2 (C-6''')。光谱数据与文献 [8] 对照基本一致, 碱苷 A 鉴定为 $3-O^--D^-$ glucopyranosyl $-(1 \rightarrow 2)^--D^-$ glucopyranosyl $-(1 \rightarrow 4)^--D^-$ galactopyranoside $-(25)^--solanidan-3, 23-diol$ 。

2.3 溶液的制备

取碱苷 A 对照品 10.0 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碱苷 A 对照品溶液, 4 备用。

取白英干燥药材细粉 (过 0.425 mm 筛) 约 1.5 g, 精密称定。置 100 mL 圆底烧瓶中, 加入体积分数为 90% 的乙醇 30 mL, 80 °C 水浴下回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压蒸干。残渣用适量体积分数为 90% 的乙醇超声溶解, 定量转移至 25 mL 量瓶中并用体积分数为 90% 的乙醇定容, 摇匀后用微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.4 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Elite-ODS C_{18} (200 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-体积分数为 0.02% 的三乙胺水溶液 (体积比为 56:44), 柱温 25 °C, 流速 $0.85 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测器漂移管温度为 95 °C, 载气流速 $2.3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 20 μL 。理论板数按碱苷 A 计, 不低于 4 000。碱苷 A 与其他组分峰的分离度均大于 1.5, 拖尾因子在 0.95 ~ 1.05 之间。该色谱条件下的色谱图见图 2。

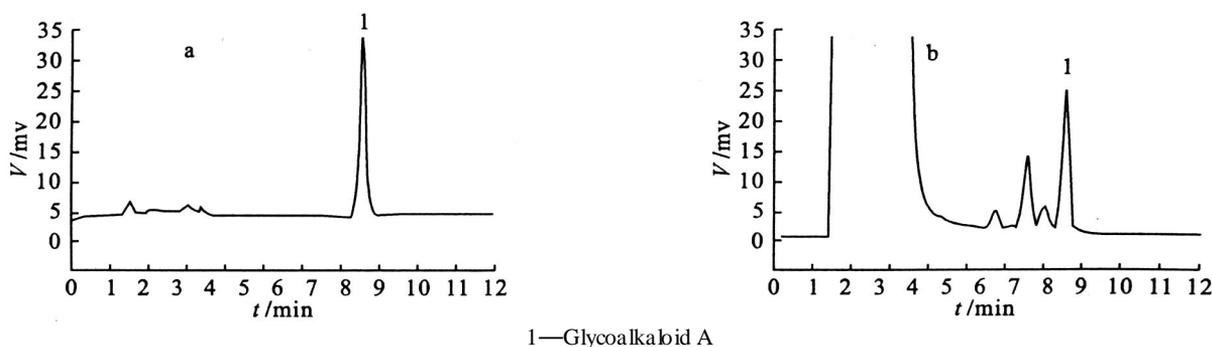


Fig 2 HPLC chromatograms of glycoalkaloid A reference substance(a) and samples(b)

2.5 线性关系的考察

分别精密量取 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碱苷 A 对照品溶液 $0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 \text{ mL}$, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 制成质量浓度分别为 $20.0, 40.0, 80.0, 120.0, 160.0, 200.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碱苷 A 溶液, 精密量取 $20 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。以对照品峰面积 (自然对数) 为纵坐标, 以进样量 (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 所得回归曲线方程为 $Y = 1.040X + 11.48$, 相关系数 $r = 0.9996$ 。结果表明: 碱苷 A 在 $0.4 \sim 4.0 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.6 精密度试验

精密量 $120.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 碱苷 A 对照品溶液, 按照上述色谱条件, 取 $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 重复测定 6 次, 记录色谱峰面积, 碱苷 A 峰面积的相对标准偏差为 1.7% 。表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取白英干燥药材细粉 (No. 7) 约 1.5 g , 精密

称定, 按供试品制备方法平行制备 6 份供试品溶液。精密吸取 $20 \mu\text{L}$ 进样分析, 测定碱苷 A 的含量, 计算其相对标准偏差为 1.3% , 说明本法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取一供试品溶液 (No. 7), 室温放置, 分别于 $0, 2, 4, 8, 12 \text{ h}$ 按上述色谱条件分析, 每次进样 $20 \mu\text{L}$, 记录色谱峰面积。计算碱苷 A 峰面积的 RSD 为 1.6% 。结果表明供试品溶液在室温下 12 h 内保持稳定。

2.9 回收率试验

取已知含量的白英干燥药材粉末 (No. 7) 9 份 (碱苷 A 含量质量分数为 0.164%), 每份约 0.75 g , 精密称定, 分别加入低、中、高 3 个质量浓度的对照品 (分别相当于药材原有含量质量分数的 $50\%, 100\%, 150\%$), 每个浓度 3 份, 按供试品制备方法处理并测定含量, 计算其平均回收率, 结果见表 1。

Table 1 Recoveries of the method

$m_{\text{origin}}/\text{mg}$	$m_{\text{added}}/\text{mg}$	$m_{\text{found}}/\text{mg}$	Recovery/%	$\bar{x}/\%$	RSD/%
1.23	1.85	3.06	98.9		
1.23	1.85	3.10	101.1		
1.23	1.85	3.05	98.4		
1.23	1.24	2.45	98.4		
1.23	1.24	2.49	101.6	99.6	2.0
1.23	1.24	2.51	103.2		
1.23	0.62	1.83	96.8		
1.23	0.62	1.85	100.0		
1.23	0.62	1.84	98.4		

