

HPLC法测定龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量^Δ

徐建东*, 沈 敏, 李 莹, 陈 萍, 江海平(上海市皮肤病医院药剂科, 上海 200443)

中图分类号 R283.64;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2167-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.19

摘 要 目的:建立测定龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Intersil ODS-3 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水-50 mmol/L Na₂HPO₄ (32:59:3, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 200 nm。结果:澳洲茄碱和澳洲茄边碱的进样量分别在 0.18~5.76、0.203~6.496 μg 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r* 分别为 0.999 5、0.999 9);精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均 < 2%;平均加样回收率分别为 94.76% 和 95.17%, RSD 分别为 1.76% 和 1.57% (*n* 均为 9)。结论:该方法简便、准确, 可用于龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量测定。
关键词 龙葵银屑片; 高效液相色谱法; 澳洲茄碱; 澳洲茄边碱; 含量测定

Content Determination of Solasonine and Solamargine in Longkui Yinxie Tablets by HPLC
XU Jian-dong, SHEN Min, LI Ying, CHEN Ping, JIANG Hai-ping (Dept. of Pharmacy, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of solasonine and solamargine in Longkui yinxie tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Intersil ODS-3 column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water-50 mmol/L Na₂HPO₄ (32:59:3, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 200 nm, and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of solasonine and solamargine 0.18-5.76 μg (*r*=0.999 5) and 0.203~6.496 μg (*r*=0.999 8); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; average recoveries were 94.76% (RSD=1.76%, *n*=9) and 95.17% (RSD=1.57%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: This method is simple and accurate, and could be used to determine the contents of solasonine and solamargine in Longkui yinxie tablets.
KEY WORDS Longkui yinxie tablets; HPLC; Solasonine; Solamargine; Content determination



表2 样品含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of samples

批号	取样量, g	二苯乙烯苷含量, mg/g
20090209	0.501 2	0.839 5
20100110	0.501 6	0.945 2
20100607	0.501 7	1.050 7

圆整, 背景干扰少。

枸杞子的主要指标性成分为甜菜碱, 在其 TLC 鉴别的供试品溶液制备中, 曾参照文献方法^[7]处理点样, 但发现经 TLC 展开后背景颜色较深; 后经多次试验, 选择将样品先采用中性氧化铝柱处理, 再依次采用石油醚、石油醚-乙酸乙酯-乙醇(7:2:1, V/V/V)、乙酸乙酯-甲醇(8:2, V/V)洗脱, 有效地去除了背景的干扰, 且分离效果好。

据文献^[8]报道, 二苯乙烯苷水溶液的稳定性与温度呈负相关; 另有文献^[9]报道, 二苯乙烯苷的提取多采用醇提法。因此, 本研究比较了 60、80 ℃ 环境下样品甲醇提取液中二苯乙烯苷的含量, 结果显示二苯乙烯苷含量在甲醇提取液中随温度变化不大。

Δ 基金项目: 上海市卫生局科研资助项目 (No. 2010Y010A)
* 副主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 药事管理、临床药学、药物分析。电话: 021-61833000。E-mail: xujiandong0607@yahoo.com.cn

综上, 提高后的标准有利于更好地控制麒麟丸的质量。

参考文献

[1] 江秀娟, 梁华伦. 麒麟丸的薄层色谱鉴别[J]. 现代医药卫生, 2009, 25(24): 3 805.
[2] 崔爽, 唐真真, 张秀云. 舒冠胶囊质量标准研究[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2 941.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 70、附录 34.
[4] 马洁珺, 刘骞峰, 沈宁. 橙皮苷提取纯化工艺的优化[J]. 应用化工, 2011, 40(4): 677.
[5] 蒙双鹏, 谢琳, 郭钟慧. 宁心补肾丸质量标准研究[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(5): 43.
[6] 李勇, 何伟, 袁万瑞, 等. 心舒滴丸中丹参水溶性成分提取工艺研究[J]. 食品与药品, 2007, 9(6): 9.
[7] 孟楣, 高家荣, 魏良兵. 薄层色谱法鉴别枸杞子的实验研究[J]. 中国药事, 2007, 21(11): 912.
[8] 鲁坚, 侯双菊, 千梅, 等. 二苯乙烯苷的研究进展[J]. 安徽化工, 2006, 32(3): 10.
[9] 吕丽爽, 汤坚. 何首乌中二苯乙烯苷的醇提工艺[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(10): 132.

