RP－HPLC 法测定苦木药材中 4－甲氧基－5－羟基铁屎米酮的含量*

赵文娜，余静洁，张新新，陈琳，孙文基**

(西北大学 陕西省生物医药重点实验室，西安 710069)

摘要 **目的:**建立 RP－HPLC 法测定苦木药材中 4－甲氧基－5－羟基铁屎米酮含量。**方法:**采用 Welchrom C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)色谱柱，以乙腈－0.1%醋酸水溶液(30∶70)为流动相，流速 1.0 mL·min^{-1}，紫外检测器检测，检测波长 254 nm，柱温 30 ℃。**结果:**4－甲氧基－5－羟基铁屎米酮浓度在 12.0～240.0 μg·mL^{-1}(r=0.9999)范围内与峰面积呈良好的线性关系，平均回收率(n=6)为 101.2%，RSD 为 2.3%。**结论:**该方法简便、准确、灵敏，为 2015 年版中国药典一部增订苦木含量测定项提供参考。

关键词:反相高效液相色谱法；苦木；4－甲氧基－5－羟基铁屎米酮；含量测定；质量控制；标准完善

中图分类号:R917　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**0254－1793(2012)07－1239－04

RP－HPLC* determination of 4－methoxy－5－hydroxycanthin－6－one in herbal medicines *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn.

ZHAO Wen－na, YU Jing－jie, ZHANG Xin－xin, CHEN Lin, SUN Wen－ji[1]**

(Biomedicine Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract **Objective:** To develop an HPLC method for the determination content of 4－methoxy－5－hydroxycanthin－6－one in *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn.. **Methods:** Welchrom C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was adopted and the mobile phase was mixture of acetonitrile and 0.1% acetic acid(30∶70) with the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}; The detection wavelength was 254 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results:** The calibration curve was linear in the range of 12.0－240.0 μg·mL^{-1} for 4－methoxy－5－hydroxycanthin－6－one(r=0.9999), and the average recovery was 101.2% with RSD of 2.3%. **Conclusions:** This method is simple, accurate, sensitive, which can offer references for the quality control of herbal medicines *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. in China Pharmacopoeia(2015 Edition).

Key words: RP－HPLC; *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn.; 4－methoxy－5－hydroxycanthin－6－one; assay; quality control; standard improvement

苦木为苦木科(Simaroubaceae)植物苦木 Picrasma quassioides (D. Don) Benn.的干燥枝及叶，以苦味著称，其具有清热祛湿、解毒消肿的功效，用于风热感冒、咽喉肿痛、湿热泻痢、湿疹、毒蛇咬伤等[1]。苦木主要分布于我国黄河流域以南各省区，其中广东和广西的山区资源比较丰富，生长在山坡、山谷及村边较潮湿处，我国川陕地区分布也较多，药源十分丰富[2]。

苦木化学成分主要包括生物碱、苦味素、苦木内酯等[3－8]。作者在对苦木化学成分进行了系统分离和结构鉴定的基础上，发现了 4－甲氧基－5－羟基铁屎米酮是苦木药材的主要化学成分，具有显著的抑菌作用[9,10]，并且以往文献中[11,12]并无简便的苦木药材中 4－甲氧基－5－羟基铁屎米酮的含量测定方法，因此，本文把其作为苦木的活性成分，探索了一种简便的含量测定方法并测定它在不同来源苦木中的含量。由于 2010 年版中国药典中还没有苦木药材的含量测定项，属标准缺项药材，本文所建立的方法将为 2015 年版中国药典中苦木的质量控制和评价提供参考。

* 西北大学研究生创新基金项目(10YZZ34)

** 通讯作者 Tel:(029)88304569；E－mail:cxbml@nwa.edu.cn

1 仪器与试药

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪,包括 Waters 2487 紫外检测器,Empower 色谱工作站;赛多利斯 BT25S(max = 21 g,d = 0.01 mg)和天东衡 HTX 1001 T 型(max = 1 kg,d = 0.1 g)电子天平;昆山 KQ - 500 DE 型数控超声波清洗机;美国 MILLI - PORE 公司超纯水发生器。

