

亲水作用色谱法测定胡芦巴中的胡芦巴碱

卓荣杰¹, 王莉¹, 王龙星¹, 肖红斌^{1*}, 蔡少青²

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要 :建立了亲水作用色谱法(HILIC)测定胡芦巴药材中胡芦巴碱含量的方法。采用 Waters Atlantis HILIC Silica 色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 3 μm),以乙腈-乙酸铵溶液(pH 4.4)(体积比为70:30)为流动相,流速0.4 mL/min,检测波长265 nm。胡芦巴碱的线性范围为2.50~100 mg/L($r = 0.9996$);两个加标水平的平均加样回收率为102%,相对标准偏差(RSD)分别为4.17%和2.28%($n = 3$)。结果表明所建方法分离效果好、快速简易,可以弥补中国药典中离子对色谱法(IPLC)平衡时间过长的缺陷,适用于胡芦巴药材中强极性胡芦巴碱的测定,为胡芦巴的质量控制提供了有效的方法。

关键词 :亲水作用色谱法;胡芦巴碱;胡芦巴;中药材

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)04-0379-04

Determination of trigonelline in *Trigonella foenum-graecum* L. by hydrophilic interaction chromatography

ZHUO Rongjie¹, WANG Li¹, WANG Longxing¹, XIAO Hongbin^{1*}, CAI Shaoqing²

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences of Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract : A method of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) was established for the quantitative determination of trigonelline in *Trigonella foenum-graecum* L. HILIC analysis was performed on a Waters Atlantis HILIC Silica column (150 mm × 2.1 mm, 3 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-ammonium acetate (pH 4.4) (70:30, v/v), and the flow rate was 0.4 mL/min. The detection wavelength was set at 265 nm. The method has good linearity in the range of 2.50 - 100 mg/L for trigonelline ($r = 0.9996$). The recoveries were on an average of 102% by adding 29.2 mg/L and 43.8 mg/L with relative standard deviations (RSDs) of 4.17% and 2.28% ($n = 3$), respectively. The results indicate that the method is simple and rapid for the determination of strong polar trigonelline in *Trigonella foenum-graecum* L. Furthermore, it significantly reduces the equilibration time compared with ion-pair liquid chromatography (IPLC) recorded in the Pharmacopoeia of China. This new method can be used as a valid method for the quality control of *Trigonella foenum-graecum* L.

Key words : hydrophilic interaction chromatography (HILIC); trigonelline; *Trigonella foenum-graecum* L.; traditional Chinese medicine (TCM)

胡芦巴是豆科植物胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 的干燥成熟种子^[1]。胡芦巴具有较好的降血糖、降血脂活性,其地上部分的提取物对慢性肾功能衰竭有显著疗效^[2]。胡芦巴药材中含生物碱类、黄酮类、皂甙类等成分,其中胡芦巴碱(如图1所示)为其主要活性成分,具有温肾、祛寒、止痛之功效^[1]。现代药理研究表明,胡芦巴碱具有降血

糖、抗肿瘤、降血脂等作用^[3]。

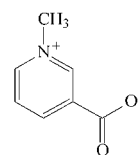


图1 胡芦巴碱的分子结构

Fig. 1 Structure of trigonelline

* 通讯联系人:肖红斌,博士,研究员,博士生导师. Tel : (0411)84379756, E-mail : hbxiao@dicp.ac.cn.

基金项目 :中国科学院重要方向性项目(No. KSCX2-YW-R-078)和科技部创新药物重大专项关键技术(No. 2009ZX09502-023).

收稿日期 2009-11-23

葫芦巴碱的含量测定方法有光密度计法、极谱法、薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)及高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)^[4,5]。目前常用的方法为HPLC法。赵怀清等^[6]报道使用氨基键合相色谱柱测定葫芦巴碱含量,葫芦巴碱与相邻峰的分离效果不太理想。刘广学等^[7]报道采用Zorbax XDB-C₁₈色谱柱的反相色谱法(RPLC),葫芦巴碱几乎不被保留。《中国药典》(2005年版)采用了反相离子对高效液相色谱法(RP-IPLC)^[1],分离效果很好,但是达到平衡的时间很长,约3.5 h,用此方法定量比较繁琐。因此本实验的目的就是寻找一种基于HPLC的分离效果好、快速简易的葫芦巴碱定量方法。

