

RP-HPLC 法测定吴茱萸中金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷的含量

潘浪胜, 吕秀阳*, 许海丹, 吴平东

(浙江大学材料与化工学院 制药工程研究所, 浙江 杭州 310027)

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥将近成熟果实。属温里祛寒类中药。有温中散寒、疏肝止痛之功效, 常用于治疗脘腹冷痛、呕吐腹泻、头痛、胃痛、疝痛、腹痛和痛经等^[1]。《本草纲目》称吴茱萸“开郁化滞, 治吞酸、厥阴、痰涎头痛、阴毒腹痛、疝气血痢和喉舌口疮。”近代医学亦证明吴茱萸有镇痛、安神、抗菌、降压和抗缺氧等药理作用^[2]。曾报道了吴茱萸中金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷的分离和鉴定^[3]。现代药理研究认为, 金丝桃苷具有镇痛、解痉等作用^[4], 与吴茱萸的镇痛药理作用一致。本研究采用 RP-HPLC 法建立了吴茱萸中金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷含量的同时测定方法, 对更好地开发吴茱萸药用植物资源具有一定意义。

1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪 (配四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、UV 检测器), R-201 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司), 柱色谱聚酰胺 (100~200 目, 浙江省台州市路桥四青生化材料厂)。

实验所用吴茱萸药材产于湖南浏阳, 由中国中医研究院中药研究所何希荣主管中药师鉴定。HPLC 分析用甲醇为色谱纯 (德国 Merck 公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷对照品由本研究所自制, 用高效液相色谱面积归一法测定其纯度分别为 99.6% 和 98.0%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.5% 磷酸 (50:50); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 360 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷对照品适量, 加甲

醇分别配成含金丝桃苷 0.096 mg/mL、异鼠李素-3-O-半乳糖苷 0.298 mg/mL 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取过 40 目筛的吴茱萸干燥粉末约 5.2 g, 置于索氏提取器中, 加 200 mL 甲醇回流提取 6 h, 减压浓缩至干, 加水溶解, 过聚酰胺柱, 依次用水、10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇洗脱, 洗脱剂的更换根据洗脱液的颜色, 当颜色变为较淡时更换为下一种溶剂。分瓶收集, 收集液进行 HPLC 检测, 合并含金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷组分, 减压浓缩后用甲醇定容至 50 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。其色谱图见图 1。

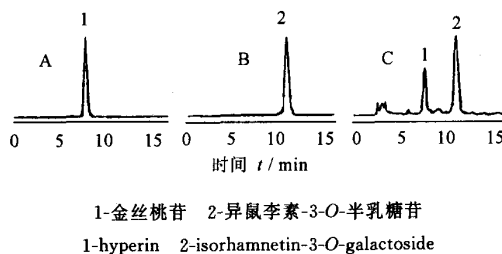


图 1 对照品 (A,B) 及样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A, B) and sample (C)

2.4 标准曲线及线性范围: 将配制的两种对照品溶液分别依次进样 2、5、10、15、20 μL, 按上述色谱条件进行分析, 以进样量 (μg) 为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y) 线性回归, 金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷的回归方程分别为: $Y = 2\,203.21 X - 0.56$, $r = 0.999\,9$; $Y = 1\,613.41 X - 17.32$, $r = 0.999\,9$ 。表明当金丝桃苷、异鼠李素-3-O-半乳糖苷的进样量分别在 0.192~1.92 μg, 0.596~5.96 μg 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验: 精密吸取两种对照品溶液各 10 μL, 在上述选定的色谱条件下, 连续进样 6 次, 测定, 计算得金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.42% 和 1.61% ($n=6$)。

收稿日期: 2004-04-12

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 资助项目 (G1999055405); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20010335029)