苦木药材样品购自西安万寿路药材市场,经陕西省生物医药重点实验室王亚洲副教授鉴定为苦木科植物苦木 *Picrasma quassioides*(D. Don)Benn. 的干燥枝及茎。对照品 4 - 甲氧基 - 5 - 羟基铁屎米酮为实验室自制,并经 UV、IR、NMR 鉴定结构;HPLC 检测,面积归一化法计算纯度,均 > 99%。甲醇和乙腈为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司),冰醋酸为分析纯(西安化学试剂厂),水为超纯水(自制,并经 0.45 μm 水系滤膜过滤)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取 4 - 甲氧基 - 5 - 羟基铁屎米酮 4.80 mg 于 20 mL 量瓶中,以甲醇定容制成对照品溶液,4 ℃冷藏,备用。

2.1.2 供试品溶液 精密称取苦木药材粉末(过 20 目筛)约 1.0 g 于具塞三角瓶中,加入甲醇 20 mL 后称定重量,超声(400 W,40 kHz)处理 30 min,放置至室温,称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀并静置后取上清液约 1.5 mL,微孔滤膜(0.45 μm)过滤,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱:Welchrom C_{18}(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液(30∶70);流速:1.0 mL · min^{-1};紫外检测波长:254 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 分别取对照品储备液、供试品溶液各 20 μL,按"2.2"项下色谱条件测定,记录色谱图(见图 1),药材中其他色谱峰对 4 - 甲氧基 - 5 - 羟基铁屎米酮色谱峰无干扰,理论塔板数为 3136,4 - 甲氧基 - 5 - 羟基铁屎米酮色谱峰能达到基线分离,峰形对称,基线平稳。