(收稿日期: 2012-07-23 修回日期: 2013-01-08)

龙葵银屑片为上海市皮肤病医院自制制剂,由龙葵草、凤尾草、白芷、紫草等药材组成,具有清热解毒、凉血祛风的功效,临床上主要用于治疗进展期银屑病。方中君药龙葵具有清热解毒、活血、利尿、消肿等功效^[1],主治感冒、牙痛、慢性支气管炎、痢疾、乳腺炎和癌症等^[2]。现代药理研究表明,龙葵中主要有效成分澳洲茄碱和澳洲茄边碱均具有抗炎、抗休克、抗过敏、抗肿瘤和提高机体免疫功能^[3-6]等多种药理作用。因此,为了控制龙葵银屑片的质量,使其稳定发挥疗效,本试验建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定该制剂中澳洲茄碱与澳洲茄边碱含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪、色谱数据工作站(美国Agilent公司);BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司);EYELASB-2000型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);BW-1004型超声波清洗器(苏州博德超声波设备有限公司,功率:200 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

龙葵银屑片(上海市皮肤病医院委托上海杏灵科技药业股份有限公司生产,批号:110101、110112、110311);澳洲茄碱、澳洲茄边碱对照品(上海彩佑实业有限公司,批号分别为MUST-12022516、MUST-12010601,纯度均为98%);D101型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司,批号:20100706);乙腈为色谱纯,水为蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Intersil ODS-3(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水-50 mmol/L Na₂HPO₄(32:59:3,V/V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长:200 nm;进样量:10 μl。

2.2 对照品溶液的制备

分别取澳洲茄碱、澳洲茄边碱对照品各适量,精密称定,分别置于5 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即制成每1 ml分别含澳洲茄碱1.80 mg、澳洲茄边碱2.03 mg的2种对照品溶液,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取龙葵银屑片粉末1 g,加95%乙醇超声提取3次(10 ml×3),合并滤液,减压回收至无醇味,浓缩液加水10 ml混悬后上D101型大孔吸附树脂,以20%乙醇100 ml洗脱除杂质,80%乙醇100 ml洗脱生物碱,减压蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至2 ml,经0.45 μm微孔滤膜滤过,备用。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方工艺制备不含龙葵的阴性样品,再按“2.3”项下方法制备阴性对照溶液,备用。

2.5 专属性考察

按上述色谱条件分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μl进样测定,记录色谱图。结果可知,澳洲茄

碱峰的保留时间为9.2 min,澳洲茄边碱峰的保留时间为10.9 min;阴性对照溶液在澳洲茄碱、澳洲茄边碱色谱峰相应位置处无干扰峰出现。色谱见图1。

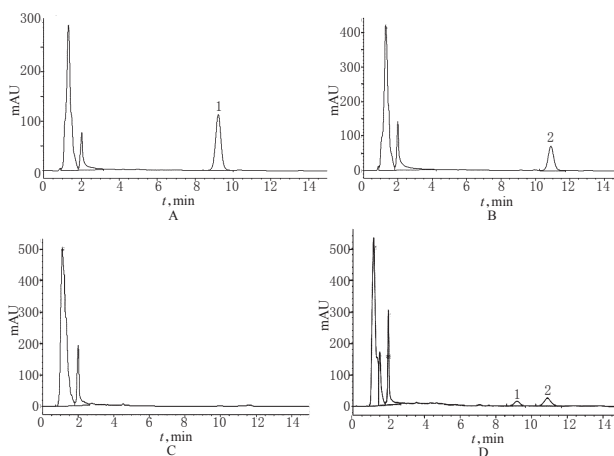


图1 高效液相色谱图

A.澳洲茄碱对照品;B.澳洲茄边碱对照品;C.阴性对照;D.供试品;1.澳洲茄碱;2.澳洲茄边碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A.solasonine control;B.solamargine control; C. negative control; D. test sample; 1.solasonine; 2.solamargine

2.6 线性关系考察

分别精密吸取澳洲茄碱和澳洲茄边碱对照品溶液各0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 ml,分别置于5 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件分别吸取10 μl进样测定,记录峰面积。以对照品进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得澳洲茄碱和澳洲茄边碱的回归方程分别为 $y=301.88x-13.543$ ($r=0.999\ 5, n=6$)、 $y=376.94x-28.676$ ($r=0.999\ 8, n=6$)。结果表明,澳洲茄碱、澳洲茄边碱的进样量分别在0.18~5.76、0.203~6.496 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验

精密吸取2种对照品溶液各适量,按上述色谱条件连续进样5次测定,记录峰面积。结果,澳洲茄碱、澳洲茄边碱的RSD分别为0.21%和0.99% (n 均为5),表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

取同一批次龙葵银屑片,按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,每1 g样品平均含澳洲茄碱0.291 mg、澳洲茄边碱0.389 mg, RSD分别为0.71%、0.35% (n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取同一份供试品溶液10 μl,分别于0、2、4、6、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,澳洲茄碱、澳洲茄边碱的RSD分别为1.20%、0.90% (n 均为7),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.10 加样回收率试验

取同一批次(批号:110112)已知含量的龙葵银屑片1 g,共

9份,每3份为一组,分别精密加入澳洲茄碱、澳洲茄边碱对照品各适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果分别见表1、表2。

