

· 化学与分析 ·

RP-HPLC 测定水茄果实不同提取物中澳洲茄碱含量

高洁¹, 朱名毅^{1*}, 黄祖良¹, 李日著²

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

[摘要] 目的: 建立水茄果实提取物中澳洲茄碱的含量测定方法, 并比较不同提取物中澳洲茄碱的含量。方法: 通过系统溶剂萃取法提取水茄果实中澳洲茄碱, 比较不同提取部位中该成分含量。采用 HPLC 测定澳洲茄碱含量, 流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(15:85), 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C。结果: 澳洲茄碱在 2~80 μg 呈良好线性关系, 平均回收率 100.93%, RSD 0.60%。水洗脱部位、10% 乙醇洗脱部位、30% 乙醇洗脱部位、50% 乙醇洗脱部位、70% 乙醇洗脱部位、95% 乙醇洗脱部位、石油醚萃取部位、乙酸乙酯萃取部位、正丁醇萃取部位和水相样品中澳洲茄碱分别为 0.062 9, 0.939 0, 0.020 5, 0.118 0, 0.005 1, 0.004 4, 0.010 6, 0.031 4, 0.070 5, 0.113 0 mg·g⁻¹。结论: 该方法简便、准确、专属性强, 可作为水茄果实提取物中澳洲茄碱的含量测定方法, 不同提取部位中该成分含量差异较大。

[关键词] 水茄; 不同提取部位; 澳洲茄碱

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0046-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170046

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1343.018.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:43

Determination of Solasonine Content in Different Extracts of *Solanum torvum* Fruits by RP-HPLC

GAO Jie¹, ZHU Ming-yi^{1*}, HUANG Zu-liang¹, LI Ri-zhu²

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;

2. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determining the content of solasonine in different extracts of *Solanum torvum* fruits. **Method:** Solasonine from *S. torvum* fruits was extracted by system solvent extraction method, contents of solasonine in different extracting parts were compared. The content of solasonine was determined by HPLC with mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution (15:85), flow rate of 0.5 mL·min⁻¹, detection wavelength at 250 nm and column temperature at 30 °C. **Result:** Solanone showed a good linear relationship within 2-80 μg, average recovery was 100.93% with RSD of 0.60%. Elution parts of water, 10% ethanol, 30% ethanol, 50% ethanol, 70% ethanol, 95% ethanol and extracting parts in petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol, water were 0.062 9, 0.939 0, 0.020 5, 0.118 0, 0.005 1, 0.004 4, 0.010 6, 0.031 4, 0.070 5, 0.113 0 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This method was simple, accurate and specific, it could be considered as an effective method for determining the content of solasonine in different extracts of *S. torvum* fruits, which had quite difference in different extracting parts.

[Key words] *Solanum torvum*; different extracting sites; solasonine

[收稿日期] 20131221(002)

[基金项目] 右江民族医学院院级课题(右医院字[2012]21号)

[第一作者] 高洁, 硕士, 讲师, 从事中草药抗肿瘤研究, Tel:0776-2830370, E-mail:jenny8806@sina.com

[通讯作者] *朱名毅, 硕士, 讲师, 从事中草药抗肿瘤研究, Tel:0776-2830370, E-mail:zhumingyi2009@163.com

水茄又名金钮扣、山颠茄、金纽头等^[1],分布于广西、广东、海南、福建等省,有小毒,常以根入药^[2]。作为我国岭南地区民间常用的草药,其具有散瘀、通经、消肿、止痛、止咳等功效,主治风湿疼痛、破伤风、痈肿、恶疮、疥疮、外伤出血、咽喉炎等^[3]。目前有关水茄提取物的报道主要集中在多糖、皂苷类成分的抗肿瘤、抗凋亡和抗免疫研究^[4],关于其生物碱类成分的报道较少。生物碱类成分是茄属植物中广泛存在的主要活性成分之一,目前已在水茄等茄属植物的根、茎、叶、花和果实中发现澳洲茄碱、澳洲茄胺、澳洲茄边碱、糖苷生物碱、毛叶冬珊瑚碱等成分^[5-6],澳洲茄碱在体外抗肿瘤试验中表现出很好的抗肿瘤活性^[7],但目前尚未见关于水茄中澳洲茄碱的提取及其含量测定方面的文献报道。故本实验拟建立一种检测水茄未成熟果实中主要生物碱类成分—澳洲茄碱的含量测定方法,为建立水茄提取物及其制剂的质量标准提供参考。