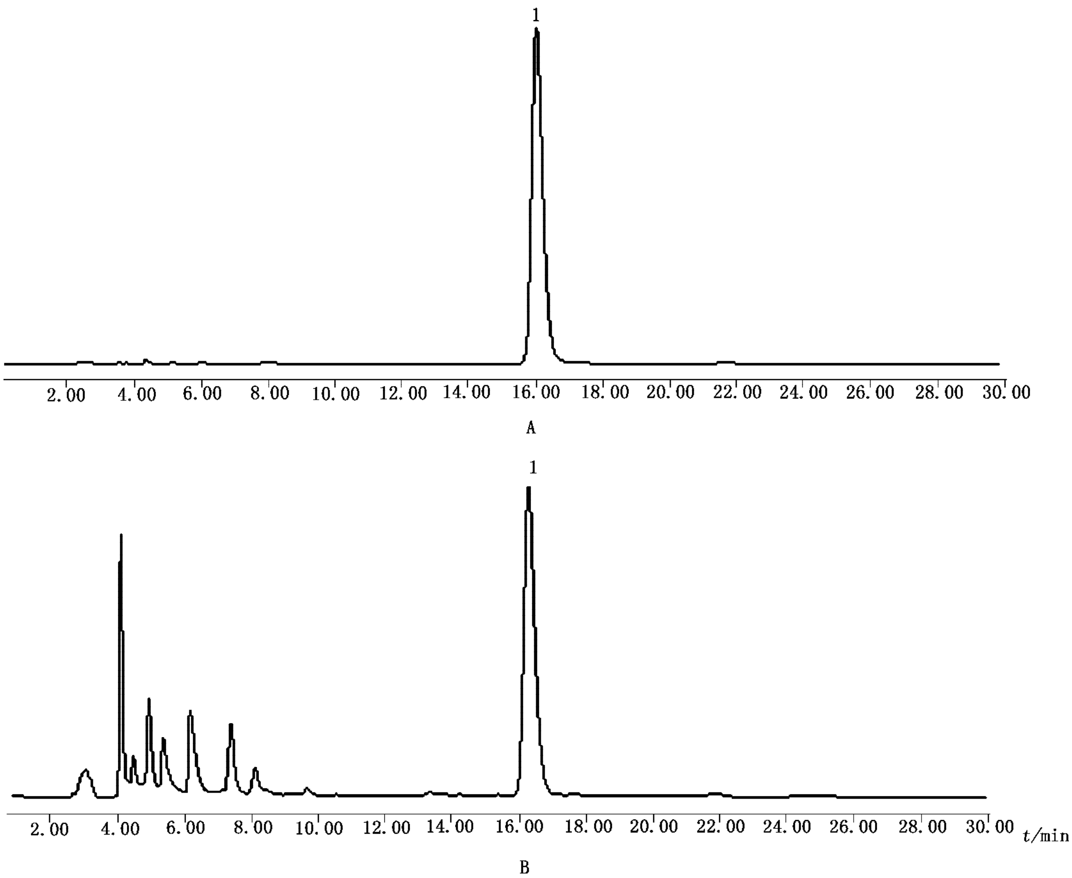

图 1 对照品(A)和 1 号苦木样品(B)HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A) and *Picrasma quassioides*(D. Don) Benn. sample No.1(B)

1. 4 - 甲氧基 - 5 - 羟基铁屎米酮(4 - methoxy - 5 - hydroxycanthin - 6 - one)

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取对照品储备液适量,以甲醇配制成浓度为 12.0,24.0,48.0,96.0,144.0,192.0,240 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的系列对照品溶液。分别精密吸取上述溶液 20 μL 进样,以峰面积积分值 Y 为纵坐标,以进样浓度 X ($\mu g \cdot mL^{-1}$) 为横坐标进行线性回归,结果 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮回归方程为:

$$Y = 7.617 \times 10^4 X + 1.150 \times 10^5 \qquad r = 0.9999$$

4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮进样浓度在 12.0 ~ 240.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的范围内与峰面积的积分值具有良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL,按"2.2"项下色谱条件,连续进样 6 次,测定 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮峰面积值的 RSD 为 0.5%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取 1 号样品粉末约 1.0 g 共 6 份,按"2.1.2"项下方法制备供试品溶液,按"2.2"项下色谱条件进样分析,计算样品 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮峰面积值的 RSD 为 1.2%。说明该方法的重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 20 μL,分别于 0,2,4,8,12,24 h 在上述色谱条件下进样测定,记录峰面积。计算样品中 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮峰面积的 RSD 为 1.3 %,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的 2 号苦木样品粉末约 0.5 g,共 6 份,每份分别加入浓度为 32.4 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮对照品溶液 20 mL,按"2.1.2"项下方法制备溶液,按"2.2"项下色谱条件测定,计算回收率($n = 6$)。结果 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮的回收率为 101.2%,RSD 为 2.3%。

2.4 样品测定 取不同产地的苦木样品各 3 份,分别按"2.1.2"项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,每份溶液进样 2 次。根据峰面积值从标准曲线方程计算不同来源苦木药材中 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮的含量,结果见表 1。

表 1 不同来源苦木中 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮的含量测定结果($mg \cdot g^{-1}$, $n = 3$)

Tab 1 Contents of 4-methoxy-5-hydroxycanthin-6-one in *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. from different sources

样品编号(sample)	来源(source)	含量(content)
1	大别山(Dabieshan)	4.29
2	陕西西安(Xi'an, Shaanxi)	1.29
3	安徽亳州(Bozhou, Anhui)	0.60
4	广西(Guanxi)	0.95
5	广西(Guangxi)	0.45
6	山西(Shanxi)	1.75
7	安徽亳州(Bozhou, Anhui)	0.33
8	四川(Sichuan)	0.45
9	河南(Henan)	1.04
10	湖北(Hubei)	0.55

