

甾体生物碱定量分析方法的研究进展

杨炳友, 许振鹏, 刘艳, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 甾体生物碱是天然甾体的含氮衍生物,在化学特性和生物活性方面具有甾体类和生物碱类化合物的双重属性。甾体生物碱是贝母、黄杨、藜芦、龙葵等传统中药中的主要药效成分,并且也存在于马铃薯、蕃茄、茄等常用食物中。现代药理学研究表明,甾体生物碱类成分在抗肿瘤、心血管系统、抗菌、杀虫等方面具有很强的活性,同时也具有较强的毒性。甾体生物碱因其结构的特殊性,对其定量分析造成一定难度。对1998—2017年相关文献中甾体生物碱类成分的定量分析方法进行综述,其中应用于甾体生物碱总含量的测定方法主要有分光光度法-酸性染料比色法、酶联免疫吸附法、滴定法等;特定甾体生物碱的含量普遍采用高效液相色谱法,主要包括HPLC-UV, HPLC-ELSD, HPLC-MS和HPLC-CAD等。本文对近20年甾体生物碱定量分析的相关研究进行了归纳,并对各种含量测定方法的优势和局限性加以总结,以促进对相关中药质量以及相关食物安全性控制方法的改进和提升,同时也为甾体生物碱类成分以及相关中药的进一步开发利用提供分析方法方面的参考。

[关键词] 甾体生物碱; 含量测定; 高效液相色谱法; 酸性染料比色法

[中图分类号] R284.1; R284.2; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0221-14

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181311

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.0846.002.html>

[网络出版时间] 2018-04-12 10:24

Research Progress on Quantitative Analysis Methods of Steroidal Alkaloids

YANG Bing-you, XU Zhen-peng, LIU Yan, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] Steroidal alkaloids are nitrogenous derivatives of natural steroids, with dual properties of steroids and alkaloids in chemical properties and biological activities. Steroidal alkaloids act as the main pharmacodynamic components of *Fritillaria*, *Buxus sinica*, *Veratrum nigrum*, *Solanum nigrum*, and other traditional Chinese medicines, and they are also found in some common foods such as potatoes, tomatoes and eggplants. Modern pharmacological studies have shown that steroidal alkaloids are highly active in anti-tumor, cardiovascular system, antibacterial, insecticidal and other activities, but also had high toxicity. The quantitative analysis of steroidal alkaloids is difficult because of its particularity of structure. In the review of quantitative analysis methods for steroidal alkaloids in the literature from 1998 to 2017, the methods for determining total content of steroid alkaloids mainly included spectrophotometry-acid dye colorimetry, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and titration. High performance liquid chromatography (HPLC) was generally used in the quantitative analysis of specific steroid alkaloids, mainly including HPLC-UV, HPLC-ELSD, HPLC-MS and HPLC-CAD. In this paper, the related studies on the quantitative analysis of steroid alkaloids in the past 20 years were summarized, and the advantages and limitations of the various methods were analyzed, in order to improve and promote the control methods for the quality of related traditional Chinese medicines and the safety of related

[收稿日期] 20171208(001)

[基金项目] 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(yjscx2017053)

[第一作者] 杨炳友, 博士, 教授, 从事中药及复方药效物质基础研究, Tel: 0451-87267038, E-mail: ybywater@163.com

[通信作者] * 匡海学, 博士, 教授, 从事中药及复方药效物质基础研究, Tel: 0451-87267188, E-mail: hxkuang@yahoo.com

foods, and provide a reference on the analysis methods for the the further development and utilization of steroidal alkaloids and related traditional Chinese medicines.

[Key words] tetrahydroisoquinoline alkaloid; content determination; HPLC; acid dye colorimetry

甾体生物碱是天然甾体的含氮衍生物,根据甾体母核含碳数不同,甾体生物碱可以分为孕甾烷(C_{21})生物碱、环孕甾烷(C_{24})生物碱、胆甾烷(C_{27})生物碱^[1]。目前研究主要集中于胆甾烷生物碱和环孕甾烷生物碱,其中关于胆甾烷生物碱的研究最为广泛。

胆甾烷生物碱按其骨架类型又可分为胆甾烷类生物碱和异胆甾烷类生物碱。胆甾烷类生物碱主要

分布在茄科(Solanaceae)茄属(*Solanum*)植物中,在番茄属(*Lycopersicon*)和枸杞属(*Lycium*)等其他茄科植物以及百合科(Liliaceae)植物中也较为常见,代表化合物澳洲茄胺,澳洲茄碱,澳洲茄边碱。异胆甾烷类生物碱主要分布于百合科贝母属(*Fritillaria*)和藜芦属(*Veratrum*)植物中,代表化合物贝母素甲,贝母素乙。环孕甾烷生物碱主要分布于黄杨科黄杨属植物中,代表化合物环维黄杨星 D^[1-2]。见图 1。

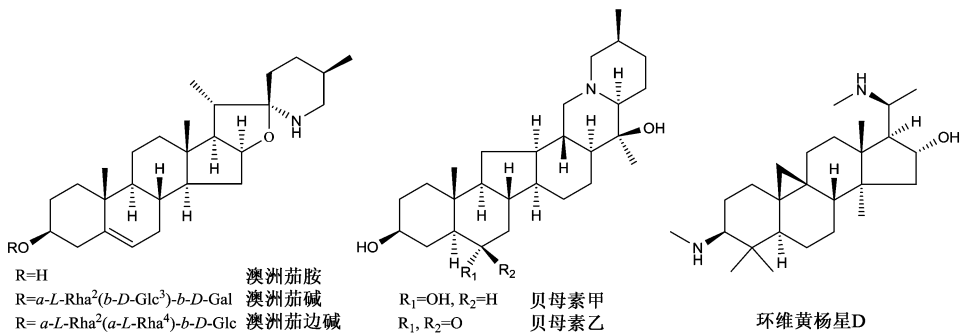


图 1 甾体生物碱代表化合物

Fig.1 Representative compounds among steroidal alkaloids

甾体生物碱在化学特性和生物活性方面具有甾体类和生物碱类化合物的双重属性。甾体生物碱同大多数其他生物碱一样,生物活性突出,同时与其他甾体类化合物具有类似的药理作用。

贝母、黄杨(*Buxus sinica*)是临床常用中药,其主要药效成分是甾体生物碱^[1]。藜芦(*V. nigrum*)属于传统中药,藜芦属植物在其他许多国家民间也被广泛应用,藜芦属植物中所含有的甾体生物碱在 1950 年代在美国被开发成抗高血压药物使用,但因其治疗剂量和中毒剂量难以控制而被终止使用^[3]。龙葵(*Solanum nigrum*),白英(*S. lyratum*)等茄属植物均具有清热解毒、祛风利湿的作用,在国内外民族医药学中普遍用于风湿性关节炎、疮痍肿痛、癌症等炎性和免疫性疾病的治疗^[4]。大量研究发现茄属植物中含有大量的胆甾烷类生物碱并具有广泛的抗肿瘤、抗菌、杀虫、抗炎等作用^[5]。同时甾体生物碱普遍具有毒副作用,某些胆甾烷类生物碱会影响胃消化和造成神经代谢紊乱,浓度较高时能致人死亡^[6]。这也是食用茄科食物马铃薯(*S. tuberosum*)和番茄(*L. esculentum*)等中毒的根源。

21 世纪初,HPLC 便成为中药成分含量测定的重要手段并被广泛应用。甾体生物碱具有甾体母核,极性偏小,且鲜有共轭体系;同时具有一定的碱性,与酸性硅醇基具有较强的相互作用。甾体生物碱的这些特点限制了 HPLC 在特定甾体生物碱类成分含量测定研究中的应用,从而在一定程度上限制了该类具有多方面显著活性成分的进一步开发和利用。随着各种 HPLC 检测器的出现和改进,特别是各种适用于碱性化合物分析的 HPLC 色谱柱的出现及其性能的不不断提升,实现了 HPLC 对甾体生物碱类成分的有效分析。同时,在甾体生物碱总含量的测定方法也取得一定进展。本文对近 20 年甾体生物碱定量分析的相关研究进行了归纳,并对各种含量测定方法的优势和局限性加以总结,为甾体生物碱类成分的定量分析研究提供参考,同时为更适用于甾体生物碱的含量测定方法的开发提供借鉴,从而实现甾体生物碱类成分更为准确、快速、高效的定量分析,这对于贝母、黄杨、龙葵等中药及其制剂的质量控制及其药效学研究,以及马铃薯、番茄等食物及其加工品的安全性调控具有重要的意义。

