

文章编号: 1006-2858(2010)11-0902-03

HPLC法测定苗族药材飞龙掌血中白屈菜红碱含量

杨亮¹, 郭晶², 范宝成¹, 时邵静³, 张朋³

(1. 贵阳昊臻药物开发有限公司, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵阳市宏信药业职业学校, 贵州 贵阳 550025;
3. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 目的 建立 HPLC法测定飞龙掌血药材中白屈菜红碱含量并应用于药材测定。方法 采用十八硅烷基键合硅胶为填充剂的色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-体积分数为 0.1% 的磷酸水溶液(体积比为 20:80), 测定波长: 274 nm, 柱温: 30 ℃。结果 线性为 1.2~12 mg L⁻¹, 平均回收率为 100.4%。结论 所建立的 HPLC方法可用于测定飞龙掌血药材中白屈菜红碱含量。

关键词: 飞龙掌血; 白屈菜红碱; 高效液相色谱法
中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

飞龙掌血^[1]为贵州苗族用药, 原植物为芸香科植物飞龙掌血 [*Toddalia asiatica* (L.) Lam.] 干燥根皮。味微苦、辛、温, 具有祛风止痛、散瘀止血、消肿解毒的功效, 用于治疗风湿痹痛、胃痛、跌打损伤、吐血、刀伤出血、痛经、闭经、牙龈出血及口舌生疮。文献[2]报道根皮含生物碱: 白屈菜红碱(chelerythrine)、二氢白屈菜红碱(dihydrochelerythrine)、7,8-二甲氧基-2,3-次甲基二氧苯基[c]菲啶(7,8-dimethoxy-2,3-methylenedioxybenzo[c]phenanthridine)、茵芋碱(skinnianine); 另含香豆素衍生物: 飞龙掌血内酯(toddalactone)、飞龙掌血异戊烯内酯(toddaculline)、茵苻香豆素(pimpinellin)、异茵苻香豆素(isopimpinellin), 及橙皮苷等。白屈菜红碱硫酸盐具抗病毒活性及对金黄色葡萄球菌有抑制作用^[3], 可作为飞龙掌血药材的指示性成分。白屈菜红碱含量测定的研究至今尚未见报道。本文作者期望通过建立飞龙掌血中白屈菜红碱的含量测定方法, 为飞龙掌血药材标准的修订提供实验依据, 促使民族药材飞龙掌血的管理规范化、标准化和科学化, 以便进一步提高飞龙掌血的质量。

1 仪器与试剂

HPLC仪(UV-200II紫外可变波长检测器, P-200高压恒流泵 大连依利特科学仪器有限公司)

收稿日期: 2010-05-24

作者简介: 杨亮(1972-), 男(汉族), 贵州贵阳人, 硕士研究生, 主要从事新药研发及药学技工教育工作, Tel 0851-8292192, E-mail hongxinzhixiao@163.com; 郭晶(1974-), 女(汉族), 辽宁铁岭人, 硕士, 主要从事新药研发及药学技工教育工作, Tel 0851-8293192, E-mail xinda888@sohu.com。

司), 色谱柱为 C₁₈柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm, 北京 DKMA 公司), Easy-3000 色谱工作站(浙江大学), TU-1800SPC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), AUW-120D 电子天平(0.000 01 g 日本 Shimadzu 株式会社), 101-2A 型电热鼓风恒温干燥箱(上海市崇明实验仪器厂), AS-3120 超声清洗仪(天津津腾实验仪器厂)。

乙腈(色谱纯, 天津科密欧化学试剂公司), 磷酸(分析纯, 贵阳磷山化工集团)。

白屈菜红碱对照品(供含量测定用, 纯度质量分数为 97.3%, 中国药品生物制品检定所), 飞龙掌血对照药材(贵州省药品检验所), 飞龙掌血药材(分别采自贵阳高坡乡、息烽县、织金县、兴义市、大方县, 经贵州宏信药业技工学校周焕新中药师鉴定)。

2 方法及结果

2.1 对照品溶液制备

精密称取白屈菜红碱对照品 10.43 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得 104.3 mg L⁻¹ (ρ) 的对照品储备液。精密量取储备液 3.0 mL 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成约 6 mg L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

取飞龙掌血药材粉末约 1 g 精密称定, 置

100 mL 圆底烧瓶中, 加甲醇 20 mL, 回流提取 30 min, 滤过, 滤液置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得供试品溶液。

2.3 测定波长的选择

取对照品溶液, 以甲醇液为空白, 用紫外-可见分光光度计扫描, 结果表明白屈菜红碱在 274 nm 的波长处有较大吸收峰, 故选择 274 nm 作为测定波长。

2.4 色谱条件

参考文献 [4] 方法, 采用十八硅烷基键合硅胶为填充剂的反相色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-体积分数为 0.1% 的磷酸水溶液 (体积比为 20:80) 为流动相, 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 柱温: 30°C, 进样量: 10 μL, 测定波长: 274 nm。

2.5 系统适用性考察

吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 分别注入 HPLC 仪, 记录色谱图, 按白屈菜红碱峰计算, 理论板数为 5 210, 白屈菜红碱峰与相邻峰分离度大于均 1.5 分离良好 (图 1、2)。