亲水作用色谱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)是一种以极性填料为固定相(如硅胶或衍生硅胶),以高比例极性有机溶剂和低比例水溶液为流动相的色谱模式^[8]。近年来HILIC在强极性化合物分离中的应用越来越受到生命科学、环境科学、医药领域尤其在药物分析领域^[9-11]科学家们的重视,已成为色谱科学研究的热点之一^[12]。HILIC具有与正相色谱(NPLC)相似的保留行为,能保留一些用RPLC无法简单保留的强极性化合物,又避免了NPLC无水流动相溶解度不好等缺点。而葫芦巴碱分子中同时存在带正、负电荷的基团,极性很强,使其在RPLC上的保留非常困难。本文将HILIC法用于葫芦巴碱的测定,分离效果好、测定快速简易,并且可以弥补药典中IPLC法平衡时间过长的缺陷。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

美国Waters公司2690高效液相色谱仪,Waters 996二极管阵列检测器。KQ5200超声波仪(江苏昆山市超声仪器有限公司)。Waters Millipore超纯水。乙腈(色谱纯,美国Fisher公司),甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司),乙酸铵、冰醋酸、氨水(分析纯,沈阳化学试剂厂),十二烷基硫酸钠(SDS,分析纯,北京东环联合化工厂)。乙酸铵溶液的配制:将387 mg乙酸铵固体溶于1 L水中配制成约5 mol/L的乙酸铵水溶液,pH为4.4。

葫芦巴碱对照品(批号110883-200502)购于中国药品生物制品检定所。葫芦巴药材采购于全国不同地区,样品经北京大学药学院蔡少青教授鉴定为豆科植物葫芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 的干燥成熟种子。

1.2 对照品溶液的制备

精密称取葫芦巴碱对照品5 mg,置于10 mL容量瓶中,用50%甲醇定容,得到0.5 g/L的葫芦巴碱对照品溶液。

1.3 样品溶液的制备

精密称取葫芦巴粉末0.1 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密加入20 mL 50%甲醇,称定质量,静置1 h,超声处理45 min,冷却后再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,静置后吸取上层清液,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得葫芦巴提取物样品溶液^[1]。

1.4 色谱条件

色谱柱:Waters Atlantis HILIC Silica(150 mm × 2.1 mm, 3 μm);流动相:乙腈-乙酸铵溶液(70:30, v/v);流速:0.4 mL/min;柱温:30 °C;进样量:2 μL;检测波长:265 nm^[1,7]。

2 结果与讨论

2.1 色谱模式的选择

由于葫芦巴碱分子中同时存在带正、负电荷的基团,以内盐形式存在,极性很强,加之在酸性条件下的正电荷存在形式,使其在RPLC上的保留非常困难。实验初期考察了很多常规的流动相体系,如乙腈-水、乙腈-乙酸铵缓冲溶液及乙腈-1%冰醋酸溶液等,结果保留都很弱,几乎在死时间出峰。

首先考察了药典中的IPLC法。采用了以C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)为固定相,以甲醇-0.05% SDS-冰醋酸(20:80:0.1, v/v/v)为流动相的IPLC法^[1]。实验结果表明,葫芦巴碱在系统中的保留理想,与相邻峰的分离度很好,但是色谱平衡时间很长,柱温在35 °C条件下约需3.5 h(如图2b所示)相比,用此方法定量比较繁琐。实验中尝试以升高柱温,提高流速,来缩短平衡时间。当柱温上升到60 °C时,系统在2.5 h后达到平衡,虽然平衡时间稍有减少,但效果还是不理想。

HILIC能够保留像葫芦巴碱之类的强极性化合物,本实验采用Waters Atlantis HILIC Silica色谱柱,实现了葫芦巴碱的高效分离,达到了定量分析的要求。对HILIC系统平衡所需的时间也进行了考察(如图2a所示),当系统运行12 min后,保留时间就基本稳定,与药典的IPLC法(如图2b所示)相比,HILIC系统的平衡时间不足IPLC的1/10,可以弥补IPLC法平衡时间过长的缺陷。

