

RP-HPLC 法测定月腺大戟 (狼毒) 中 2 种活性成分

袁海建^{1,2}, 程林兵^{2,3}, 蔡宝昌^{2*}, 李俊松², 陈宜刚¹

(1. 泰州职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029; 3. 福建农林大学, 福建 福州 350002)

摘要: 目的 用反相高效液相色谱法测定月腺大戟中 2 种活性成分。方法 采用 Welchrom-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 290 nm 下检测, 21 min 内分离了狼毒丙素、狼毒乙素。结果 狼毒乙素定量测定的线性范围为 0.000 6 ~ 0.21 μg (r = 0.999 9); 狼毒丙素定量测定的线性范围为 0.007 8 ~ 0.273 μg (r = 0.999 9)。结论 方法简便、准确, 结果稳定、重复性好。

关键词: 反相高效液相色谱法; 月腺大戟; 狼毒乙素; 狼毒丙素

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2012)07-1396-03

月腺大戟为大戟科 Euphorbiaceae 大戟属 *Euphorbia* 月腺大戟 *Euphorbia ebracteolata* Hayata. 的块状根, 是中药狼毒的原植物之一。具有抑菌杀虫^[1-2] 作用, 民间还用于抗结核^[3] 和抗肿瘤^[4-5] 等。近年来的研究^[6] 表明, 其主要有效成分^[7] 有狼毒乙素、狼毒丙素等化合物。为了更好的控制狼毒药材的质量, 本实验报道了月腺大戟中狼毒乙素、狼毒丙素两种有效成分的 HPLC 的分析方法, 在实际样品的分析中取得了满意的结果。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括柱温箱、在线脱气机、四元泵及二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司); AG285 电子天平 (瑞士 METTLER 公司); KQ-500E 型超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

狼毒乙素对照品、狼毒丙素对照品 (江苏省中国科学院植物研究所惠赠, 纯度 > 99%); 月腺大戟药材 (分别购自亳州药材总公司, 批号: 100606、100822, 南京同仁堂药业有限公司, 批号: 2010100060、2010090020、2010090060、2010100010) 经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定均为月腺大戟 *Euphorbia ebracteolata* Hayata. 正品; 乙腈 (美国 Tedia 公司, 色谱纯), 纯净水 (娃哈哈有限公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件 Welchrom-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 流动相为乙腈 (A) -水 (B) 梯度洗脱, 0 ~ 11 min, 25% A, 75% B; 11 ~ 12 min, 25% ~ 45% A, 75% ~ 55% B; 12 ~ 20 min, 45% ~ 70% A, 55% ~ 30% B; 20 ~ 21 min, 70% ~ 25% A, 30% ~ 75% B。体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 检测波长 290 nm。按照上述色

谱条件进行测定, 结果显示狼毒乙素、狼毒丙素与其他杂质峰得到很好的分离。各成分理论塔板数不低于 4 500。见图 1。

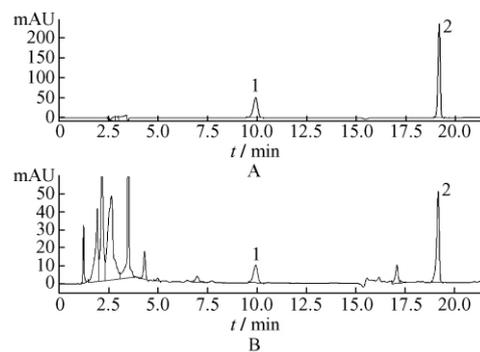


图 1 对照品 (A) 和药材 (B) HPLC 色谱图

1. 狼毒丙素 2. 狼毒乙素

2.2 供试品溶液的制备 取各样品粉末 (过三号筛) 约 2 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 50 mL, 密塞, 精密称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再精密称质量, 用甲醇补足失质量, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取狼毒乙素、狼毒丙素 3.00、3.90 mg, 加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 即得狼毒乙素、狼毒丙素标准贮备液。精密量取狼毒丙素贮备液 5 mL, 狼毒乙素贮备液 5 mL, 至 10 mL 量瓶中, 即得对照品溶液。

2.4 线性考察 精密量取对照品溶液 0.1、0.4、0.8、1.2、2.4、3.5 mL, 分别加甲醇定容至 10 mL。分别吸取上

收稿日期: 2011-05-24

基金项目: 国家中医药管理局项目 (200807039); 教育部高等学校青年骨干教师国内访问学者资助 (2010-2011); 江苏省中医药局项目 (LB09079)

作者简介: 袁海建 (1981—), 男, 讲师, 研究方向: 中药适宜新剂型及中药炮制。E-mail: yuanjian8101@163.com

* 通信作者: 蔡宝昌, 教授, 博士生导师。E-mail: becai@126.com

述对照品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪中,记录峰面积;以进样量 (μg) 为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得狼毒乙素的线性范围为 0.000 3 ~ 0.21 μg,回归方程为 $Y = 6 \times 10^6 X + 4.225 8$, $r = 0.999 9$;狼毒丙素的线性范围为 0.003 9 ~ 0.273 μg,回归方程为 $Y = 2 \times 10^6 X + 10.734$, $r = 0.999 9$ 。

