

HPLC 法测定草珊瑚中异美五针松二氢黄酮的含量*

★ 匡蕾¹ 李琴² 陈美兰³ 黄璐琦³ 罗永明² (1. 江西中医学院附属医院 南昌 330006; 2. 江西中医学院药学院 南昌 330006; 3. 中国中医科学院中药研究所 北京 100700)

摘要:目的:建立草珊瑚中主要成分异美五针松二氢黄酮的含量测定方法。方法:采用 Hypersil ODS(4.6 mm×200 mm) 色谱柱;流动相:甲醇-四氢呋喃-水(35:10:55);检测波长:287 nm。结果:平均回收率为 97.44%,1.85% (n=5)。结论:提供了对草珊瑚质量控制的方法。

关键词:草珊瑚;异美五针松二氢黄酮;HPLC

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**B

中药草珊瑚为金粟兰科草珊瑚属植物 *Sarcandra glabra* (Thunb) Nakai, 全草入药, 味辛、苦, 性平, 有小毒, 具有清热解毒、祛风、活血化瘀、通经接骨、止痛等作用^[1], 常以单味药制成制剂在临床中广泛应用。现代研究表明其具有抗菌消炎、抗肿瘤等作用^[2]。我们对草珊瑚进行了系统的化学成分研究, 从中分离得到了萜类、黄酮类和皂苷类等化学成分^[3,4]。其中黄酮类成分是草珊瑚中重要的一类成分, 可能是草珊瑚治疗血小板减少性紫癜的有效成分^[5], 是对草珊瑚药材及其制剂的质量进行控制的指标性成分。但目前草珊瑚制剂采用紫外分光光度法进行测定总黄酮^[6], 该法较易受到干扰, 结果不够准确。为此, 本实验以从草珊瑚中分离得到的异美五针松二氢黄酮 (pinostrobin) 为对照品, 采用外标法首次建立了草珊瑚中异美五针松二氢黄酮的含量测定方法。通过建立对具体的指标成分的含量测定替代对总黄酮的测定, 从而更为准确的对草珊瑚药材及其制剂的质量进行控制。

1 实验药品和仪器

1.1 试剂及药材

对照品异美五针松二氢黄酮为自制, 经高效液相归一法检测其纯度达 99.23%。甲醇为色谱纯, 石油醚, 醋酸乙酯, 四氢呋喃为分析纯, 水为高纯水。

实验用药材 2001 年采自江西省崇仁县, 经江西中医学院中药鉴定教研组的赖学文副教授鉴定为金粟兰科草珊瑚属植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb) Nakai。

1.2 仪器

Waters 高效液相色谱仪, 包括 2956 separation module 四元泵, 在线脱气系统, 自动进样器, 柱温箱, 2999 二极管阵列检测器, Waters millennium32 色谱工作站, KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS(4.6×200 mm) (大连依利特科技有限公司); 流动相: 甲醇-四氢呋喃-水(35:10:55); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 287 nm; 柱温: 28℃。在本色谱条件下异美五针松二氢黄酮的保留时间为 12 min 左右, 峰形较好, 无其它成分干扰。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取异美五针松二氢黄酮对照品 4.86 mg, 置 5 ml 容量瓶中, 加入甲醇并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品, 粉碎过 80 目

* * 基金项目: 江西省自然科学基金(0140015); 江西省教育厅重点课题资助

筛,精密称取 1.0 g,置 50 ml 的锥形瓶中,加甲醇 25 ml,超声处理 50 min,过滤,滤液中加入 5~6 ml 的蒸馏水摇匀,用石油醚萃取,萃取后的溶液蒸干,再用热水溶解,转移于分液漏斗中,待冷却后用水饱和醋酸乙酯萃取 3 次,萃取液蒸干,残渣用甲醇溶解,用 10 ml 的容量瓶定容,以微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.3 线性关系考察

精密吸取对照品溶液 0.6 ml 于 10 ml 的容量瓶中,加入甲醇并稀释至刻度,摇匀,再分别精密吸取 0.1,0.2,0.4,0.8,1.5,3 ml 于 10 ml 容量瓶中加入甲醇至刻度,摇匀。以上稀释的对照品溶液过 0.45 μm 的微孔滤膜,统一进样 20 μl ,按上述色谱条件测定。测定峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标,以对应的异美五针松二氢黄酮的质量(X)为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y = 6 \times 10^6 X + 3853$, $r = 0.9998$ 。表明异美五针松二氢黄酮进样量在 0.012~0.350 μg 之间呈现良好的线性范围。