2.10 样品测定

取 9 个产地的白英干燥药材粉末, 按供试品制备方法操作, 其中上海、湖南三相产地样品定溶至 100 mL 后, 在上述色谱条件下进样分析, 标准曲线计算含量, 结果见表 2。

Table 2 Determination of glycoalkaloid A in Solanum lyratum Thunb (n = 9)

No	Source	w (glycoalkaloid A) /%
1	Henan Zhengzhou	0.048
2	Guangdong Foshan	0.161
3	Fujian Fuzhou	0.047
4	Hebei	0.124
5	Guangdong Guangzhou	0.034
6	Hubei Wuhan	0.036
7	Hubei Shishou	0.164
8	Sichuan	0.200
9	Neimenggu	0.284

3 讨论

白英药材中化学成分繁多, 甾体生物碱类化合物含量较大且活性较好。碱苷 A 属甾体生物碱苷, 无紫外吸收, 无法用紫外检测器测定。而本试验所采用的蒸发光散射检测器属于通用型检测器, 可用于无紫外吸收物质的测定, 不受流动相光谱本底的干扰, 灵敏度及准确度亦符合含量测定的要求。为更好地对白英药材进行质量评价提供了依据。

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对提取条件进行优化, 考察了乙醇浓度、提取时间、提取次数 3 个因素, 通过直观分析和方差分析, 确定最优提取条件为体积分数 90% 的乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 2 h 。蒸发光检测器是一种质量型检测器, 响应值与样品进样量一般不成线性。直接以碱苷 A 的

峰面积值对进样量进行回归,得到的线性结果较差,将碱苷 A 峰面积和进样量取自然对数后进行回归,结果得到比较理想的线性关系。

在色谱条件优化中,分别试验了甲醇-水、乙腈-水系统,同时分别考察了甲酸、醋酸铵、磷酸缓冲盐、三乙胺等改性剂对色谱峰的影响。结果表明:乙腈体积分数为 0.02% 的三乙胺水溶液(体积比为 56:44)作为流动相时碱苷 A 色谱峰与其他成分谱峰的分离达到要求。

从不同产地白英中碱苷 A 含量测定结果可以看出,白英中碱苷 A 含量很高,但白英产地不同,碱苷 A 的含量差异较大。

参考文献:

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京:人民卫生出版社,1983:291.
- [2] 崔建国,陈小军,孙志良,等. 白毛藤生物碱的提取及体外抗菌活性研究 [J]. 中兽医医药杂志,2004,23(5):41-43.
- [3] 孙立新,孟楠,何珉,等. HPLC法测定中药白英中薯蓣皂苷元的含量 [J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(1):29-31.
- [4] 孙立新,李凤荣,孟楠,等. HPLC法测定中药白英中 16 妊娠双烯醇酮的含量 [J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(4):294-296.
- [5] 徐顺,张宁,王林江,等. 气相色谱法测定不同产地白英中亚油酸的含量 [J]. 药物分析杂志,2007,27(6):912-914.
- [6] 甄会贤,李平,张虹,等. 白英中总黄酮的含量测定 [J]. 中华中医药学刊,2008,26(10):2231-2233.
- [7] 甄会贤,齐焯,陈扬,等. 白英中总皂苷的含量测定 [J]. 时珍国医国药,2008,19(6):1402-1403.
- [8] MURAKAMI K, EZMA H, TAKASHI Y, et al. Studies on the constituents of Solanum Plants V. The constituents of Solanum THUNB II [J]. Chem Pharm Bull, 1985,33(1):67-73.

Determination of content of glycoalkaloid A in Solanum lyratum Thunb. by HPLC-ELSD

QI Wei¹, SUN Chang-shan¹, MA Ling², ZHANG Hong-ying³, YANG Hong-ying¹, SUN Li-xin¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shenyang No. 7 People's Hospital, Shenyang 110003, China; 3. Tianjin Cinorch Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300122, China)

Abstract: Objective To study the chemical constituents of Solanum lyratum Thunb. and develop an HPLC-ELSD method for the determination of glycoalkaloid A [3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside-(25)-solanidan-3,23-diol] in Solanum lyratum Thunb. **Methods** The constituents were separated and purified by silica gel and ODS chromatography, and the structure of glycoalkaloid A was identified by NMR and physicochemical property. The operation was carried out on a Elite-ODS C₁₈ (200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) column with the mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile-0.02% () triethylamine (V/V=56:44). The parameters of drift tube and gas flow rate of the detector were set at 95 and 2.3 L \cdot min⁻¹, respectively. **Results** Glycoalkaloids A was obtained from Solanum lyratum Thunb. The linear range of glycoalkaloids was 0.4-4.0 μ g (r=0.9996) and the average recovery was 99.6% (RSD=2.0%). **Conclusions** The method is found to be accurate, sensitive and reproducible. It can be used for the determination of the content of glycoalkaloid A in Solanum lyratum Thunb.

Key words: Solanum lyratum Thunb.; glycoalkaloid A; HPLC; ELSD