3 讨论

本文参考文献[11]采用 210 nm 为紫外检测波长,结果 4-甲氧基-5-羟基-铁屎米酮吸收峰较小,而且溶剂峰及杂峰干扰较大,通过全波长扫描发现其在 250 nm 附近有最大吸收,参考文献[12,13]决定用 254 nm 作为其检测波长。

采用乙腈-0.1%磷酸水溶液(35:65)[11]测定苦木药材中 4-甲氧基-5-羟基-铁屎米酮的含量,结果 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮与样品中其他成分分离不够好,而且峰形较宽,拖尾。实验又考察了乙腈-0.1%醋酸水溶液(40:60)、乙腈-0.1%醋酸水溶液(35:65)、乙腈-0.1%醋酸水溶液(30:70)以及柱温(25 ℃、30 ℃、35 ℃)对分离效果的影响,乙腈-0.1%醋酸水系统使其与其他成分达到了基线分离,通过比较不同参数的色谱图的分离度、保留时间,得到的最佳色谱条件为:乙腈-0.1%醋酸水溶液(30:70),流速 1.0 $mL \cdot min^{-1}$,柱温 30 ℃。本文所建立的方法具有良好的精密度和简便性,适合于测定苦木药材中 4-甲氧基-5-羟基-铁屎米酮的含量。

由表 1 可见,不同来源的 10 批样品中 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮的含量范围在 0.33 ~ 4.29 $mg \cdot g^{-1}$,表明不同来源的苦木药材中 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮的含量变化较大,这可能与植物基原,生长环境,存储条件等因素有关。10 份样品中4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮的含量最高为 4.29 $mg \cdot g^{-1}$,最低仅为 0.33 $mg \cdot g^{-1}$,4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮的含量限度宜定为不低于 0.40 $mg \cdot g^{-1}$。由于本文只抽取了 10 批次的药材进行含量测定,有关含量限度的研究不够深入,有待进一步研究。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2010. Vol Ⅰ(一部):186

2 ZENG Gan－lin(曾赣林),WEI Ben－zhu(魏本柱),SONG Rui－ping(宋瑞萍). Present situation and protection countermeasure of *Picrasma quassioides*(苦木资源现状与保护对策). *Jiangxi Forest Sci Technol*(江西林业科技),2005,3:44

3 Omoto T,Koike K. Studies on the constituents of *Picrasma quassioides* Bennet. Ⅲ. The Alkaloidal Constituents. *Chem Pharm Bull*,1984,32(9):3579

4 Omoto T,Koike K. Studies on the constituents of *Picrasma quassioides* Bennet. Ⅰ. On the aalkaloidal constituents. *Chem Pharm Bull*,1982,30(4):1204

5 YANG Jun－shan(杨俊山),LUO Shu－rong(罗淑荣),CHEN Xiu－lan(沈秀兰),*et al*. Chemical investigation of the alkaloids of KU－MU [*Picrasma quassioides* (D. Don) Benn.](苦木生物碱的化学研究). *Acta Pharm Sci*(药学学报),1979,14(3):167

6 CHEN Meng(陈猛),FAN Hua－ying(范华英),DAI Sheng－jun(戴胜军),*et al*. Alkaloids from twigs and leaves of *Picrasma quassioides*(苦木生物碱的化学研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2007,38(6):807

7 Tatsushi M,Akihiko S,Takahiko T,*et al*. Structures of nigakihemiacetals E and F. *Chem Pharm Bull*,1975,23(9):2188

8 Hiroshi H,Tomihisa O,Tsunematsu T. Stereostructure of picrasin G,simaroubolide of *Picrasma quassiolides*. *Chem Pharm Bull*,1971,19(12):2651