表1 澳洲茄碱的加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests of solasonine(n=9)						
序号	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	$\bar{x}$, %	RSD, %
1	286.6	230.0	504.89	94.91	94.76	1.76
2	286.6	230.0	508.21	96.35		
3	286.6	230.0	500.06	92.81		
4	286.6	290.0	563.42	95.46		
5	286.6	290.0	566.78	96.61		
6	286.6	290.0	564.01	95.66		
7	286.6	350.0	622.31	95.92		
8	286.6	350.0	610.58	92.57		
9	286.6	350.0	610.46	92.53		

表2 澳洲茄边碱的加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests of solamargine(n=9)						
序号	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	$\bar{x}$, %	RSD, %
1	375.0	200.0	562.33	93.66	95.17	1.57
2	375.0	200.0	562.44	93.72		
3	375.0	200.0	563.98	94.49		
4	375.0	300.0	659.19	94.73		
5	375.0	300.0	670.83	98.61		
6	375.0	300.0	660.78	95.26		
7	375.0	350.0	711.07	96.02		
8	375.0	350.0	708.92	95.40		
9	375.0	350.0	706.39	94.68		

2.11 样品含量测定

取3批龙葵银屑片(批号:110101、110112、110311)各适量,精密称定,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 3 Results of content determination of samples(n=3)				
批号	澳洲茄碱,mg/g	RSD, %	澳洲茄边碱,mg/g	RSD, %
110101	0.275	0.72	0.374	0.69
110112	0.287	0.55	0.338	0.74
110311	0.307	0.50	0.377	0.53

3 讨论

3.1 流动相与检测波长的选择

笔者在文献^[7-8]基础上考察并比较了甲醇-水、乙腈-水作为流动相的试验结果。由于澳洲茄碱和澳洲茄边碱只在紫外末端波长处有吸收,且含量较低,当流动相为甲醇时,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;乙腈-水系统分离效果虽然较好,但峰形拖尾现象较严重;后在水相中加入Na₂HPO₄,使峰形得到了一定的改善。在考察比较了乙腈-水-50 mmol/L Na₂HPO₄(32:59:3, V/V/V)、乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱:0~5 min, 22% A; >5~20 min, 22%→25% A; >20~25 min, 25% A)、乙腈-0.05%磷酸水溶液(30:70, V/V)作为流动相的结果后,发现采用乙腈-水-50 mmol/L Na₂HPO₄

(32:59:3, V/V/V)作为流动相时,被检测物分离效果佳、出峰时间快,且杂质干扰少。

分别取两种对照品溶液在195~220 nm波长范围内进行紫外扫描,结果发现澳洲茄碱、澳洲茄边碱均在200 nm波长处有最大吸收值,故选择200 nm为检测波长。

3.2 样品提取方法的考察

笔者以澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量为指标,比较了超声法与回流法两种样品提取方法的效果。结果发现,超声提取与回流提取所得样品含量无显著差异,故选择操作相对简单的超声提取法。

试验比较了以50%、75%、95%不同质量分数的乙醇作为提取溶剂的提取效果。结果显示,以95%乙醇提取的澳洲茄碱和澳洲茄边碱含量最高。

试验还比较了龙葵银屑片乙醇提取物直接进样和提取后经D101型大孔吸附树脂除杂后再进样的结果,发现若不经大孔吸附树脂去杂,HPLC图中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的吸收峰附近有干扰,且基线不平稳。综上,选择以10倍体积95%乙醇为溶剂超声提取3次,再以20%乙醇和80%乙醇大孔吸附树脂洗脱的方法提取样品。

3.3 小结

由表3可知,3批样品中澳洲茄碱的平均质量分数为0.029%,澳洲茄边碱的平均质量分数为0.036%。为提高临床疗效,建议龙葵药材入药时应以带未成熟果实的全草为好。

综上,本方法准确、简便、重复性好、精密度高,可用于龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量测定。

参考文献

[1] 杨永年,张海洋.中国龙葵复合种细胞学分析和地理分布的研究[J].植物研究,1994,14(2):20.
[2] 张海洋.中国产龙葵数值分类的研究[J].植物研究,1999,19(2):127.
[3] Son YO, Kim J, Lim JC, et al. Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibit cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cell[J]. *Food Chem Toxicol*, 2003,41(10):1 421.
[4] 谢启梅,谢军荣.龙葵在肿瘤治疗中的运用[J].江西中医药,1996,27(2):52.
[5] 潘伟光,刘宗潮,潘启超,等.中药复方龙葵合剂在动物体内外的抗癌药效[J].癌症,1996,15(6):438.
[6] 刘为为,刘延庆,戴小军.龙葵抗肿瘤作用的研究进展[J].中药材,2009,32(3):462.
[7] 李明慧,丁岗,孟兆青,等.龙葵药材中澳洲茄碱、澳洲茄边碱的含量测定[J].中国天然药物,2007,5(5):360.
[8] 袁海建,安益强,陈彦,等.高效液相色谱法测定龙葵中澳洲茄碱的含量[J].中华中医药杂志,2009,24(1):96.

(收稿日期:2013-03-04 修回日期:2013-05-10)