1 材料

U3000型高效色谱仪器(美国戴安公司),FD-1A-50型冷冻干燥机(北京医博康实验仪器有限公司),N-1100型旋转蒸发器(日本Eyela公司),BS124S型电子天平称(德国赛多利斯公司)。水茄果实采自广西百色市,均为生长于野生山林8月份的未成熟果实,经右江民族医学院药学教研室黄祖良教授鉴定为茄科植物水茄 *Solanum torvum* Swartz的未成熟果实;HP20型大孔树脂(河北沧州宝恩吸附材料科技有限公司),澳洲茄碱对照品(纯度 $\geq 98\%$,批号ZM0510BB13,上海源叶生物科技有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 戴安 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈-0.2%磷酸溶液(15:85),流速0.5 mL \cdot min⁻¹,柱温30 $^{\circ}$ C,进样量20 μ L,检测波长250 nm。

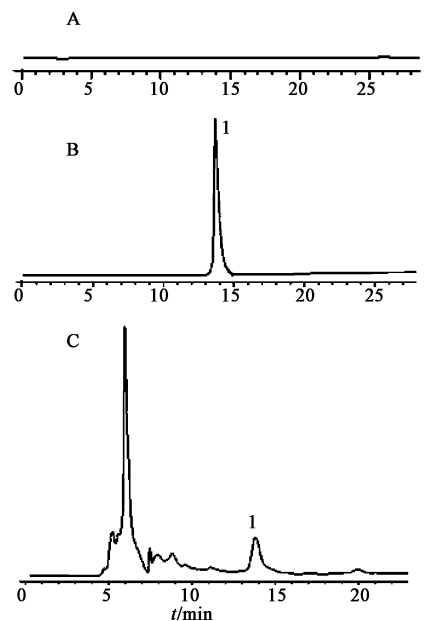
2.2 对照品溶液的制备 精密称取澳洲茄碱对照品40.0 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成4 g \cdot L⁻¹对照品储备液。

2.3 水茄果实不同提取物的制备^[8] 净选水茄果实,50 $^{\circ}$ C干燥,粉碎成中粉,加10倍量60%乙醇溶液加热回流提取2次,每次2 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至无醇味,称定质量,得干膏量91.2 g。取干膏38.7 g溶于适量水中,量取适量上清液,上样于已预处理好的HP20型大孔树脂柱,依次用适量水

和10%,30%,50%,70%,95%的乙醇洗脱,分别收集各部位洗脱液,减压回收溶剂,冷冻干燥,得水洗脱部位样品(Fr-1)、10%乙醇洗脱部位样品(Fr-2)、30%乙醇洗脱部位样品(Fr-3)、50%乙醇洗脱部位样品(Fr-4)、70%乙醇洗脱部位样品(Fr-5)和95%乙醇洗脱部位样品(Fr-6)。取干膏41.7 g溶于适量水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,减压回收溶剂,冷冻干燥,得石油醚萃取部位样品(Fr-7)、乙酸乙酯萃取部位样品(Fr-8)、正丁醇萃取部位样品(Fr-9)和水相样品(Fr-10)。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取水茄提取物样品粉末0.1 g,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 专属性考察 分别精密吸取空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液适量,按2.1项下方法检测,结果显示提取物中澳洲茄碱得到较好的基线分离,分离度 >1.5 ,塔板数 $>5\ 000$,表明该方法专属性良好,各成分和溶剂间无干扰,见图1。



A. 空白溶剂; B. 对照品; C. 供试品; 1. 澳洲茄碱

图1 水茄果实提取物 HPLC

2.6 线性关系考察 精密吸取对照品储备液0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 mL, 分别置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按2.1项下方法测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 3.552X - 0.34$ ($r = 0.9999$),表明澳洲茄碱在2~80 μ g与峰面积呈良好线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取澳洲茄碱对照品溶液20 μ L,按2.1项下方法连续进样6次,结果峰面积