作者简介: 潘浪胜 (1972—), 男, 江西丰城人, 浙江大学博士生, 研究方向为天然药物的提取、分离、结构鉴定和含量测定。

* 通讯作者 Tel: (0571) 87952683 E-mail: luxiyang@cmsce.zju.edu.cn

2.6 稳定性试验:精密吸取两种对照品溶液,每隔2 h 进样 10 μ L,连续测定 12 h,结果表明在 12 h 内峰面积值基本稳定。金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.75% 和 1.83%。

2.7 重现性试验:精密称取同一批吴茱萸样品 3 份,按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,测定峰面积,计算得金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷峰面积的 RSD 分别为 2.21% 和 1.63%。

2.8 回收率试验:精密称取已知含量的吴茱萸样品 3 份,分别加入金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷对照品溶液各 20 mL,按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,计算回收率。结果金丝桃苷平均回收率为 96.7%,RSD=2.04% ($n=3$);异鼠李素-3-O-半乳糖苷平均回收率为 97.1%,RSD=1.59% ($n=3$)。

2.9 样品的测定:按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,测定了 3 批样品中金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷,结果见表 1。

表 1 吴茱萸中金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷的测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of hyperin and isorhamnetin-3-O-galactoside in *E. rutaecarpa* ($n=3$)

批号	金丝桃苷		异鼠李素-3-O-半乳糖苷	
	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
1	0.682	1.53	2.635	1.68
2	0.636	1.74	2.387	1.96
3	0.654	1.85	2.504	2.01

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择:吴茱萸中金丝桃苷、异鼠李素-3-O-半乳糖苷含量较低,溶剂提取金丝桃苷的同时,也提取出大量的其他成分,无法直接进样进行色谱测定,必须对提取物进行净化处理。经试验,确定用聚酰胺柱色谱进行净化,收集洗脱部分,进行高效液相色谱测定。在该净化条件下,去除大量杂质,金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷洗脱完全,并能使其基线分离,无杂质峰干扰。

3.2 流动相的选择:实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸-水、乙腈-磷酸-水不同比例洗脱系统,结果发现甲醇-0.5%磷酸(50:50)水溶液的效果最好。流动相中加入磷酸,可抑制黄酮苷酚羟基的电离,改善分离效果,防止拖尾,使峰形尖锐、对称。

3.3 检测波长的选择:金丝桃苷、异鼠李素-3-O-半乳糖苷对照品经紫外扫描,在 360 nm 处均有较大吸收,因此将检测波长确定为 360 nm。

References:

- [1] Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collection. *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.
- [2] Yin J, Lu X Z, Ding L X. *Modern Research and Clinical Application of Chinese Materia Medica* (中药现代研究与临床应用) [M]. Beijing: Xuyuan Press, 1993.
- [3] Pan L S, Lu X Y, Wu P D. Isolation and identification of two flavonoids from *Evodia rutaecarpa* Juss. Benth [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 19-20.
- [4] Zhou Z D, Tian J, Yang S Y, et al. Antispasmodic action of hyperin [J]. *Anhui Med J* (安徽医学), 1990, 11(1): 38-39.

• 新书简介 •

《中药成分代谢分析》

本书是在我国《中药现代化发展战略》和《中药现代化发展战略》(2002—2010)相继出台的历史背景下,在研究分析了中药复杂体系重大学科问题和目前中药现代化与时俱进过程中关键科学问题的基础上,作者系统总结了本研究组的科研成果和国内外相关领域的最新发展动态编写而成。全书主要包括两个部分:总论部分概要介绍了研究中药成分结构生物转化和/或代谢的意义,中药成分结构生物转化和/或代谢的生物学基础、研究模型和分析方法;各论部分主要介绍了某些中药代表性成分结构的生物转化和/或代谢及性质,包括来源、化学名、异名、英文名、结构式、分子式及相对分子质量、肠内菌转化、体内代谢、化学结构数据、生物活性、定性定量分析及体内分布和药代动力学。

作者:杨秀伟 郝美荣 定价:118.00

出版社:中国医药科技出版社 地址:北京市海淀区文慧园北路甲 22 号 邮编:100088

发行部电话:总机 010—62213421 62244206 62214756 传真:总机转 31