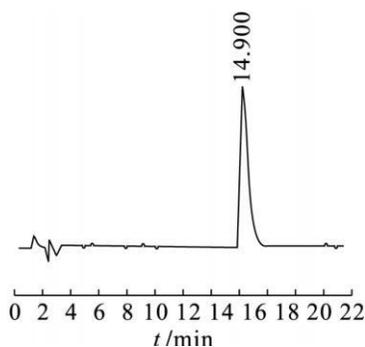


Fig 1 HPLC chromatogram of chelerythrine

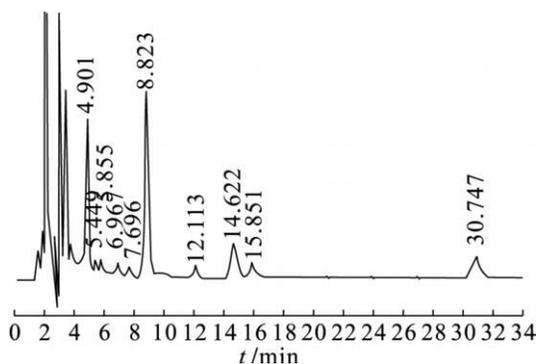


Fig 2 HPLC chromatogram of cortex toddalia

2.6 线性关系考察

分别精密吸取对照品储备液 0.6、1.5、3.0、4.5 及 6.0 mL, 分置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 分别取 10 μL 注入高效液相色谱仪,

记录色谱图, 以峰面积 (A) 对质量浓度 (ρ / mg L^{-1}) 作图, 制备标准曲线, 得回归方程为: $A = 3.3 \times 10^5 \cdot \rho - 1435$ ($r = 0.9999$), 白屈菜红碱在 1.252~12.520 mg L^{-1} 内呈良好线性。

2.7 精密度考察

吸取对照品溶液 10 μL 进样, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 结果 RSD 为 0.61%, 表明仪器的精密度良好。

2.8 溶液稳定性考察

取对照品溶液分别于 0、1、2、3、4 h 进样 10 μL, 记录色谱图, 考察溶液稳定性, 结果表明, 对照品溶液在 4 h 内稳定。

2.9 重复性考查

取同一批 (息烽) 的飞龙掌血药材样品 5 份, 每份约 1 g 精密称定, 测定含量, 测定结果 RSD 为 1.16%, 含量测定方法重复性良好。

2.10 药材含量测定

取 5 个产地药材, 测定含量, 测定结果见表 1。

Table 1 Content of chelerythrine in different samples ($n = 5$)

1	Origin (Guizhou)	w / %
2	Xingyi	35.6
3	Zhijin	31.1
4	Gaopo	29.7
5	Xifeng	33.4
6	Dafang	32.9

2.11 回收率测定

分别取同一样品 (息烽) 粉末约 0.3、0.5、0.7 g 精密称定, 分别精密加入质量浓度为 0.1043 g L^{-1} 白屈菜红碱对照品溶液 1.0、1.5、2.2 mL, 测定含量, 计算平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.32%。

3 讨论

a. 本实验中, 作者考察了体积分数为 95% 的乙醇溶液和甲醇 2 种溶剂的提取效果, 结果甲醇提取效果明显优于体积分数为 95% 乙醇。提取方法考察了甲醇超声提取和水浴回流提取 2 种提取方式, 结果 2 种提取方式提取效果无明显差别, 故选择超声提取。提取时间上考察了超声 15、30、60 min, 结果超声 15 min 效果较差, 30 min 及 60 min 提取效果无明显差别, 故选择超声提取 30 min。

Table 2 Recovery rate of detem ination of content of chelerythrine in Toddaliae Cortex (n = 9)

Group	w /%	m_{mass} /mg	$m_{equivalency}$ /mg	m_{added} / μ g	m_{result} /mg	Recovery /%
1	33.4	291.44	0.097	104.3	0.203	101.40
		299.42	0.100		0.204	99.69
		300.03	0.100		0.207	102.48
2	33.4	491.03	0.164	156.45	0.320	99.72
		494.92	0.165		0.320	98.94
		504.71	0.169		0.324	99.39
3	33.4	694.30	0.232	229.46	0.460	99.42
		706.63	0.236		0.467	100.65
		704.07	0.235		0.470	102.29
\bar{x} /%						100.4%
RSD /%						1.32%

b. 本文作者首次对民族药材飞龙掌血进行了含量测定研究, 为飞龙掌血药材标准的修订提供一定的实验依据。

参考文献:

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 63-64.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草苗药卷 [M]. 贵阳: 贵州科技出版, 2006: 60-62.

[3] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 279-282.

[4] 安彩贤, 杨广德, 叶建涛, 等. RP-HPLC法同时测定小果博落回中血根碱和白屈菜红碱的含量 [J]. 中成药, 2001, 11(23): 824-825.

Detem ination of content of chelerythrine in Toddaliae Cortex by HPLC

YANG Liang¹, GUO Jing², FAN Bao-cheng¹, SHI Shao-jing³, ZHANG Peng³

(1. Guiyang Hao Zhen Pharmaceutical Development Co., Ltd., Guiyang 550025, China; 2. Guiyang Hong Xin Pharmaceutical Vocational Schools, Guiyang 550025, China; 3. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for detem ination of chelerythrine in Toddaliae Cortex (Toddalia asiatica (L.) Lam.). **Methods** The separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μ m) with acetonitrile-0.1% (φ) phosphoric acid (V:V = 20:80) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 274 nm and the column temperature was 30°C. **Results** There were good linear relationships between the concentrations and the peak areas of chelerythrine in the range of 1.2-12.0 mg · L⁻¹ (r = 0.9999). The recoveries were found to be 100.4% with RSD of 1.32% (n = 9); **Conclusions** The results of the experiments have demonstrated that the developed method is rapid and simple with good accuracy and reproducibility for the detem ination of chelerythrine in Toddaliae Cortex. This method is suitable for the quality control of Toddaliae Cortex.

Key words Toddaliae Cortex; chelerythrine; HPLC