2.4 稳定性试验

精密吸取同一样品溶液 20 μl ,每隔 2 h 进样一次,共进样 7 次,测得异美五针松二氢黄酮的峰面积的 $RSD = 0.95\%$ 。结果表明样品在 12 个小时内稳定。

2.5 精密度试验

精密吸取异美五针松二氢黄酮对照品溶液,进样 10 μl 连续进样 5 次,测定峰面积,结果 $RSD = 0.56\%$ 。

2.6 重现性试验

取本品同一产地同一份样品,共取 5 份,按供试品溶液制备方法处理制得供试品溶液,测定异美五针松二氢黄酮的含量,结果 $RSD = 2.17\%$ 。

2.7 回收率试验

采用加样回收测定方法,精密称取样品 0.5 g,分别加入一定量的对照品溶液,按供试品溶液制备方法处理制得加样回收供试品溶液,依法测定,计算回收率。求得平均回收率为 97.44%, $RSD = 1.85\%$ ($n = 5$)。

表 1 样品加样回收率实验结果

	称样量/g	含量/mg	加入对照品/mg	测定量/mg	回收率	平均回收率	$RSD(\%)$
1	0.5008	0.0507		0.0987	95.81%		
2	0.5126	0.0519		0.1004	96.89%		
3	0.4916	0.0498	0.0501	0.0974	95.10%	97.44%	1.85%
4	0.5099	0.0516		0.1011	98.75%		
5	0.4949	0.0501		0.1005	100.64%		

2.8 样品测定

精密称取江西省不同产地的草珊瑚样品,按供试品溶液制备方法制备,测定样品中的异美五针松二氢黄酮含量,结果见表 2。

表 2 不同产地的草珊瑚样品含量测定结果

产地	含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
江西省崇义县	0.1013
江西省新干县	0.1211
江西省贵溪县	0.1152
江西省上犹县	0.1179
江西省信丰县	0.1242

3 讨论

3.1 不同提取方法的比较

实验中对提取溶剂(甲醇,乙醇),提取方法(热回流,超声),物料比(25 ml,50 ml),提取时间(20,30,40,50,60,90 min)进行了考察。考察结果表明,采用 25 ml 的甲醇超声处理 50 min 能够将草珊瑚中的异美五针松二氢黄酮充分提取出来。

3.2 色谱条件的优化

对流动相的组成进行了研究,结果发现当用甲醇-水系统,或乙腈-水系统时,异美五针松二氢黄酮峰与其它的峰不能分离,当流动相加入四氢呋喃后,异美五针松二氢黄酮峰与其它的峰达到了基线分离。

本实验通过采用 RP-HPLC 方法对草珊瑚中异美五针松二氢黄酮的含量进行了测定,从而首次建立了草珊瑚中异美五针松二氢黄酮的含量测定方法。本方法操作简便,工作周期短,符合快速检验的原则。通过对草珊瑚中的黄酮成分之一的异美五针松二氢黄酮的含量测定,将能更准确的对草珊瑚药材和制剂中的黄酮类有效成分进行定量检测。

参考文献

- [1] 江苏省新医学院. 中药大辞典[M]. 上册,上海人民出版社,1985:42.
- [2] 刘爱华,罗永明,林燕华. 草珊瑚及其同属植物的研究进展[J]. 中医药通报 2002 1(4):50.
- [3] 罗永明,刘爱华,余邦伟,等. 中药草珊瑚的化学成分研究[J]. 中国药学杂志 2005,40(17):1296.
- [4] YM Luo, AH Liu, DM Zhang, et al. Two New Triterpenoid Saponins from *Sarcandra glabra*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2005, 7(6):829-834.
- [5] 唐春华. 血康口服液中总黄酮甙的稳定性加速试验[J]. 中成药 1999,21(4):170.
- [6] 吕武清,吴朝阳. 肿节风片的质量标准研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2000,17(2):136-138.

(收稿日期:2008-09-01 责任编辑:查青林)