1 总生物碱的含量测定方法

甾体生物碱既具有生物碱类化合物的通用属性,和其他类型生物碱相比也具有其特殊性。因此,甾体生物碱总成分的含量测定方法与总生物碱的常规含量测定方法具有一致性,但是在具体方法上又有所区别。用于甾体生物碱总成分含量测定的方法主要包括化学分析法和分光光度法,此外还有酶联免疫吸附法等,其中最为常用的是分光光度法结合酸性染料比色法。

1.1 化学分析法 用于生物碱类成分含量测定的化学分析法包括质量分析法和滴定法。这两种方法成本低廉、操作简单。

1.1.1 质量法 崔建国等^[7]采用酸碱法和溶剂萃取对白英全草中脂溶性和水溶性生物碱进行提取并采用质量法测得其质量分数分别为 0.277 0%, 1.009 5%,总生物碱质量分数为 1.286 5%。该方法准确性不高,其准确性取决于生物碱的提取纯化工工艺,因此该方法仅可作为对总生物碱含量的估测。

1.1.2 滴定法 该方法根据其具体实验方法的不同又可分为酸碱滴定法、酸性染料两相滴定法、非水滴定法、安培滴定法等,其原理都是利用了生物碱具有碱性的性质。

王晓静^[8]采用酸碱滴定法对川贝母总生物碱进行了含量测定,由于甾体生物碱碱性较弱,故研究者增强待测样品碱性。对于像甾体生物碱这样的弱碱性生物碱,因其在水溶液中进行滴定时往往没有明显的滴定突跃,故常选择两相滴定法。王安行等^[9]采用酸性染料两相滴定法对不同加工方法的浙贝母总生物碱的含量进行测定。该方法的原理为在适当的 pH 中,生物碱(B)可以与氢离子结合成生物碱盐阳离子(BH⁺),此时的酸性染料(HIn)则成阴离子(In⁻)存在,此阴阳离子能定量地结合成有色离子对,而溶于某些有机溶剂,因此水相没有颜色,在达到终点后,染料留在水相,使之显出颜色。所以控制适当的 pH 是其准确测定的关键。刘丽萍等^[10]采用非水滴定法结合电位滴定法测定黄杨宁片中生物碱的含量。采用非水滴定法往往难以找到合适的指示剂指示终点,或虽有指示剂但终点变化不明显,本研究采用电位滴定法,与指示剂滴定法比较,滴定终点客观可靠、准确度高,可避免溶液有色、浑浊导致的误差。

1.2 分光光度法^[11] 分光光度法在进行含量测定常规的检测方法之一,该方法取样量小、准确度高、重复性好、易于推广普及。甾体生物碱部分具有 α ,

β -不饱和酮、双键和芳香等功能基的化合物具有紫外吸收,大多数结构类型对紫外-可见光均没有吸收。所以通常使用某些试剂与甾体生物碱反应使其对一定波长的光具备吸收能力后,再通过分光光度法对其进行含量测定。最为常用的反应试剂为磺酞类酸性染料,也有研究采用甲醛作为反应试剂。

以酸性染料作为反应试剂,其比色法原理与酸性染料两相滴定法相同,只是用有机溶剂将生物碱-酸性染料离子对萃取后,通过分光光度计测定吸光度,从而得到生物碱含量。这样可以消除滴定终点不明确而带来的误差。影响该法灵敏性和准确性的关键因素有,酸性染料的选择及其用量,水相最佳 pH,提取溶剂的选择,水分的影响,染料中有色杂质的混入。

酸性染料的选择及其用量是影响测定灵敏度和准确性的重要因素。要求酸性染料与生物碱定量结合,并且结合的离子对在有机相中有较大的溶解度,同时在特定波长下有较强的吸收,而酸性染料在有机溶剂中不溶或很少溶解。甾体生物碱含量测定常用酸性染料为溴甲酚绿和溴麝香草酚蓝,此外也有使用溴酚蓝者,均为磺酞类染料(R-SO₃H),通过该类染料分子中所含有的磺酞基(-SO₃H)与生物碱结合成有色离子对。溴麝香草酚蓝-甾体生物碱离子对被有机溶剂提取的效率极高,但是在三氯甲烷中的稳定性不如溴甲酚绿-甾体生物碱离子对,且溴麝香草酚蓝在测定波长附近的空白吸收较大,故在甾体生物碱定量分析中采用溴甲酚绿者相对较多。增加染料浓度可以提高测定灵敏度,但如果太高,易产生乳化层,不易去除,而影响测定结果^[12-13]。故应对对照品与染料配比进行筛选,对染料用量进行控制,以保证最大浓度待测样品能够充分与染料结合,而又不产生乳化层,从而保证测定结果的灵敏性和准确性。

水相 pH 选择也极为重要。只有在合适的 pH 条件下,生物碱均成阳离子(BH⁺),同时酸性染料形成足够的阴离子(In⁻),阴阳离子才可以定量反应生成离子对,并且能全部溶于有机溶剂中,而过量的染料(In⁻)完全保留在水相中,以保证比色法测定的准确性。冯芳等^[14]采用酸性染料比色法测定了黄杨宁含量,结果准确度与非水滴定法无显著性差异,但是其灵敏度较之非水滴定法增加约 300 倍。在本研究中,研究者发现在 pH 4.0 ~ 5.03,黄杨宁-溴麝香草酚蓝离子对形成程度较大,当 pH 进一步增大,离子对形成程度减小,故选用 pH 4.5 磷酸盐

缓冲液作为测定用 pH 控制液。在通过该方法对甾体生物碱进行含量测定中,采用最多的是邻苯二甲酸氢钾与氢氧化钠组合的 pH 缓冲液。

对于甾体生物碱而言,三氯甲烷是较理想而最为常用的溶剂,也有研究采用二氯甲烷作为有机溶剂^[15];水分混入有机溶剂中,一方面水相中有色染料会影响测定结果,另一方面水的混入会使有机溶剂层混浊而影响比色测定,通常加入少量无水硫酸钠轻微震荡以脱去有机溶剂中可能混入的水分^[12-13];染料中有色杂质混入提取溶剂中将使测定结果受到干扰,为

了获得准确结果,可以将缓冲液与染料的混合液先用有机溶剂除去杂质后再依法测定。

川贝母和平贝母中含有多种甾体生物碱,且每种含量均较低,仅采用一个或两个成分难以合理评判药材的质量。故 2015 年版《中国药典》采用分光光度法-酸性染料比色法测定其甾体总生物碱含量作为其质量控制方法^[16]。该法是目前测定甾体总生物碱含量最为常用、可靠的方法。表 1 中列举了部分具有代表性的利用该法对甾体生物碱总成分进行含量测定的具体检测条件。

表 1 分光光度法-酸性染料比色法测定甾体生物碱总含量的检测条件比较

Table 1 Comparison for spectrophotometry-acid dye colorimetry detection conditions of total content of steroidal alkaloids

样品	反应试剂	缓冲液类型及其 pH	检测波长/nm	对照品及其线性范围	参考文献
平贝母	溴甲酚绿	乙酸钠-乙酸, pH 5.0	390	贝母素乙, 5 ~ 20 mg·L ⁻¹	[17]
平贝母	溴麝香草酚蓝	邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠, pH 4.2	413	贝母素乙, 32 ~ 513 mg·L ⁻¹	[18]
浙贝母	溴麝香草酚蓝	邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠, pH 5.0	412	贝母素乙, 1.84 ~ 6.44 mg·L ⁻¹	[19]
浙贝母	溴甲酚绿	邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠, pH 4.5	618.5	浙贝甲素, 1.856 ~ 11.136 mg·L ⁻¹	[20]
川贝母	溴甲酚绿	磷酸二氢钾-氢氧化钠	414	西贝母碱, 19.96 ~ 199.6 mg·L ⁻¹	[21]
黄杨宁粗品	溴麝香草酚蓝	磷酸盐, pH 4.5	420	黄杨宁, 1.6 ~ 8.0 mg·L ⁻¹	[22]
黄杨宁软胶囊	溴甲酚绿	磷酸二氢钠-磷酸, pH 3.5	414	黄杨宁, 1.0 ~ 8.0 mg·L ⁻¹	[12]
白英全草	溴甲酚绿	邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠	412	澳洲茄胺, 1.6 ~ 9.6 mg·L ⁻¹	[23]
白英总碱部位	溴酚蓝	磷酸氢二钠-枸橼酸, pH 4.0	408	澳洲茄碱, 48.96 ~ 130.56 mg·L ⁻¹	[24]