实验中还选用Agela Venusil HILIC、依利特Hypersil NH₂常规亲水柱(250 mm × 4.6 mm, 5

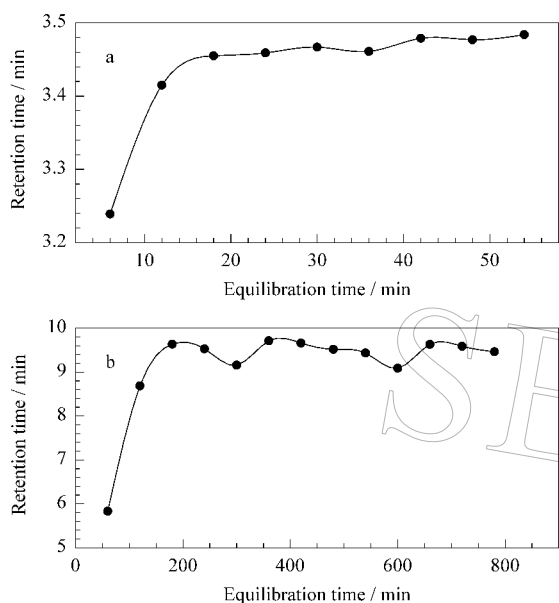


图 2 (a)HILIC 与 (b)IPLC 平衡时间的比较

Fig. 2 Comparison of the equilibration time between (a) HILIC and (b) IPLC

μm)与 Waters HILIC 柱比较,尝试在亲水作用模式下对葫芦巴碱的分析,以期找到一种更为经济和通用的方法。结果三者都能达到葫芦巴碱的高效分离,但由于不同色谱柱的固定相处理技术不同,亲水作用机理复杂,表现出不同的保留行为,色谱图也有很大差异。比较而言,Waters HILIC 柱的分离效果更好、时间更短。实验表明 HILIC 能够满足葫芦巴中葫芦巴碱的分析测定,但保留机理有待进一步研究。

2.2 色谱条件的优化

对 HILIC 中流动相的选择、pH 值进行了考察。乙腈-乙酸铵溶液在等度条件下就可实现样品的基线分离,当体积比为 70:30 时,保留时间约为 3.85 min。在上述流动相条件下,用氨水或冰醋酸调节乙酸铵溶液的 pH 值,从实验中发现,pH 值对葫芦巴碱的保留时间和峰形影响不大。pH 4.4 是乙酸铵配成水溶液时的原始 pH 值,因此,为了简化实验操作最终选择 pH 为 4.4。在此优化条件下的对照品溶液和样品溶液的分离结果如图 3 所示,实际样品中的杂质与葫芦巴碱分离良好,分析时间较短,适合作为葫芦巴碱的定量检测方法。

2.3 线性关系与定量限

精密吸取 0.5 g/L 的对照品溶液 1 000, 500, 250, 125, 25 μL , 分别置于 5 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释并定容。进样 2 μL , 以色谱峰面积 Y 为纵坐标,对照品质量浓度 X (mg/L) 为横坐标,线性方程为 $Y = 5\ 675X + 4\ 707$, 对照品溶液在 2.50 ~ 100 mg/L 范围内呈现良好的线性关系 ($r = 0.999\ 6$)。

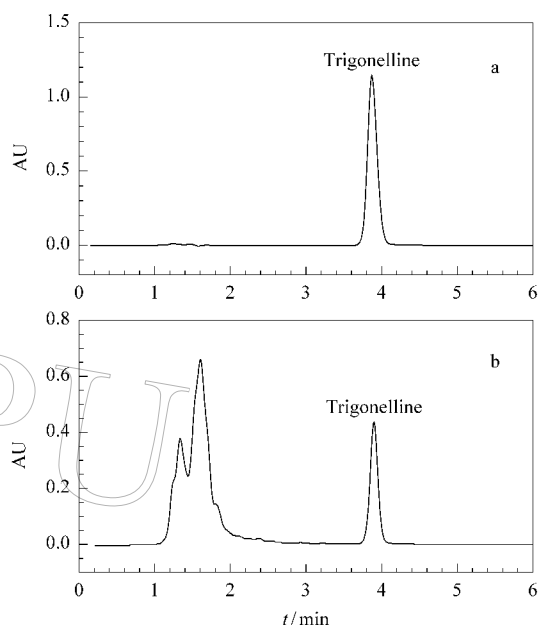


图 3 (a)葫芦巴碱对照品溶液及 (b)葫芦巴样品溶液的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of (a) trigonelline standard and (b) *Trigonella foenum-graecum* L. sample

按 10 倍信噪比 ($S/N = 10$) 计算葫芦巴碱的定量限为 36 $\mu\text{g/g}$ 。

2.4 精密性、稳定性和重复性试验

取质量浓度为 0.1 g/L 的葫芦巴碱对照品溶液重复进样 6 次,记录峰面积,平均值 572 544, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.33%。

