RP-HPLC-ELSD 法同时测定白英中蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元和氢化勒帕茄次碱

杨红英[1],孙长山[1],马 龄[2],顾广才[3],齐 伟[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. 江苏飞马药业有限公司,江苏 南通 226009)

摘 要:**目的** 建立 RP-HPLC-ELSD 法同时测定白英中蜀羊泉次碱(soladulcidine)、薯蓣皂苷元(diosgenin)和氢化勒帕茄次碱(5α,6-dihydroleptinidine)。**方法** 色谱柱为 Elite C_{18}(200 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-四氢呋喃-0.06%三乙胺水溶液(93∶4∶3),漂移管温度 80 ℃,载气流速 1.9 L/min。**结果** 蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元和氢化勒帕茄次碱分别在 20～100、80～400、10～50 μg/mL 线性关系良好。3 种成分的平均回收率分别为 96.4%、102.5%、99.3%,RSD 分别为 3.0%、3.4%、3.0%。**结论** 该方法适用于白英药材的质量控制。

关键词:白英;RP-HPLC-ELSD;蜀羊泉次碱;薯蓣皂苷元;氢化勒帕茄次碱

中图分类号:R282.6 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2010)03-0481-03

白英 *Solanum lyratum* Thunb. 为茄属植物,临床用于多种癌症的治疗[1]。主要成分为甾体皂苷类、甾体生物碱及其苷类等。研究报道薯蓣皂苷元对人宫颈癌 HeLa 细胞有抑制作用[2]。本实验首次从白英中分得氢化勒帕茄次碱[3,4],并发现其对多种肿瘤细胞有抑制作用。白英质量控制方法文献报道有 GC-MS、HPLC、UV 法等[5~9]。甾体皂苷和甾体生物碱类化合物无紫外吸收或紫外响应弱,采用 RP-HPLC-ELSD 法测定白英中蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元和氢化勒帕茄次碱,为白英的质量控制提供一种重复性较好、准确度较高的方法。

1 仪器与试药

Elite 高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司),All-tech 2000 蒸发光散射检测器(美国奥泰公司),N3000 色谱工作站,TG332A 型十万分之一分析天平(湘仪天平仪器厂),88B 型高速粉碎机(浙江省瑞安市春海药材器械厂)。

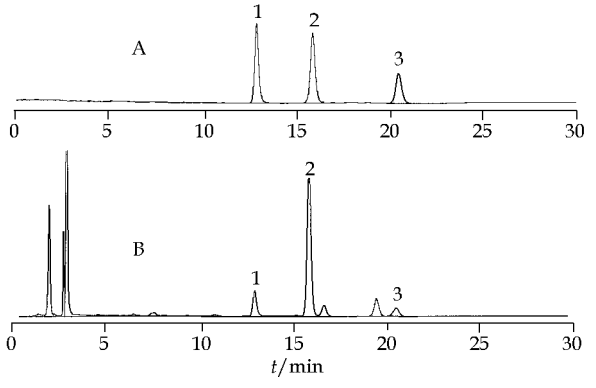
蜀羊泉次碱,氢化勒帕茄次碱对照品为本实验室自行制得(经 TLC 及 HPLC 测定质量分数达 99%以上)。薯蓣皂苷元对照品(批号 1539-200001)由中国药品生物制品检定所提供。乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

不同产地白英药材由沈阳药科大学孙启时教授鉴定为茄科植物白英 *Solanum lyratum* Thunb.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性实验:色谱柱为 Elite C_{18}(200 mm×4.6 mm,5 μm),柱温 25 ℃,流动相为乙腈-四氢呋喃-0.06%三乙胺水溶液(93∶4∶3),体积流量 1 mL/min,漂移管温度 80 ℃,雾化气流速 1.9 L/min,不分流模式。

蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元和氢化勒帕茄次碱在此色谱条件下的保留时间分别是 12.9、16.0、20.6 min,且其与相邻杂质峰的分离度大于 1.5,理论塔板数均大于 5 000,色谱图见图 1。