在酸性条件下糖苷生物碱与甲醛形成稳定的紫红色络合物,其颜色深浅与含量呈正相关。对于茄属大多数植物,所含有的甾体生物碱类成分基本均为糖苷生物碱,故可采用该法对其生物碱总含量进行测定^[25-26]。但是其线性关系远不如以酸性染料作为反应试剂的含量测定。王旺田等^[25]以甲醛作为显色试剂采用分光光度法对马铃薯块茎中糖苷生物碱进行测定,其回归方程的相关系数为 0.991 6,而采用酸性染料作为显色试剂,通常均可大于 0.999。

1.3 酶联免疫吸附法 马铃薯、西红柿、茄子是人们日常生活中重要的食物,枸杞作为一种药食同源的中药也被广泛食用。然而这些食物中均含有甾体生物碱,一定量的甾体生物碱会使人中毒甚至死亡。研究表明马铃薯中所含有的糖苷类生物碱具有致畸作用和胚胎毒性,高浓度可能会引起急性中毒,包括胃和神经系统的紊乱,甚至因对中枢神经系统的过度抑制而造成死亡^[27]。因此,对食物中甾体生物碱类成分的含量控制对食品安全和人类健康具有重要的意义。常规的检测方法具有仪器昂

贵、操作繁琐等弊端,所以研究者开发出多种用于糖苷生物碱含量测定的酶联免疫吸附法^[28-30],该方法操作简单,可以实现糖苷生物碱含量的快速测定。但是该方法准确性较差,难以用于成分含量的准确测定。

1.4 其他 龙葵、白英等茄属药材中的甾体类生物碱主要是由以澳洲茄胺为苷元的生物碱组成。蒋新宇等^[31]采用醇提-酸醇水解法将龙葵内生物碱转化为澳洲茄胺提取出来,采用 HPLC-UV 法在 210 nm 下对澳洲茄胺进行含量测定,以此表征龙葵中甾体类生物总碱的含量。由于澳洲茄碱和澳洲茄边碱的苷元均为澳洲茄胺,故彼此间存在着——对应的化学计量比关系,所以,以澳洲茄胺作为龙葵总生物碱含量评判指标是可行并且可靠的。

2 特定甾体生物碱的含量测定方法

甾体生物碱具有弱碱性,并且大多数结构中无共轭体系,所以相对一般种类化合物或其他大多数生物碱而言,对其含量测定方法具有更高的要求。用于特定甾体生物碱含量测定的方法主要包括薄层色谱法(TLC)和高效液相色谱法(HPLC)。

2.1 TLC TLC 应用于甾体生物碱类成分的含量测定研究较少^[32-34],其检测灵敏度低,并且扫描定量时需用显色剂显色,影响方法重复性,精密度低。近些年,随着高效薄层色谱(HPTLC)的出现,其灵敏度和分辨率大大提高,也有研究采用 HPTLC 用于甾体生物碱的定量分析研究^[35-37],但是其各方面性能远不及 HPLC,故将其应用于甾体生物碱定量分析很少。但是薄层色谱法具有较好的分离度、方法条件的选择更加灵活,并且具有操作简便、速度快、分析样品量大等优点,因此被广泛应用于定性分析,一直作为各种贝母、黄杨及茄属等含甾体生物碱类成分中药的常用质量控制方法。

2.2 HPLC 随着新的分析仪器及其方法的出现和发展,才得以实现更为准确的定量分析。目前国内市售的环维黄杨星 D 按照 2015 年版《中国药典》规定的非水滴定法^[16]测定,其质量分数均可达到 99.0%,而采用 HPLC-UV^[38]和 HPLC-FLD^[39]测得质量分数低于 90%。环维黄杨星 D 从黄杨属植物中提取精制所得,含有其他与之结构相似的甾体生物碱。故非水滴定法作为一种总生物碱的测定方法,难以测得环维黄杨星 D 的准确含量。同时研究者采用 HPLC-MS^[40]发现非水滴定法中加入的醋酐与环维黄杨星 D 发生了反应,生成了环维黄杨星 D 的乙酰化产物,也导致其结果的不准确性。HPLC 及其各种检测器的出现实现了多成分的同时定量分析。近 20 年,随着 HPLC 及其色谱柱和各种相应检测器的发展、改进,在众多研究者的不断摸索和努力下,高效液相色谱法成为特定甾体生物碱分析最为高效、可靠的方法。李松林等^[41]曾对甾体生物碱的定量分析方法进行综述,但是由于甾体生物碱结构及其性质的特殊性,在此之前,高效液相色谱的高效优势未能在甾体生物碱的分析中得到充分发挥。

甾体生物碱类成分因其所含糖基和取代基的变化导致其结构多样,从而对其分析也造成了一定难度,在白英、龙葵等茄属植物中,澳洲茄碱和澳洲茄边碱是其主要的甾体生物碱。这两个生物碱苷元相同,并且均在 C-3 位连接了 3 个糖基,其差别仅在于其中一个糖基及其连接位置的差异(图 1),然而这种差异对其色谱行为影响较小,所以这两种生物碱在高效色谱分析中常会重叠,甚至呈现单峰。又如 α -茄碱和 α -卡茄碱是马铃薯中两种最主要的糖苷生物碱,大约共占马铃薯中糖苷生物碱质量分数的 95%。这两种生物碱结构及其相近,也难以分开^[42]。虽然这些甾体生物碱结构很相近,但是其药

理作用可能有很大差异,所以实现对这些甾体生物碱的有效分析对其质量控制,以及对其进一步的药理研究具有重要的意义。

根据 HPLC 对甾体生物碱分析时所使用固定相性质及其流动相组成及极性不同,其分析模式主要有正相色谱法和反相色谱法,采用正相色谱法对甾体生物碱的定量研究集中于早期,有研究者对二者进行对比研究^[43-44],综合比较合理性、准确性、灵敏度、色谱行为、耐用性和实用性各方面,反相色谱法相比正相色谱法更具优势。因此,目前用于甾体生物碱类成分含量测定的研究均采用反相色谱法。根据检测器原理的不同,应用于甾体生物碱分析的高效液相色谱法主要有 HPLC-UV, HPLC-ELSD, HPLC-MS。

2.2.1 HPLC-UV 该方法所使用的检测器包括普通紫外检测器(UV)和二极阵列检测器(PDA, PDAD 或 DAD)。通常 DAD 检测器的灵敏度相比 UV 较差,所以单纯用于含量测定或杂质检查时,采用 UA 检测器为好。该方法需要样品具有紫外吸收能力,某些甾体生物碱含有双键,具有末端吸收,可以采用末端检测方法对其进行测定。该方法通常使用乙腈作为流动相的有机相,而不用甲醇,以避免甲醇末端吸收对含量测定的影响,见表 2。除此之外,也可以采用柱前衍生化法,见表 3,在较大波长处进行测定,从而避免溶剂末端吸收的影响,然而该方法处理步骤较复杂、增加了样品的前处理时间,衍生化过程又引入许多影响定量分析的因素,所以较少采用。但是对于某些对紫外没有任何吸收的甾体生物碱,需要采用柱前衍生化法使其能够被紫外检测器检识。

目前工艺生产的黄杨宁片原料中除含有主成分环维黄杨 D 外,还包含环黄杨碱 D,环常绿黄杨碱 C 等多个与之结构相近的生物碱成分。有的甾体生物碱如环维黄杨星 D 仅有紫外末端吸收,有的对紫外无任何吸收。在采用柱前衍生化法对黄杨宁片中环维黄杨星 D 含量进行测定时,通常以异氰酸苯酯作为衍生化试剂,但是异氰酸苯酯仅能与仲胺发生衍生化反应,故不能检出无仲胺结构的杂质。杨晨等^[57]采用 HPLC-UV 对黄杨宁片中所含有的环维黄杨星 D 及其他甾体生物碱杂质的含量进行了分析研究,采用对甲苯磺酰氯作为衍生化试剂,可以使无仲胺结构的甾体生物碱也能够被检识。

2.2.2 HPLC-ELSD 由于大部分生物碱中少有共轭体系,仅有部分结构含有双键,可在 200 nm 附近

表 2 HPLC-UV 末端吸收法测定甾体生物碱含量的检测条件比较

Table 2 Comparison for end absorption HPLC-UV detection conditions of content of steroidal alkaloids

