

高效液相色谱法测定雪莲细胞培养组织中黄酮含量

中国林科院森林生态环境研究所(北京 100091) 王文芝*

摘 要 提出用反相液相色谱法分离并定量从雪莲细胞培养组织中提取的 4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮和 4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮含量,并对分离机理进行初步探讨。

关键词 雪莲 高效液相色谱 黄酮 含量测定

雪莲为菊科植物绵水母雪莲花 *Saussurea medusa* 的全草,是名贵的中草药,具有补肾壮阳,调经止血之功效^[1~4]。雪莲中含有丰富的黄酮甙及黄酮类化合物,这又使雪莲具有强心降血压功能。但由于雪莲只在海拔 4000 m 以上地域生长,又是我国三类珍稀植物,所以作为药用受到极大限制。中科院植物所赵德修先生通过细胞培养得到雪莲细胞培养组织,为雪莲的药用开辟了前景。我们利用高效液相色谱法分离并定量了雪莲细胞培养组织中两种黄酮化合物,快速,准确,并对分离机理进行初步探讨。

1 仪器和试剂

Waters 244 型高效液相色谱仪, M510 泵, UV486 紫外检测器, U6K 通用进样器, M730 数据处理机, 所用试剂均为优级纯, 水重蒸, 经 0.45 μm 滤膜过滤。两种黄酮对照品, 色谱纯(Sigma 公司)。

2 样品制备

2.1 标准样品:精密称取 4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮和 4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮各 1 mg 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容摇匀备用。

2.2 样品制备:精密称取雪莲细胞培养组织

1.0 g 研细后转入 100 mL 锥形瓶,加入 25 mL 80% 甲醇回流 1 h,过滤,定容至 25 mL,滤液经 0.45 μm 滤膜过滤后待分析。

3 测定

3.1 色谱条件:柱为 ZORBAX RX-C₁₈ (0.46×25 cm),流动相为 90% 甲醇-10% 水(用磷酸调其 pH~4),流速 0.7 mL/min,检测器:UV365 nm,0.1 AUFS。

3.2 标准曲线绘制:精密吸取两种黄酮标准液 4、8、12、16、20 μL 分别进样(图 1A),以进样量为横坐标,峰高为纵坐标作标准曲线,4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮回归方程为 $Y = 2.4X - 0.004$, $r = 0.9990$;4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮回归方程为 $Y = 3.0X - 0.003$, $r = 0.9982$,二者在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

3.3 精密度实验:精密吸取两种黄酮标准品 5 μL ,重复进样 5 次,测得峰高值 4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮变异系数 1.24%,标准偏差 0.38;4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮变异系数 1.12%,标准偏差 0.32。

3.4 样品测定:精密吸取供试样品溶液 10 μL 进样分析,(图 1B)外标法计算两种黄酮含量。

* Address: Wang Wenzhi, Institute of Forest, Ecology and Environment, Chinese Academy of Forestry, Beijing

王文芝 女,1969 年毕业于北京大学化学系有机化学专业。现任中国林科院森林生态环境研究所所长,高级工程师。1980 年以来一直从事高效液相色谱分析工作。在医药,农药,有机反应历程,食品营养成分,植物内源激素等方面分析有独到之处。1994 年以副主编出版专著《现代实用仪器分析方法》,主笔第二章“高效液相色谱法”,文中 103 个分析方法中有 82 个为作者首次提出。先后在《分析化学》、《色谱》、《中草药》等杂志上发表论文二十余篇。

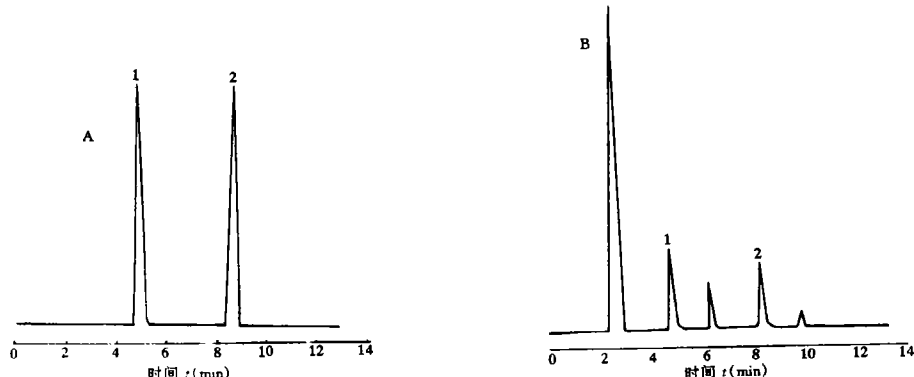


图1 样品色谱图

A-黄酮标准品 B-样品色谱 1-4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮 2-4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮

3.5 回收率实验:精密吸取标准对照液 50 μL 于已精密称量好的雪莲细胞培养组织中,重复样品制备过程,得到供试液。精密吸取 10 μL 供试液进样分析,计算两种黄酮回收率,结果,4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮回收率 95%,4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮回收率 93%。

4 结果与讨论

4.1 色谱条件选择:两个化合物在反相 C_{18} 柱上都会有较强保留值,但二者之间相差一个甲氧基,只要调整好流动相中甲醇比例,二者会很好分离,所以首先确定采用反相液相色谱法。在流动相的选择上我们也做了大量实验,首先用 70% 甲醇 30% 水为流动相,结果是 4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮 40 min 后被洗脱,而 4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮不能被洗脱,显然是流动相强度不够,当流动相中甲醇含量高于 80%,二者能被洗脱,我们选用 85% 甲醇 15% 水为流动相时,4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮 4.8 min 出峰,而 4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮 8.3 min 出峰,二者分离度大于 1。我们考虑到这两个黄酮分子中均有三个酚羟基,有一定酸性,所以流动相用适量磷酸调节 $\text{pH} \sim 4$,峰形窄而对

称性好。黄酮化合物在紫外 365 nm 有较强吸收,在这个波长下,可避免一些较低波长吸收物质干扰,使定量更准确,所以实验中选用紫外 365 nm 处检测。

4.2 分离机理探讨:从分子结构上分析 4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮比 4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮多一个甲氧基,而甲氧基是吸电子基团,所以前者分子极性低,而且由于分子中多一个甲氧基基团,分子空间体积加大,对称性好,因而 4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮在 C_{18} 柱上保留值应大于 4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮,实验证明在选定的色谱条件下,4',5,7-三羟基-6-甲氧基黄酮出峰在前,4',5,7-三羟基-3,6-二甲氧基黄酮出峰在后。

此方法用于雪莲细胞提取液的分离,结果令人满意。

参考文献

- 1 北京医学院药理教研室. 北京医学院学报, 1976(11):43
- 2 林秀珍,等. 药学报, 1986,21(4):222
- 3 崔志涛,等. 中草药, 1995(5):247
- 4 中国林科院分析中心. 现代实用仪器分析方法. 北京:中国林业出版社, 1994.

(1997-03-28 收稿)

Determination of the Content of Flavonoids in Tissue Cultural Media of *Medusa Saussurea* (*Saussurea medusa*) Cells by RP-HPLC

Wang Wenzhi

Determination of the contents of Hispidulin and Jaccoside in cultural tissue media of *Saussurea medusa* by