9 LIU Jun－feng(刘军峰),SHAO Meng(邵萌),LI Jing－yuan(李景源),*et al*. RP－HPLC method to assess the inhabition of alkaloids in *Picrasma quassioides* on phosphodiesterase 4 *in vitro*(RP－HPLC 测定苦木生物碱体外对磷酸二酯酶 4 的抑制活性). *Mod Chin Med*(中国现代中药),2009,11(3):30

10 CHEN Meng(陈猛),FAN Hua－ying(范华英),DAI Sheng－jun(戴胜军),*et al*. Alkaloids from *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. and their anti－inflammatory and antibacterial activities(苦木生物碱抗菌活性成分的研究). The Proceedings of Academic Seminar on Innovative Drugs and the Development and Research of New Drugs(创新药物及新品种研究、开发学术研讨会论文集). Chinese Pharmaceutical Association(中国药学会),2006

11 LÜ Wu－qing(吕武清),HUANG Wei－dong(黄卫东),SONG You－xin(宋友昕). The determination of alkaloid in *Picrasma quassioides*(D. Don) Benn. by HPLC(HPLC 法测定苦木药材中铁屎米酮生物碱). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2009,40(8):1321

12 LAI Zheng－quan(赖正权),OU Guo－deng(欧国灯),XIAO Shu－xiong(肖树雄),*et al*. HPLC simultaneous determination of three active ingredients in Kumu injection(HPLC 法同时测定苦木注射液中三种活性成分的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2011,31(1):15

13 LUO Wen－yu(罗文毓),ZHANG Yu－zhong(章育中). Separation and determination of five alkaloids in KU－MU(*Picrasma quassioides*(D. Don. Benn.) by HPLC(苦木中生物碱的高效液相色谱分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),1985,5(1):11

(本文于 2011 年 6 月 22 日收到)

(上接第 1238 页)

2 ZHAO Xin－feng(赵新峰),SUN Yu－qing(孙毓庆). Micellar electrokinetic chromatographic determination of morroniside and loganin in the traditional Chinese medicine *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.(胶束电动毛细管色谱法测定山茱萸中莫罗苷和番木鳖苷的含量). *Chin J Phamar Anal*(药物分析杂志),2007,27(8):1154

3 Wang W,Sun FL,An Y,*et al*. Morroniside protects human neuroblastoma SH－SY5Y cells against hydrogen peroxide－induced cytotoxicity. *Eur J Pharmacol*,2009,613(1－3):19

4 Yamabe N,Noh JS,Park CH,*et al*. Evaluation of loganin,iridoid glycoside from Corni Fructus,on hepatic and renal glucolipotoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. *Eur J Pharmacol*,2010,648(1－3):179

5 HU Ruo－qi(胡若琪),RAO Xian－yi(饶娴宜). Preventive effect of sweroside on acute hepatic lesion induced by *D*－galactosamine in rats(獐牙菜苷对 *D*－氨基半乳糖所致急性肝损伤的保护作用). *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床),1988,4(3):41

6 HE Juan－ni(贺娟妮),LIU Xiao(刘晓),MOU Zhao－li(牟朝丽),*et al*. Optimization of microwave－assisted extraction with RSM and HPLC determination for three iridoid glycosides in *Cornus officinalis*(山茱萸中 3 种环烯醚萜苷的响应曲面优化微波提取及 HPLC 测定). *J Chin Med Mater*(中药材),2011,34(7):1118

7 ZHAO Ping(赵平),YAN Run－hong(闫润红),LIU Yang－qing(刘养清),*et al*. Analysis on contents of loganin and morroniside in cultivated and wild Fructus Corni(栽培与野生山茱萸中马钱苷和莫诺苷含量分析). *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2009,15(4):7

8 CHEN Xue－yan(陈学艳),WANG Yan(王艳),LI Jing(李晶),*et al*. determination of morroniside and loganin in fructus corni by different processes(山茱萸不同炮制品中莫诺苷和马钱苷含量测定). *Tianjin J Tradit Chin Med*(天津中医药),2010,27(3):254

(本文于 2011 年 6 月 20 日收到)