样品	色谱柱型号	流动相	检测波长 /nm	测定成分及其线性范围	参考文献
浙贝母	Xterra RP ₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-10 mmol·L ⁻¹ 碳酸氢铵 (梯度洗脱)	210	贝母素甲 1.09 ~ 4.36 μg, 贝母素乙 1.04 ~ 4.16 μg	[45]
太白贝母、暗紫贝母	Agilent TC-C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	甲醇-乙腈-0.02% 三乙胺水溶液 (3.5:67.5:29.0)	205	贝母辛 51.125 ~ 818.0 μg, 西贝母碱苷 80.4 ~ 804.0 μg, 贝母素甲 41.5 ~ 415.0 μg, 贝母素乙 10.2 ~ 204.0 μg	[46]
环维黄杨星 D 原料	Apollo C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-5 mmol·L ⁻¹ 庚烷磺酸钠水溶液 (含 0.15% 三乙胺, 磷酸调节 pH 3.1) (27:73)	203	环维黄杨星 D 120 ~ 720 μg	[38]
黄杨宁原料药	Lichrospher-NH ₂ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-0.4% 磷酸氢二钾溶液 (70:30)	210	环维黄杨星 D 20 ~ 1 000 μg	[47]
藜芦	Venusil XBP-C ₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm)	乙腈-水-三乙胺 (32:68:0.03)	220	藜芦新碱 0 ~ 2 000 μg	[48]
藜芦	Sciencome Kromasil C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-水-三乙胺 (52:48:0.03)	230	藜芦胺碱 0 ~ 40 μg	[49]
龙葵	Zorbax SB-C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-1% 磷酸 (梯度洗脱)	205	澳洲茄碱 0.860 ~ 10.320 μg, 澳洲茄边碱 0.726 ~ 8.710 μg, 客西茄碱 0.696 ~ 8.352 μg	[50]
龙葵	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-2 mmol·L ⁻¹ 磷酸氢钠水溶液 (39:61)	203	澳洲茄碱 0.395 ~ 6.32 μg, 澳洲茄边碱 0.40 ~ 6.40 μg	[51]
水茄	Dionex C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (15:85)	250	澳洲茄碱 2 ~ 80 μg	[52]
马铃薯	Zorbax-Rx (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-25 mmol·L ⁻¹ 磷酸三乙胺溶液 (梯度洗脱)	205	α-茄碱 5 ~ 100 μg, α-卡茄碱 10 ~ 500 μg	[53]
茄	Waters Nova-pak C ₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 4 μm)	乙腈-0.05 mol·L ⁻¹ 磷酸二氢钾 (1% 磷酸调 pH 4.5) (70:30)	205	α-茄碱 150 ~ 3 000 μg	[54]
番茄	Inertsil ODS-3v (4.0 mm × 50 mm, 5 μm)	乙腈-20 mmol·L ⁻¹ 磷酸二氢钾 (24:76)	208	去氢番茄碱苷 2 ~ 20 μg, α-番茄碱 10 ~ 120 μg	[55]
野扇花	Zorbax SB-C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	甲醇-乙腈-1.7% 二乙胺 (磷酸调 pH 7.5) (40:22:38)	214	野扇花碱 D 0.195 5 ~ 0.997 5 μg	[56]

产生吸收。采用 HPLC-UV 末端吸收法定量测定, 紫外末端检测灵敏度低, 同时也会受溶剂等紫外末端吸收的干扰; 而采用经衍生化后再用紫外检测器进行含量测定的方法, 操作繁琐, 杂质干扰多。使用蒸发光散射检测器 (ELSD) 可以有效解决这些问题。ELSD 是一种质量型检测器, 分离度好, 样品制备简便, 重复性好, 在高沸点物质和对紫外没有吸收的化合物定性定量分析上具有独特的优势, 因此被普遍应用于甾体生物碱类成分的定性和定量分析。LI 等^[62] 利用该法对浙贝母、湖北贝母、紫花鄂北贝母、川贝母、新疆贝母中的 6 种主要甾体生物碱进行了含量测定, 其中贝母素甲、异贝母碱、鄂贝定碱结构中无任何不饱和键, 无紫外吸收, 采用该法对其进行

含量测定简便、可靠。CONG 等^[63] 采用 HPLC-ELSD 对藜芦生品及其炮制品中的甾体生物碱类成分进行了对比, 采用 Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 以乙腈-0.03% 三乙胺水溶液为流动相梯度洗脱, 共检测到 10 种甾体生物碱, 并对其含量测定, 所有成分在测试范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999 0$), 并且具有良好的重复性和稳定性。该方法的其他具体应用见表 4。

使用该方法进行定量分析时, 除选择合适的色谱柱和流动相外, 漂移管温度和雾化气体流量对测定精密度及成分含量也会产生较大影响。崔颖等^[70] 采用 HPLC-ELSD 法对黄杨宁滴丸中环维黄杨星 C 进行含量测定时, 对 ELSD 的操作参数进行了筛

表 3 HPLC-UV 柱前衍生化法测定甾体生物碱含量的检测条件比较

Table 3 Comparison for pre-column derivatization HPLC-UV detection conditions of content of steroidal alkaloids

样品	衍生化试剂	色谱柱型号	流动相	检测波长 /nm	测定成分及其线性范围	参考文献
平贝母	2, 4-二硝基苯肼	Symmetry C ₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-100 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵水溶液 (43:57)	375	贝母乙素 0.009 838 ~ 0.081 98 μg	[58]
浙贝母、东贝母、黄炉贝、松贝	2, 4-二硝基苯肼	Hypersil C ₁₈ ODS2 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-100 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵水溶液 (41:59)	375	贝母乙素 0.095 ~ 76 μg	[59]
黄杨宁片	异氰酸苯酯	Lichrospher C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	甲醇-水 (83:17)	240	环维黄杨星 D 3.73 ~ 23.03 μg	[60]
黄杨宁片	异氰酸苯酯	ZORBAX SB-C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm)	甲醇-水 (83:17)	242	环维黄杨星 D 2 ~ 400 μg	[61]
黄杨宁片	甲苯磺酰氯	Waters Xterra C ₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-0.01% 甲酸水溶液 (71:29)	230	环维黄杨星 D 及其杂质 0.10 ~ 3.06 μg	[57]

表 4 HPLC-ELSD 测定甾体生物碱含量的检测条件比较

Table 4 Comparison for HPLC-ELSD detection conditions of content of steroidal alkaloids

样品	色谱柱型号	流动相	所测成分及其线性范围	参考文献
伊贝母	Kromsil C ₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm)	乙腈-水-二乙胺 (70:30:0.1)	西贝母碱 8.3 ~ 83.0 μg, 西贝母碱苷 11.8 ~ 118.0 μg	[64]
浙贝母	Xterra RP ₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-10 mmol·L ⁻¹ 碳酸铵水溶液 (梯度洗脱)	浙贝母碱 0.12 ~ 24.0 μg, 贝母素乙 0.13 ~ 26.0 μg, 浙贝宁 0.16 ~ 31.0 μg	[65]
炉贝母	Comatex C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-0.02% 三乙胺水溶液 (梯度洗脱)	贝母辛 2.75 ~ 9.625 μg, 贝母素乙 1.5 ~ 9.0 μg	[66]
湖北贝母、紫花鄂北贝母	Unitary C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	乙腈-0.05% 二乙胺水溶液 (梯度洗脱)	贝母素甲 0.183 ~ 5.84 μg, 贝母素乙 0.070 ~ 4.48 μg, 贝母辛 0.087 5 ~ 2.80 μg, 湖贝甲素 0.0816 ~ 5.22 μg	[67]
蛇胆川贝液	Agilent SB C ₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-水-二乙胺 (70:30:0.03)	贝母素甲 0.060 ~ 2.406 μg; 贝母素乙 0.071 ~ 2.812 μg	[68]
黄杨宁片	Agilent Zorbax Extend C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	0.3% 二乙胺甲醇溶液-0.3% 二乙胺水溶液 (梯度洗脱)	环维黄杨星 D 0.572 ~ 11.44 μg	[69]
黄杨宁滴丸	Dikma Dimaonsil C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	甲醇-甲酸铵 (38:62)	环维黄杨星 D 10 ~ 22 μg	[70]
藜芦	岛津 ODS-C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 4 μm)	乙腈-0.1% 三乙胺水溶液 (50:50)	藜芦碱 0.36 ~ 3.6 μg	[71]
白英	Elite-ODS C ₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm)	乙腈-0.02% 三乙胺水溶液 (56:44)	碱苷 A 0.4 ~ 4.0 μg	[72]