1-蜀羊泉次碱 2-薯蓣皂苷元 3-氢化勒帕茄次碱
1-soladulcidine 2-diosgenin 3-5α,6-dihydroleptinidine

图 1 对照品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的配制:精密称定干燥至恒定质量的蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元、氢化勒帕茄次碱对照品

①收稿日期:2009-08-12
基金项目:辽宁省科技厅资助项目(2007226011);沈阳市科技局攻关项目(1071164-9-00)
作者简介:杨红英(1984—),女,山东省沂水人,在读硕士,主要从事中药质量标准及药动学研究。
*通讯作者 孙立新 Tel:(024)24986365 E-mail:slx04@163.com

5.0、20.0、2.5 mg，置 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得对照品储备液（100 μg/mL 蜀羊泉次碱，400 μg/mL 薯蓣皂苷元，50 μg/mL 氢化勒帕茄次碱）。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 白英中总苷的提取[10]：干燥白英药材粉碎过筛，取药材粉末约 0.8 g，精密称定，置 100 mL 圆底烧瓶中，加入 90%乙醇 25 mL。水浴热回流提取 3 次，每次 1 h，滤过，合并提取液。旋转蒸发至干后 20 mL 水分散，以石油醚等量萃取 3 次，弃去石油醚层。再以水饱和正丁醇等量萃取 3 次，合并萃取液，旋转蒸发至干，得总苷粗品，备用。

2.3.2 白英总苷的水解[11]：总苷粗品以 2 mol/L HCl 溶液 5 mL 混悬，100 ℃水浴水解 3 h，再用氯仿等量回流萃取 3 次，每次 20 min，蒸干氯仿萃取液，残渣定量转移置 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察：分别精密吸取对照品储备液 1、2、3、4、5 mL 置 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，得 3 种成分的系列对照品溶液。吸取各系列对照品溶液 20 μL，在上述色谱条件下进入液相色谱仪分析，测定峰面积，以对照品峰面积（Y）对浓度（X）进行线性回归分析，得蜀羊泉次碱回归方程为 $Y = 3.420 \times 10^3 X - 4.186 \times 10^4$（$r = 0.9994$），线性范围 20～100 μg/mL；薯蓣皂苷元回归方程为 $Y = 1.378 \times 10^4 X - 7.500 \times 10^5$（$r = 0.9993$），线性范围 80～400 μg/mL；氢化勒帕茄次碱回归方程为 $Y = 3.500 \times 10^3 X - 1.680 \times 10^4$（$r = 0.9993$），线性范围 10～50 μg/mL。

2.5 精密度试验：取对照品溶液（蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元、氢化勒帕茄次碱的质量浓度分别为 60、240、30 μg/mL）进样 20 μL，连续进样 6 次，测定峰面积。结果蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元、氢化勒帕茄次碱的 RSD 分别为 1.9%、1.9%、1.7%，结果表明精密度良好。

2.6 重现性试验：取白英干燥药材粉末（No.1，产地西安），按“供试品溶液制备”项下操作平行制备 6 份供试溶液，进样 20 μL，测定峰面积。标准曲线法计算质量分数，结果蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元、氢化勒帕茄次碱的 RSD 分别为 1.8%、2.0%、1.9%，结果表明重现性良好。

2.7 稳定性试验：取供试品溶液，避光放置，按上述色谱条件，分别于 0、2、4、8、12 h 进样分析，蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元、氢化勒帕茄次碱的 RSD 分别为 1.8%、1.9%、1.9%，结果表明 3 种苷元均在 12 h 内稳定。