精密称取葫芦巴样品 0.1 g, 按 1.3 节所述方法制备供试品溶液,分别在 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 h 测定峰面积,平均峰面积为 252 630, RSD 为 1.31%。表明样品溶液在 12 h 内基本稳定。

精密称取葫芦巴样品 0.1 g, 共 6 份,按 1.3 节所述方法制备供试品溶液,平行操作,测定葫芦巴碱的含量,平均含量为 0.862%, RSD 为 3.64%。

2.5 加样回收试验

精密称取葫芦巴样品 0.1 g, 共 6 份,加入一定量的葫芦巴碱对照品,按 1.3 节所述方法制备供试品溶液,平行操作,测定葫芦巴碱的含量,计算回收率(见表 1),其加样回收率均值为 102%,在两个不

表 1 葫芦巴碱加样回收率测定结果

Table 1 Recoveries of trigonelline

No.	Background/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
1	41.1	29.2	71.9	105	4.17
2	41.1	29.2	69.6	97.6	
3	41.1	29.2	71.8	105	
4	41.0	43.8	85.0	100	2.28
5	41.2	43.8	86.6	104	
6	41.0	43.8	85.0	100	

同的质量浓度水平下的 RSD 分别为 4.17% ($n=3$) 和 2.28% ($n=3$)。

2.6 实际样品测定结果

10 个胡芦巴药材分别采购于全国不同地区,按 1.3 节所述方法制备供试品溶液,测定其胡芦巴碱的含量(表 2),全部达到了药典中对其含量的要求(不得少于 0.45%),符合药材质量标准。

从采摘的胡芦巴药材中分离出种子、果皮、叶、茎 4 个部位,干燥后进行含量测定,胡芦巴碱的含量分别为 0.764%、0.134%、0.08%、0.05%。可以看到胡芦巴碱分布在药材各个部位,其中胡芦巴种子中的含量最高。

表 2 不同产地胡芦巴样品中胡芦巴碱的含量($n=3$)

Table 2 Trigonelline contents in *Trigonella foenum-graecum* L. from different producing areas ($n=3$)

Origin	Content/%
Henan (1)	0.723
Henan (2)	0.711
Anhui (1)	0.679
Anhui (2)	0.658
Hubei	0.600
Gansu	0.691
Sichuan	0.638
Shandong	0.687
Liaoning (1)	0.862
Liaoning (2)	0.764

3 结语

本文采用 HILIC 法检测胡芦巴中胡芦巴碱成分,方法分离效果好、快速简易,可以弥补药典中 IPLC 法平衡时间过长的缺陷,能够准确有效地测定

胡芦巴中胡芦巴碱的含量,为胡芦巴的质量控制提供了有效的方法。HILIC 能够保留传统的 RPLC 检测中无法保留的强极性化合物,是解决强极性化合物保留难题的有效方法。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part 1. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 化学工业出版社), 2005: 167
- [2] Pan R L, Chen D H. World Phytomedicines (潘瑞乐, 陈迪华. 国外医药·植物药分册), 2000, 15(5): 185
- [3] Jiang H, Yin T, Zhao Y Q. Chinese Traditional and Herbal Drugs (姜华, 尹湫, 赵余庆. 中草药), 2008, 39(4): Suppl. 2
- [4] Chopra S, Ahmad F J, Khar R K, et al. Anal Chim Acta, 2006, 577: 46
- [5] Perrone D, Donangelo C M, Farah A. Food Chem, 2008, 110: 1030
- [6] Zhao H Q, Qu Y, Wang X Y, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (赵怀清, 曲燕, 王雪娅, 等. 中国中药杂志), 2002, 27(3): 194
- [7] Liu G X, Shang M Y, Li H, et al. Drug Standards of China (刘广学, 尚明英, 李辉, 等. 中国药品标准), 2005, 6(4): 11
- [8] Alpert A J. J Chromatogr, 1990, 499: 177
- [9] Li R P, Huang J X. Progress in Chemistry (李瑞萍, 黄骏雄. 化学进展), 2006, 18(11): 1508
- [10] Ji H Y, Jeong D W, Kim Y H, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(14): 2127
- [11] Koh H L, Lau A J, Chan E C Y. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(10): 1237
- [12] Wang Y, Gu H X, Lu X, et al. Chinese Journal of Chromatography (王媛, 顾惠新, 路鑫, 等. 色谱), 2008, 26(6): 649