选,当漂移管温度为 95 ℃ 时,由于流动相气化尚不完全,精密度和含量结果都很差,其筛选出的最优参数为漂移管温度 105 ℃,雾化气体流量 2.7 L·min⁻¹。

近些年,高效液相色谱发展迅速,超高效液相 (UPLC) 相比 HPLC 的性能有了显著提升。段宝忠等^[73] 通过 UPLC-ELSD 同时测定伊贝母中西贝母碱和贝母辛的含量,相比 HPLC 减少了分析时间和溶剂消耗,提高了灵敏度和分离效率。

2015 年版《中国药典》中伊贝母、浙贝母、湖北贝母均采用 HPLC-ELSD 法测定所含甾体生物碱成分含量^[16],从方法的可靠性、方便性以及仪器价格等因素考虑,作为通用的质量控制手段,HPLC-ELSD 法是目前测定特定甾体生物碱类成分含量最为合适的方法。该方法也有其限制性。采用 HPLC 对甾体生物碱类成分进行分析,往往需要在流动相中添加某些改性剂以获得较好的色谱峰,但是磷酸、

磷酸二氢钾等难挥发性物质不可用于 HPLC-ELSD 法。

2.2.3 HPLC-MS HPLC-MS 具有高分离能力、高灵敏度、应用范围广和极强的专属性等特点,成为目前检测甾体生物碱较为先进的分析技术之一。

HPLC-MS 因其极高的灵敏度,对生物样品中痕量成分的含量测定具有其他方法无法比拟的优势。Gaillard 等^[3]在两名死者的胃中发现存在大量藜芦属植物的种子,采用液质联用技术对其血液中甾体

生物碱藜芦定和藜芦碱进行定量分析,两名死者血液中藜芦定质量浓度分别为 0.17, 0.40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 藜芦碱质量浓度分别为 0.32, 0.48 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 藜芦定和藜芦碱的过量摄入会导致中毒甚至死亡,从而推测其致死原因是因为使用了过量藜芦属植物。液质联用技术被广泛应用于生物样品中甾体生物碱以及植物中含量较低甾体生物碱类成分的定量分析。表 5 列举了不同样品中甾体生物碱定量分析的 HPLC-MS 检测条件。

表 5 HPLC-MS 测定甾体生物碱含量的检测条件比较

Table 5 Comparison for HPLC-MS detection conditions of the content of steroidal alkaloids

样品	色谱柱型号	流动相	线性范围	参考文献
大鼠血浆	Phenomenex Luna C ₁₈ (2.0 mm × 150 mm, 3 μm)	乙腈-10 mmol·L ⁻¹ 甲酸铵水溶液 (35:65)	贝母素甲 0.8 ~ 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 贝母素乙 0.8 ~ 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[74]
大鼠血浆	Welch materials xtimate-C ₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)	甲醇-5 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵水溶液 (含 0.1% 甲酸) (梯度洗脱)	贝母素甲 0.2 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 贝母素乙 0.2 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 棱砂贝母碱 1.0 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 贝母辛 1.0 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[75]
血浆	Agilent SB C ₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm)	甲醇-0.15% 乙酸铵水溶液 (含 0.75% 乙酸) (80:20)	环维黄杨星 D 1 ~ 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[76]
大鼠血浆	Shimadzu C ₁₈ (2.0 mm × 150 mm, 5 μm)	乙腈-0.02% 甲酸水溶液 (梯度洗脱)	澳洲茄边碱 0.5 ~ 2 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[77]
白英	ACQUITY UPLCTM BEH C ₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm)	乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (50:50)	蜀羊泉次碱 4.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 澳洲茄边碱 0.4 ~ 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 碱苷 A 40.0 ~ 1 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[78]
马铃薯	Xterra C ₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)	3 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵乙腈溶液 (含 5% 水)-3 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵水溶液 (含 5% 乙腈) (梯度洗脱)	茄碱 10 ~ 2 090 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 卡茄碱 10 ~ 2 044 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 茄啉 10 ~ 760 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[79]
马铃薯	Alltima C ₁₈ (1 mm × 100 mm, 3 μm)	0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液 (梯度洗脱)	α -茄碱 10 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, α -卡茄碱 10 ~ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	[80]

由于采用 HPLC-MS 法分析的样品通常成分特别复杂,故对分离度有更高的要求,所以一般使用超高效液相 (UPLC) 与质谱联用。此外,由于 UPLC-MS 法常用于分析的生物样品中杂质较多,需加预柱以保护色谱柱。对甾体生物碱分析通常选用电喷雾离子源 (ESI),并在正离子模式下进行分析。

HPLC-MS 联用技术具有高分离能力,并且质谱检测器可以给出成分的精确相对分子质量及其分子裂解信息,据此,可实现对样品中所含甾体生物碱成分的快速鉴定。研究者通过该方法对各种贝母^[81-85]、藜芦^[86]、马铃薯^[87-88]等药材及食物中的甾体生物碱类成分进行了鉴定。

2.2.4 HPLC-CAD 电喷雾检测器 (CAD) 作为一款通用型检测器,各方面性能均优于 ELSD,并且与 MS 相比更易学易用。因此,近些年 HPLC-CAD 逐

渐被应用于定量分析中,对于像甾体生物碱这种大多数结构无紫外吸收或仅有末端吸收,而且需要在流动相中添加改性剂 (可能不易挥发) 以获得较好的分离效果的成分尤为适用。

LONG 等^[89]采用 HPLC-CAD 对浙贝母中的贝母素甲和贝母素乙进行了含量测定,并在文中详细阐述了 CAD 相比 ELSD 的优势。CAD 的灵敏性为 ELSD 的 30 ~ 55 倍, CAD 可以检测到 ELSD 无法检测到的微量杂质。在本研究中,通过这两种检测器得到的同一样品的谱图,在 CAD 得到的谱图中贝母素的峰面积为 50.10%, 而 ELSD 中为 91.66%。并且 CAD 用于定量分析的重复性及动态范围远优于 ELSD。在本研究中, CAD 对贝母素甲和贝母素乙进行含量测定的动态范围为 0.09 ~ 44 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。杨娟艳等^[90]通过 HPLC-CAD 对小叶黄杨不同部位中环

维黄杨星 D 进行含量测定,方法学考察各项指标良好,与采用 HPLC-ELSD^[69-70]相比具有明显优势。或许今后 CAD 会逐渐取代 ELSD,但是 CAD 相比 ELSD 的仪器价格要昂贵很多,普及还需要一定时间。

2.2.5 甾体生物碱 HPLC 分析机制及其色谱柱和流动相的选择 在利用 HPLC 对大多数生物碱包括甾体生物碱进行含量测定时,除选择适合的检测器外,与其他大多数成分相比,最关键的是克服生物碱结构中的碱性氮原子与固定相中未键合酸性硅醇基的相互作用,以改善色谱峰的展宽拖尾,使其具有理想的分离效能。对此,主要通过色谱柱填料的设计选择和流动相优化两个方面进行解决。

本文对目前甾体生物碱分析的常用色谱柱进行了列举,均为硅胶键合填料。从色谱柱本身因素考虑,影响该类色谱柱分离效能的主要因素有原料硅胶细孔径、粒径、表面积等几何学性质及其化学性质;键合相的种类及其键合方法;封尾方法。其中,键合相的种类及其键合方法以及封尾方法对色谱柱的稳定性及其适用性起到关键作用。

应用于甾体生物碱的硅胶键合填料主要为十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈),也有个别使用辛烷基硅烷键合硅胶(C₈)^[57]和氨丙基硅烷键合硅胶(NH₂)^[47]。C₁₈与C₈类似,但C₈由于修饰链较短,分析时受硅醇基的影响更大;并且由于修饰链较短,其保留能力弱于C₁₈,故可能出现分离不好或分离样品由于保留时间而存在的交叉等问题。故在对甾体生物碱类成分进行分析时采用C₁₈为宜,特别是对结构差异较小的多种成分进行分析时。NH₂既可用于正相色谱也可用于反相色谱,其用于反相色谱时保留弱,适用于弱极性成分^[91]。刘洁等^[47]采用 HPLC 对黄杨宁中主成分环维黄杨星 D 及其他甾体生物碱杂质进行分析时,分别使用了C₁₈,C₈,NH₂等类型反相色谱系统,发现在偏碱性条件下,使用NH₂色谱柱的分离效果最好。这可能是由于甾体生物碱类成分的母核特点致使其极性较小,并且NH₂对高pH通常具有较好的耐受性。目前NH₂应用于甾体生物碱的研究很少,值得对其进一步的研究。