2.8 回收率试验：采用加样回收实验法，取已测定的白英（No.1，产地西安）干燥药材粉末约 0.4 g（蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元、氢化勒帕茄次碱的量分别为 0.887 0、2.313、0.416 0 mg/g）共 9 份，精密称定，分别加入相当于原药材中各成分量 50%、100%、150%的对照品溶液，每个质量浓度 3 份。按“供试品溶液的制备”项下方法操作，按上述色谱条件测定，计算加样回收率，得蜀羊泉次碱平均回收率为 96.4%，RSD 为 3.0%；薯蓣皂苷元平均回收率为 102.5%，RSD 为 3.4%；氢化勒帕茄次碱平均回收率为 99.3%，RSD 为 3.0%（$n = 9$）。结果表明回收率符合要求，该方法准确度良好。

2.9 样品测定：取 10 个产地的白英干燥药材粉末，按“供试品溶液的制备”项下操作，在上述色谱条件下进样分析，计算质量分数，结果见表 1。

表 1 各产地白英中蜀羊泉次碱、薯蓣皂苷元、氢化勒帕茄次碱测定结果（n = 3）

Table 1 Determination of soladulcidine, diosgenin, and 5α, 6-dihydroleptinidine in S. lyratum (n = 3)

编号	产地	质量分数/(mg·g⁻¹)		
		蜀羊泉次碱	薯蓣皂苷元	氢化勒帕茄次碱
1	西安	0.77	1.99	0.26
2	柳州	0.53	2.02	0.45
3	武汉	0.92	2.84	0.33
4	广西	0.97	2.43	0.58
5	亳州	1.15	2.89	0.61
6	内蒙古	0.65	1.15	0.17
7	江西	0.47	1.36	0.40
8	上海	1.10	1.27	0.67
9	三明	1.27	2.27	0.67
10	河南	0.51	2.12	0.21

3 讨论

不经水解测定苷元量时，氢化勒帕茄次碱量较少，无法准确定量，故采用水解的方法测定。采用 1、2、3 mol/L 的盐酸进行水解，以 2 mol/L 盐酸水解各成分量高。因此采用 2 mol/L 盐酸进行水解。水解后以氯仿回流萃取，各苷元量较高并且杂质较少，回流萃取不易乳化，保证了该方法的准确度。

在甲醇-水，乙腈-水，乙腈-四氢呋喃-水等系统下对色谱条件进行优化。发现在乙腈-四氢呋喃-水系统条件时，各峰与相邻杂质峰完全分离，四氢呋喃使出峰时间变短且峰形更加对称。试用了醋酸、甲酸、三乙胺等改性剂，三乙胺可很好地减少峰拖尾，故最终选用乙腈-四氢呋喃-0.06%三乙胺水溶液系统。

蒸发光散射检测器对没有紫外吸收及紫外吸收弱的皂苷类、萜类及甾体类化合物来说是一种可靠

的检测器。它克服了示差检测器(RID)灵敏度低的问题,且相对质谱(MS)检测器来说运行成本更低,是中药分离分析、质量控制的重要方法之一。

由实验结果发现白英中 3 种苷元的量由大到小依次为薯蓣皂苷元、蜀羊泉次碱、氢化勒帕茄次碱。不同产地的白英药材中 3 种苷元量的差异较大。其中安徽亳州和福建三明的白英中 3 种苷元量均较高,但内蒙古的白英中 3 种苷元量均相对较低。这可能与气候差异有关,南部地区年均温度较高生长期长而使有效成分量增加。

参考文献:

[1] 张民庆. 抗肿瘤中药的临床应用 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1998.

[2] 韩 重, 黄 霁, 何 珉, 等. 白英抗肿瘤成分提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(10):1500-1502.

[3] Helmut R, Andrea P. (23R)-23-Hydroxysoladulcidine and related compounds from *Solanum panduraeforme* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(6): 1607-1609.

[4] Richard F K, Dale C B, William G. Spirosolane-containing *Solanum* species and induction of congenital craniofacial malformations [J]. *Toxicon*, 1990, 28(8): 873-884.

[5] 徐 顺, 王林江, 李瑞玲, 等. 白英全草中挥发油化学成分的分析 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1390-1391.