的 RSD 0.39%,说明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取 Fr-2 供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,8,10,12 h 按 2.1 项下方法检测,结果澳洲茄碱峰面积的 RSD 1.4%,说明供试品溶液至少在 12 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取提取物 Fr-2 样品,按 2.4 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下方法测定,计算澳洲茄碱平均质量分数 $0.939 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 1.3%,说明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取提取物 Fr-2 样品 6 份,每份约 1.0 g,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入 $0.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 澳洲茄碱对照品溶液 1 mL,按 2.4 项下方法制成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率,见表 1,结果表明该方法准确度较好。

表 1 水茄提取物中澳洲茄碱含量测定的加样回收率

称样量 /g	样品中质量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.001 0	0.939 9	1.902 2	101.3	100.93	0.60
1.004 0	0.942 8	1.899 0	100.7		
1.000 2	0.939 2	1.903 0	101.5		
1.003 0	0.941 9	1.899 5	100.8		
1.000 4	0.939 4	1.888 9	99.9		
1.000 9	0.939 8	1.903 5	101.4		

2.11 样品测定 精密称取各提取物样品 0.1 g,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算澳洲茄碱含量,结果见表 2。

表 2 水茄不同部位提取物中澳洲茄碱的含量测定

样品	提取物质量/g	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
总提取物	91.2	0.075 2	0.70
FR-1	20.67	0.062 9	0.89
FR-2	2.47	0.939 0	0.65
FR-3	1.38	0.020 5	1.23
FR-4	1.13	0.118 0	0.31
FR-5	2.53	0.005 1	1.10
FR-6	5.63	0.004 4	2.60
FR-7	2.90	0.010 6	1.50
FR-8	3.90	0.031 4	1.30
FR-9	14.68	0.070 5	0.64
FR-10	14.75	0.113 0	0.62

3 讨论

根据澳洲茄碱的结构特点,预试验参考文献^[9-10]采用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液共 4 种流动相系统,结果发现选择乙腈-0.2%磷酸溶液(15:85),流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,澳洲茄碱的基线分离效果较好。对照品溶液和供试品溶液曾进行 190 ~ 400 nm 的紫外-可见光谱扫描,结果显示澳洲茄碱的最大吸收波长为 250 nm。在确定以上条件的基础上,考察了柱温为室温,30 ℃和 35 ℃对澳洲茄碱色谱峰的影响,发现柱温为 30 ℃时,峰型和分离度均较好,且各成分和溶剂之间无干扰。

含量测定结果表明不同溶剂对澳洲茄碱的提取率影响很大,其中用 10% 乙醇洗脱部位的澳洲茄碱含量最高,顺序为 FR-2 > FR-4 > FR-10 > 总提取物 > FR-9 > FR-1 > FR-8 > FR-3 > FR-7 > FR-5 > FR-6,说明采用大孔树脂梯度洗脱的方法能更好地富集澳洲茄碱。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海科技出版社,2001:718.

[2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:126.

[3] 何天明. 白皂苷各组分免疫佐剂活性研究[D]. 福州:福建农林大学,2010.

[4] 杨旭东,张杰,王葳. 白毛藤对人肝癌 Bel7402 细胞增殖抑制及凋亡作用[J]. 中国公共卫生,2011,27(4):445.

[5] Arthan D, Svasti J, Kittakoop P, et al. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum* [J]. Phytochemistry, 2002, 59(4):459.

[6] 王硕,杨洋,王之劲,等. 茄属植物化学成分及其活性研究进展[J]. 中国农业通报,2013,29(4):35.

[7] 罗文娟,王光辉,周新兰,等. 螺甾皂苷类化合物的体外抗人肝癌细胞增殖作用[J]. 现代肿瘤医学,2007,15(3):307.

[8] 周新兰,何祥久,周光雄,等. 龙葵全草皂苷类化学成分研究[J]. 中草药,2006,37(11):1618.

[9] 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.

[10] 单会娇,张建逵,许亮,等. 24 个产地龙葵中澳洲茄碱的含量测定[J]. 中成药,2011,33(3):483.

[责任编辑 刘德文]