键合方法决定了碳载量和键合相的稳定性。对于反相键合相色谱柱,填料硅胶表面的键合相碳载量及硅醇基覆盖率越高,硅烷键合相侧链位阻越大,一般非极性物质保留越强,耐酸碱宽限越大,键合相越不容易水解,硅胶越稳定不易溶解,从而拥有较好的柱效和分离能力。甾体生物碱等碱性化合物的

HPLC 分析要求色谱柱具有较强的耐酸碱能力,并且甾体生物碱类化合物极性较小,应选择碳载量相对较高的色谱柱,在进行方法开发时应选择 pH 适用范围宽的色谱柱,采用确定方法进行分析时则可根据流动相 pH 进行选择。键合后硅胶表面往往会有残存的硅醇基未被键合,封尾技术对解决碱性化合物与硅胶表面残存的硅醇基之间的相互作用而引起的色谱峰拖尾、柱效下降及分离度降低等一系列问题起到至关重要的作用。在对甾体生物碱进行分析时应选择封尾处理的色谱柱,特别是近些年出现的双封尾色谱柱,例如 ZORBAX Extend C₁₈ 色谱柱采用独特的专利双齿硅烷,并结合双封端工艺,能有效保护硅胶颗粒免于高 pH (pH 可高达 11.5) 条件下发生溶解,特别适合在高 pH 条件下碱性化合物的分析。

从流动相角度入手,为克服硅醇基的不利影响,通常需要在流动相中添加某些改性剂以竞争或掩蔽硅醇基的影响,多从以下途径加以改善:流动相中加入磷酸、甲酸等酸类试剂以竞争硅醇基与甾体生物碱间的相互作用;流动相中加入二乙胺、三乙胺等碱类试剂以掩蔽硅醇基的作用;流动相中加入磷酸二氢钾、乙酸铵等盐类试剂以改变流动相离子强度,促进离子对相互作用而起到掩蔽硅醇基的作用。目前甾体生物碱 HPLC 分析方法,除柱前衍生法外,未见不在流动相中加入改性剂者。柱前衍生法可能是由于过量衍生试剂异氰酸苯酯掩蔽了硅醇基的作用,从而使甾体生物碱呈现较好的峰形。不同的改性剂对于不同甾体生物碱的影响不同,例如笔者在对龙葵中糖苷类甾体生物碱进行分析时,在流动相中加入碱类试剂相比酸性试剂得到的峰形更好,但是在高 pH 条件下分析对色谱柱要求更高。在对甾体生物碱及其他生物碱类化合物的实际分析中,应结合成分特点和流动相中改性剂的种类选择适合的色谱柱。

2.3 其他 用于甾体生物碱的定量分析的方法还有荧光检测器(HPLC-FLD)^[39],化学发光检测器(HPLC-CD)^[92],气相色谱法^[93-95],毛细管电泳法^[96-99],NMR 定量法^[100]等。但是这些方法均因其局限性而难以令人满意,并且随着前面所述中 HPLC-MS, HPLC-ELSD 等更适合甾体生物碱类成分分析的仪器的出现和发展,这几种检测方法现在已极少用于甾体生物碱的含量分析。

近些年,高光谱成像技术在食品和农产品质量与安全检测得到了快速发展,也开始应用于中药的

质量控制方面。HE 等^[101]采用高光谱成像技术对浙贝母中的甾体生物碱母素甲和贝母素乙进行了定量分析。相比常用的 HPLC 定量分析方法,该方法可实现在体无损检测,省时省力,单从定性分析方面可以应用于中药材及其饮片的质量控制,但是若应用于成分定量分析,其测定方法的准确性还需要很大的改进。

3 结语与展望

甾体生物碱在抗肿瘤、心血管系统、抗菌、杀虫等方面具有显著的生物活性,是多种药材及其制剂的主要有效成分,对其进一步的研究开发具有广阔的前景。然而由于甾体生物碱其结构的特殊性,对其定量分析带来一定困难,限制了其开发利用。

近 20 年随着各种检测技术的出现和发展,通过对分析方法的不断努力摸索,开发出适用于甾体生物碱类成分的定量分析方法。特别是高效液相色谱法,是目前对特定甾体生物碱进行定量分析最为普遍、可靠的方法,主要包括 HPLC-ELSD, HPLC-UV, HPLC-MS 和 HPLC-CAD。在对甾体生物碱类成分进行定量分析时,应根据样品及待测成分特点和研究目的而选用适合的 HPLC 检测器。HPLC-MS 主要用于生物样品中痕量甾体生物碱类成分的含量测定;对于结构中有共轭体系的甾体生物碱采用 HPLC-UV 是最为可靠、经济的方法;HPLC-ELSD 适用于所有甾体生物碱类成分,特别是对于无紫外吸收或仅有末端吸收的甾体生物碱,但是该方法流动相中不可使用磷酸、磷酸二氢钾等难挥发性物质;HPLC-CAD 同样适用于所有甾体生物碱类成分,并且对流动相中改性剂的选择有更好的适用性,同时各方面性能相比 HPLC-ELSD 均有明显提升,但是 CAD 价格要比 ELSD 昂贵许多,目前难以普及,不宜作为常规的质量控制方法。在对甾体生物碱进行分析时,除根据分析样品特点及其分析目的选用合适的检测器外,最为关键的是选择适合的色谱柱和流动相。如果对分离度有较高要求的多种甾体生物碱类成分进行分析方法优化时建议选用碳载量较高、pH 适用范围宽并经过封尾处理的 C₁₈ 色谱柱。虽然目前通过色谱柱的选择和流动相中各种改性剂的加入已实现对大多数甾体生物碱类成分的有效测定,但是流动相中改性剂的加入会导致基线噪音强、反相柱长期使用稳定性降低、腐蚀仪器、平衡时间长、清洗柱系统时间长等问题。开发出一种不需要在流动相中加入改性剂便可实现甾体生物碱类成分有效分析的色谱柱对分析方法的稳定性、仪器及色谱柱

的使用寿命和方便性均具有重要的意义。同时,甾体生物碱类化合物普遍存在异构现象,不同构型可能导致其活性的差异,通过目前甾体生物碱分析所用的色谱柱和流动相的改变难以实现有效的分析。对此,可采用手性色谱柱或在流动相中加入手性选择剂开展对甾体生物碱类成分不同构型的分析研究,以促进该方面的药理学研究。对于甾体总生物碱成分,目前主要测定方法为分光光度法-酸性染料比色法,某些其他类型生物碱成分也可被同时测定,尚无甾体总生物碱的专属含量测定方法。

实现对甾体生物碱类成分更为准确的定量分析,对贝母、黄杨、藜芦、龙葵等相关传统中药的质量控制,以及马铃薯、蕃茄、茄等含该成分食物的安全性调控具有重要意义,同时也促进甾体生物碱以及相关中药的进一步开发利用。对近 20 年甾体生物碱定量分析方法进行归纳和总结,为相关中药和食物的研究提供分析方法方面的参考,同时为甾体生物碱定量分析方法的进一步改进和提升起到开拓、示范作用。

[参考文献]

- [1] 王锋鹏. 生物碱化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [2] 谭仁祥. 甾体化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [3] Gaillard Y, Pepin G. LC-EI-MS determination of veratridine and cevadine in two fatal cases of *Veratrum album* poisoning[J]. J Anal Toxicol, 2001, 25(6): 481-485.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 19 卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [5] 李玲, 郑重飞, 孙敬勇, 等. 茄属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(6): 1016-1033.
- [6] 王翠翠, 许蕙金兰, 傅达奇. 茄属生物碱的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(2): 99-104.
- [7] 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): 41-42.
- [8] 王晓静. 川贝母生物碱成分与品质研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [9] 王安行, 胡梅素. 酸性染料两相滴定法测定浙贝母总生物碱的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 1998, 15(3): 50-51.
- [10] 刘丽萍, 付艳丽, 郝继虹, 等. 非水滴定法测定黄杨宁片中生物碱的含量[J]. 黑龙江医药, 2000, 13