[6] 孙立新, 李凤荣, 孟 楠, 等. HPLC 法测定中药白英中 16-妊娠双烯酮的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(4): 294-296.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 甄会贤, 齐 烨, 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.

[10] 方幼兰. 芦笋皂苷的提取纯化及其糖基组成 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 446-450.

[11] 季宇彬, 岳 磊, 汲晨锋. RP-HPLC-ELSD 测定芦笋皂苷中菝葜皂苷元的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 32(12): 1236-1238.

RP-HPLC 同时测定不同产地独一味药材中 4 种环烯醚萜苷

樊鹏程[1,2],李茂星[1,2],贾正平[1,2]*,张汝学[1,2],邱建国[1,2],张泉龙[1,2]

(1. 兰州军区兰州总医院 药剂科,甘肃 兰州 730050;2. 国家中医药管理局 临床药学重点学科,甘肃 兰州 730050)

摘 要:**目的** 建立 RP-HPLC 同时测定不同产地独一味药材中 4 种环烯醚萜苷单体量的方法。**方法** 采用 Symmetry C_{18} 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:0～11 min 乙腈-水(11∶89),11～35 min 乙腈-水(11∶89～15∶85)。体积流量:1.0 mL/min,检测波长:235 nm。**结果** 山栀苷甲酯在 5.0～100 μg/mL 线性关系良好,加样回收率为 103.1%,RSD 为 2.0%。螃蟹甲苷 Ⅱ(phloyoside Ⅱ)在 1.0～50 μg/mL 线性关系良好,加样回收率为 97.2%,RSD 为 1.3%。番木鳖苷甲酯在 1.0～50 μg/mL 线性关系良好,加样回收率为 101.3%,RSD 为 1.5%。8-*O*-乙酰山栀苷甲酯在 5.0～100 μg/mL 线性关系良好,加样回收率为 102.8%,RSD 为 1.2%。10 批不同产地独一味药材中山栀苷甲酯量为 0.3%～1.41%,螃蟹甲苷 Ⅱ量为 0.0%～0.45%,番木鳖苷甲酯量为 0.02%～2.3%,8-*O*-乙酰山栀子苷甲酯量为 1.05%～2.95%。**结论** 实验建立的环烯醚萜苷测定方法准确可靠,适于独一味药材中环烯醚萜苷类量的测定。不同产地独一味药材中环烯醚萜苷量存在较大差异。

关键词:RP-HPLC;独一味;环烯醚萜苷

中图分类号:R282.6 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2010)03-0483-03

独一味来源于唇形科独一味属植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的全草或根及根茎,主产于甘肃、西藏、青海、云南、四川等省区,为传统藏药,藏语称“大巴”、“打巴布”或“尕果拉”等。其根及根茎或全草入药,药材表面枯黄色或黄褐色,质坚硬、干枯、气腥臭,是我国藏、蒙、纳西等民族民间常用药之一,具有止血、镇痛消肿、活血化瘀、补髓、行气、续筋骨等功效[1～3]。2005 年版《中国药典》中该药材仅对其中的木樨草素作定量测定[4],未对环烯醚萜苷类成分进行测定。近年来研究越来越集中于其环烯醚萜苷类成分,并有报道其主要活性成分为环烯醚萜苷类成分[5,6],故单纯控制木樨草素的量不能有效控制独一味药材内在质量,以致影响生产相关产品的质量及药材临床应用的安全有效。有报道应用分光光度法测定独一味药材中总环烯醚萜苷的量[7],钱大玮等[8]用 HPLC 法测定了独

①**收稿日期**:2009-06-08

基金项目:兰州军区医药卫生科研基金资助项目(LXH-200409);甘肃省科技攻关项目(2GS054-A43-014-14)

作者简介:樊鹏程(1980—),男,主管药师,硕士,主要从事中药分析研究。E-mail:fpch2001@yeah.net

*通讯作者 贾正平 Tel:(0931)8994652 E-mail:jiazp166@sina.com