- (5):264.
- [11] 朱景申. 药物分析[M]. 北京:中国医药科技出版社,2003.
- [12] 张梦,杭太俊,张正行. 溴甲酚绿酸性染料比色法测定黄杨宁软胶囊含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(5):643-645.
- [13] 刘蓉,周媛,邹坤,等. 排风藤中叔胺生物碱含量测定[J]. 食品科技,2009,34(12):299-302.
- [14] 冯芳,马永建,张正行,等. 黄杨宁质量标准改进研究[J]. 中国药理学杂志,2001,36(5):341-342.
- [15] 马微微,蔡妙婷,邹云峰,等. 不同生长期栽培及野生平贝母的总生物碱分布[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):118-120.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [17] 王艳红,吴晓民,郑友兰. 不同产地和采收期的平贝母总生物碱含量[J]. 中药材,2006,29(1):8-10.
- [18] 夏德豪,程显隆,肖新月,等. 平贝母中总生物碱含量测定方法学研究[J]. 中国药事,2007,21(9):756-758.
- [19] 马卫成,盛振华,戎建辉. 不同产地浙贝母总生物碱的含量测定[J]. 中华中医药学刊,2009,27(7):1495-1496.
- [20] 李松林,李萍,卞芸芸,等. 浙贝母总生物碱的月积累动态的研究[J]. 中国中药杂志,1999,24(10):592-594.
- [21] 王纯玉,何祖新,吴玉良. 不同商品规格川贝母总生物碱含量测定的方法研究[J]. 中国药业,2013,22(15):31-33.
- [22] 冯芳,马永建,张正行,等. 黄杨宁质量标准改进研究[J]. 中国药理学杂志,2001,36(5):341-342.
- [23] 韩素芹,张强,张翼敏,等. 白英中甾体类总生物碱的含量测定研究[J]. 山西中医学院学报,2014,15(6):32-34.
- [24] 臧雅丽. 白英抗肿瘤活性成分研究[D]. 北京:中国中医科学院,2008.
- [25] 王旺田,张金文,王蒂,等. 光质与马铃薯块茎细胞信号分子和糖苷生物碱积累的关系[J]. 作物学报,2010,36(4):629-635.
- [26] 张卫东,孙睿,李丽,等. 龙葵碱提取条件优化及其含量的测定[J]. 安徽农业科学,2013,41(29):11638-11639.
- [27] Korpan Y I, Volotovskiy V V, Marteler C, et al. A novel enzyme biosensor for steroidal glycoalkaloids detection based on pH-sensitive field effect transistors [J]. Bioelectrochemistry, 2002, 55(1):9-11.
- [28] Durst R A, And G P. Determination of potato glycoalkaloids using a liposome immunomigration, liquid-phase competition immunoassay [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(5):1678-1683.
- [29] Valentyna N A, Dzyadevych S V, Soldatkin A P, et al. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids [J]. Biosens Bioelectron, 2003, 18(8):1047-1053.
- [30] Driedger D R, LeBlanc R J, LeBlanc E L, et al. A capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for analysis of potato glycoalkaloids based on a solution-phase immunoassay. 2. Performance evaluation [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(9):4079-4082.
- [31] 蒋新宇,杨辉,赵宇. 龙葵中甾体类生物总碱的含量测定[J]. 食品科学,2006,27(8):224-227.
- [32] 刘汉珍,孙伟. 薄层扫描法测定黄杨宁片环维黄杨星 D 的含量[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11):1098-1099.
- [33] 翟西峰,李大龙,冯永辉,等. 伊贝母不同组织培养物中总生物碱和西贝母碱含量比较[J]. 中草药, 2001, 32(1):31-33.
- [34] Trivedi P, Pundarikakshudu K. Novel TLC densitometric method for quantification of solasodine in various *Solanum* species, market samples and formulations [J]. Chromatographia, 2007, 65(3/4):239-243.
- [35] Bhat M A, Ahmad S, Aslam J, et al. Salinity stress enhances production of solasodine in *Solanum nigrum* L [J]. Chem Pharm Bull, 2008, 56(1):17-21.
- [36] Shanker K, Gupta S, Srivastava P, et al. Simultaneous determination of three steroidal glycoalkaloids in *Solanum xanthocarpum* by high performance thin layer chromatography [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2011, 54(3):497-502.
- [37] Kokotkiwicz A, Migas P, Stefanowicz J, et al. Densitometric TLC analysis for the control of tropane and steroidal alkaloids in *Lycium barbarum* [J]. Food Chem, 2017, 221:535-540.
- [38] 谢昫,于治国,徐新盛,等. 反相离子对色谱法测定环维黄杨星 D 含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7):888-890.
- [39] 徐新军,张正行,盛龙生,等. 柱前荧光衍生化 RP-HPLC 测定环维黄杨星 D 含量[J]. 药科学报, 2002, 37(5):359-361.
- [40] 金玉婷,狄斌,高署,等. 环维黄杨星 D 含量测定法改进研究[J]. 中国药品标准, 2013, 14(3):190-193.
- [41] 李松林,李萍,林鸽. 甾体生物碱定量分析研究的回顾与展望[J]. 中国药品标准, 2001, 2(4):8-11, 23.
- [42] Shakya R, Navarre D A. Rapid screening of ascorbic

- acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(15):5253-5260.
- [43] 郭青, 吕霞, 孙姗, 等. 黄杨宁原料及片中环维黄杨星 D 含量及含量均匀度测定 [J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(10):1651-1657.
- [44] 郭青, 吕霞, 伍乃英, 等. 黄杨宁片及原料中环维黄杨星 D 含量测定的 3 种 HPLC 方法评价 [J]. *中国现代应用药学*, 2009, 26(11):929-933.
- [45] 薛燕, 刘文啟. RP-HPLC 法测定浙贝炮制品中主要生物碱的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(1):58-60.
- [46] 周浓, 郭冬琴, 沈力, 等. 太白贝母与暗紫贝母中 4 种生物碱的含量比较 [J]. *食品科学*, 2014, 35(12):133-136.
- [47] 刘洁, 杭太俊, 张正行. HPLC 法测定黄杨宁中环维黄杨星 D 和有关生物碱检查 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(4):446-449.
- [48] 王金辉, 丛悦, 曹颖林. 藜芦 (*Veratrum nigrum* L.) 生品与炮制品中藜芦新碱 (veratrosine) 含量和毒性差异研究 [J]. *河南大学学报: 医学版*, 2007, 26(4):1-5.
- [49] 丛悦, 王金辉, 王艳. HPLC 法测定藜芦生品和醋制品中藜芦胺碱 (veratramine) 的含量 [J]. *河南大学学报: 医学版*, 2008, 27(4):14-16.
- [50] 袁海建, 陈宜刚, 蔡宝昌, 等. 反相高效液相色谱法同时分析龙葵中 3 种甾体生物碱 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(12):1630-1632.
- [51] 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):360-362.
- [52] 高洁, 朱名毅, 黄祖良, 等. RP-HPLC 测定水茄果实不同提取物中澳洲茄碱含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(17):46-48.
- [53] Turakainen M, Väänänen T, Anttila K, et al. Effect of selenate supplementation on glycoalkaloid content of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(23):7139-7143.
- [54] 周宝利, 李志文, 丁昱文, 等. 茄子体内 α -茄碱的含量检测及分布特点 [J]. *植物研究*, 2009, 29(3):380-384.
- [55] Choi S H, Lee S H, Kim H J, et al. Changes in free amino acid, phenolic, chlorophyll, carotenoid, and glycoalkaloid contents in tomatoes during 11 stages of growth and inhibition of cervical and lung human Cancer cells by green tomato extracts [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(13):7547-7556.
- [56] 王进喜, 严小盈, 杜江. HPLC 法测定苗药大落伞中野扇花碱 D 的含量 [J]. *中国民族医药杂志*, 2012, 18(7):46-47.
- [57] 杨晨, 郭青, WOLF C, 等. 柱前衍生化 RP-HPLC 法对黄杨宁片原料中环维黄杨星 D 和杂质的定性定量研究 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(6):1013-1022.
- [58] 王振月, 侯素云, 王志林, 等. 不同产地不同物候期平贝母的贝母乙素含量研究 [J]. *中药材*, 2006, 29(11):1135-1136.
- [59] 王玥, 张庆林, 陈信义, 等. HPLC 法测定市售贝母中贝母乙素含量 [J]. *中草药*, 2001, 32(1):24-25.
- [60] 黄勤安, 黄海燕, 鲁静, 等. 高效液相色谱法测定黄杨宁片中环维黄杨星 D 的含量和含量均匀度 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(2):264-266.
- [61] 王大果, 曾灶昌, 王启平, 等. 柱前衍生化 HPLC/UV 法测定黄杨宁片中环维黄杨星 D 的含量 [J]. *中南药学*, 2009, 7(7):484-486.
- [62] LI S L, LIN G, CHAN S W, et al. Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 909(2):207-214.
- [63] CONG Y, ZHOU Y B, CHEN J, et al. Alkaloid profiling of crude and processed *Veratrum nigrum* L. through simultaneous determination of ten steroidal alkaloids by HPLC-ELSD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3):573-578.
- [64] LI P, ZENG L J, LI S, et al. The extraction of imperialine and imperialine-3 beta-glucoside from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk and quantitative determination by HPLC-evaporative light scattering detection [J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13(3):158-161.
- [65] 薛燕, 王峰. 不同产地浙贝母药材中 3 种活性成分的分析研究 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(16):1628-1630.
- [66] 蒋玉虎, 刘玉明, 孙璐, 等. 炉贝母不同提取物中贝母辛和贝母素乙含量的 HPLC-ELSD 测定 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(5):1051-1053.
- [67] 牛焕云, 金施施, 贾宇平, 等. 湖北贝母与紫花鄂北贝母中 4 种生物碱的含量比较分析 [J]. *中药材*, 2015, 38(10):2105-2108.
- [68] 范蕾, 王伟影. 可同时测定蛇胆川贝液中贝母素甲与贝母素乙含量的方法 [J]. *中国药业*, 2012, 21(2):41-42.
- [69] 陈勇, 樊雪君, 龚青. HPLC 梯度洗脱法测定黄杨宁片中环维黄杨星 D 的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(14):1155-1157.
- [70] 崔颖, 张永旺. 黄杨宁滴丸的高效液相色谱: 蒸发光

- 散射检测器含量测定方法[J]. 中国新技术新产品, 2009(14):5.
- [71] 王隶书,赵大庆,陶华明,等. HPLC-ELSD 法测定黑藜芦主根、须根及地上茎叶残基中藜芦碱的含量[J]. 中国药师,2008,11(1):14-15.
- [72] 齐伟,孙长山,马龄,等. HPLC-ELSD 法测定白英中碱苣 A 的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2010,27(4):299-302.
- [73] 段宝忠,黄林芳,陈士林. UPLC-ELSD 法同时测定伊贝母中贝母辛和西贝母碱的含量[J]. 药学学报,2010,45(12):1541-1544.
- [74] 陈丽华,刘丽丽,刘红宁,等. LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中贝母素甲、贝母素乙的浓度及其在药代动力学中的应用[J]. 药学学报,2010,45(7):891-894.
- [75] HENG L, LEI Z, WEI X, et al. Simultaneous determination of four main isosteroidal alkaloids of bulbous fritillariae cirrhosae in rat plasma by LC-MS-MS[J]. Chromatographia,2012,75(13/14):729-737.
- [76] 冯英,潘桂湘,张艳军. 血浆中环维黄杨星 D 的测定方法学研究[J]. 现代中药研究与实践,2008,22(2):33-37.
- [77] XIAO Z, XU L M, YAN L, et al. Quantitative determination and pharmacokinetic study of solamargine in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,2011,55(5):1157-1162.
- [78] JIA Y R, TIAN X L, LIU K, et al. Simultaneous determination of four alkaloids in *Solanum lyratum* Thunb by UPLC-MS/MS method[J]. Pharmazie, 2012,67(2):111-115.
- [79] Jensen P H, Juhler R K, Nielsen N J, et al. Potato glycoalkaloids in soil-optimising liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for quantitative studies[J]. J Chromatogr A,2008,1182(1):65-71.
- [80] Deuber H, Guignard C, Hoffmann L, et al. Polyphenol and glycoalkaloid contents in potato cultivars grown in Luxembourg[J]. Food Chem, 2012, 135(4):2814-2824.
- [81] ZHOU J L, LI P, LI H J, et al. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for relative and absolute quantification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species[J]. J Chromatogr A, 2008,1177(1):126-137.
- [82] LI H J, JIANG Y, LI P. Characterizing distribution of steroidal alkaloids in *Fritillaria* spp. and related compound formulas by liquid chromatography-mass spectrometry combined with hierarchial cluster analysis[J]. J Chromatogr A,2009,1216(11):2142-2149.
- [83] ZHOU J L, XIN G Z, SHI Z Q, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(45):7109-7122.
- [84] LI W, ZHONG Y, PING L, et al. Global detection and semi-quantification of *Fritillaria* alkaloids in *Fritillariae Ussuriensis* Bulbus by a non-targeted multiple reaction monitoring approach[J]. J Sep Sci, 2016, 39(2):287-295.
- [85] 崔明超,张加余,陈少军,等. 浙贝母植株各部位中生物碱和黄酮的 LC-LTQ-Orbitrap MSⁿ 分析[J]. 中国中药杂志,2016,41(11):2124-2130.
- [86] 章斌,董昕,娄子洋. UHPLC-Q-TOF/MS 对藜芦药材化学成分的快速分离与鉴别[J]. 第二军医大学学报,2012,33(5):536-539.
- [87] Shepherd L V T, Hackett C A, Alexander C J, et al. Modifying glycoalkaloid content in transgenic potato-Metabolome impacts[J]. Food Chem, 2015, 187:437-443.
- [88] Shakya R, Navarre D A. LC-MS analysis of solanidane glycoalkaloid diversity among tubers of four wild potato species and three cultivars(*Solanum tuberosum*)[J]. J Agric Food Chem,2008,56(16):6949-6958.
- [89] LONG Z, GUO Z M, Acworth I N, et al. A non-derivative method for the quantitative analysis of isosteroidal alkaloids from *Fritillaria* by high performance liquid chromatography combined with charged aerosol detection[J]. Talanta, 2016, 151:239-244.
- [90] 杨娟艳,王芳,郭婷,等. 黔产小叶黄杨中环维黄杨星 D 的鉴别及不同部位含量测定[J]. 生物技术进展,2016,6(5):341-345,381.
- [91] 田超. 新型高效液相色谱固定相的制备及其色谱性能的研究[D]. 青岛:青岛大学,2016.
- [92] Hitoshi K, Keiitsu S, Nobumitsu N, et al. Simple and sensitive method for determination of glycoalkaloids in potato tubers by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection[J]. J Chromatogr A,2005,1100(1):26-31.
- [93] 李松林,李萍,林鸽,等. 药用贝母中几种活性异甾体生物碱的分布[J]. 药学学报,1999,34(11):842-847.
- [94] LI S L, LI P, LIN G, et al. Simultaneous determination of seven major isosteroidal alkaloids in bulbs of

- Fritillaria* by gas chromatography [J]. J Chromatogr A, 2000, 873(2):221-228.
- [95] LI S L, CHAN S W, LI P, et al. Pre-column derivatization and gas chromatographic determination of alkaloids in bulbs of *Fritillaria* [J]. J Chromatogr A, 1999, 859(2):183-192.
- [96] Bianco G, Schmitt-Kopplin P, De B G, et al. Determination of glycoalkaloids and relative aglycones by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2002, 23(17):2904-2912.
- [97] Bianco G, Schmitt-Kopplin P, Crescenzi A, et al. Evaluation of glycoalkaloids in tubers of genetically modified virus Y-resistant potato plants (var. Désirée) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (NACE-ESI-MS) [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 375(6):799-804.
- [98] Cherkaoui S, Bekkouche K, Christen P, et al. Non-aqueous capillary electrophoresis with diode array and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of selected steroidal alkaloids in plant extracts [J]. J Chromatogr A, 2001, 922(1):321-328.
- [99] 赵霞, 陆阳, 陈泽乃. 毛细管电泳法定量分析贝母中几种生物碱 [J]. 中草药, 2001, 32(2):116-118.
- [100] 刘洁, 杭太俊, 张正行. NMR 定量法与 HPLC-UV 法测定环维黄杨星 D 对照品比较 [J]. 中国热带医学杂志, 2008, 8(6):911-913.
- [101] HE J, HE Y, ZHANG A C. Determination and visualization of peimine and peiminine content in *fritillaria thunbergii* bulbi treated by Sulfur fumigation using hyperspectral imaging with chemometrics [J]. Molecules, 2017, 22(9):1-12.

[责任编辑 顾雪竹]