2.5 精密度试验 取同一混合对照品溶液,分别含狼毒乙素 0.010 5 mg/mL、狼毒丙素 0.013 65 mg/mL,连续进样 5 次,测定峰面积,2 种物质在此测定方法下,测得狼毒乙素峰面积的 RSD 值为 0.012%,狼毒丙素峰面积的 RSD 值为 0.037%。

2.6 稳定性试验 在上述色谱条件下,取同一供试品溶液,分别在保存 0、2、4、6、12、24 h 进行测定,测定峰面积,2 种物质在此测定方法下,测得狼毒乙素峰面积的 RSD 值为 1.11%,狼毒丙素峰面积的 RSD 值为 1.37%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一月腺大戟药材(亳州药材公司-1)粉末(过三号筛),按供试品制备方法,平行制备 6 份,进行测定,计算狼毒乙素、狼毒丙素的含有量,RSD 分别为 1.30%、1.54%,表明该测定方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已测定的月腺大戟药材(亳州药材公司-1)粉末(过三号筛),共 6 份,各约 1g,精密称定,分别精密加入狼毒乙素、狼毒丙素对照品,按照供试品溶液制备,测定含有量并计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 狼毒乙素、狼毒丙素加样回收率结果 (n = 6)

成分	样品原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
狼毒乙素	0.166 1	0.168 0	0.333 6	99.68	1.35
	0.166 0	0.168 0	0.336 1	101.24	
	0.167 5	0.168 0	0.335 9	100.29	
	0.166 0	0.168 0	0.337 0	101.79	
	0.167 3	0.168 0	0.332 5	98.34	
	0.167 0	0.168 0	0.332 9	98.77	
狼毒丙素	0.031 80	0.031 20	0.063 21	100.67	1.71
	0.031 78	0.031 20	0.063 46	101.54	
	0.032 06	0.031 20	0.063 21	99.85	
	0.031 78	0.031 20	0.062 08	97.12	
	0.032 02	0.031 20	0.063 08	99.56	
	0.031 96	0.031 20	0.062 46	97.74	

2.9 样品测定 精密称取不同供应商、不同批次月腺大戟药材粉末各 2.0 g (过三号筛),按照 2.2 项供试品制备方法制备,以 20 μL 进样,测定色谱峰峰面积,根据标准曲线计算质量分数,结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 狼毒乙素和狼毒丙素具有相同的母核,结构上具有一定的相似性。结合文献报道^[8-9],实验通过使用 DAD 检测器,对被测物质进行了全波长扫描,考察了狼毒乙素、狼毒丙素最大吸收峰情况。结果表明 狼毒

表 2 样品测定结果 (n = 3)

样品	狼毒乙素/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%	狼毒丙素/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%
亳州药材公司-100606	0.165 6	0.87	0.031 70	0.98
亳州药材公司-100822	0.168 3	1.30	0.032 58	1.63
南京同仁堂-2010100060	0.032 2	1.42	-	-
南京同仁堂-2010090020	0.082 2	1.09	0.016 67	1.14
南京同仁堂-2010090060	0.080 4	1.16	0.009 72	0.93
南京同仁堂-2010100010	0.103 7	0.89	-	-

注: - 未能检测到。

乙素的吸收峰在 293 nm 左右,狼毒丙素的吸收峰在 288 nm 左右。综合考虑,本实验选择的检测波长为 290 nm,实际检测结果显示,效果较好。

3.2 流动相的选择 狼毒乙素和狼毒丙素具有相同的母核^[10],因母核上取代基的不同造成极性略有差异,实验经过多次调整梯度洗脱时流动相比例、体积流量、柱温、最终筛选出使各成分能够较好分离的色谱条件。

3.3 药材提取方法考察^[11-12] 实验采用单因素法,考察了水、甲醇、1%乙酸-95%乙醇、95%乙醇、70%乙醇、70%甲醇不同提取溶剂对狼毒乙素和狼毒丙素提取效率的影响,结果显示甲醇提取效率较高;比较了回流、冷浸、超声 3 种提取方法,结果表明超声提取效果较好;比较了超声提取 20、30、40 min 的提取效果,结果表明随着超声时间的延长,提取效率提高,但是到达一定时间后,其提取效率不再提高,故选择超声提取 30 min;比较了 25、50、75 倍提取溶剂对提取效率的影响,结果显示用 50 倍量提取液的提取效果较好。

致谢: 承江苏省中国科学院植物研究所张涵庆研究员惠赠对照品并给予指导。

参考文献:

- [1] 高 椽,万赛罗,蔡永萍,等. 月腺大戟根总黄酮对尖孢镰刀菌抑制作用的研究[J]. 激光生物学报,2008,17(2): 213-219.
- [2] 孟 娜,周守标,蒋继宏. 月腺大戟(*Euphorbia ebracteolata*)根部提取物抑菌作用的测定[J]. 生物学杂志,2005,22(4): 16-18.
- [3] 赵奎君,徐国钧,金蓉鸾,等. 狼毒类中药对结核杆菌抗菌作用的比较[J]. 中国药科大学学报,1995,26(2): 122.
- [4] 王文祥,丁杏苞. 月腺大戟的化学成分研究[J]. 中草药,1999,30(1): 1-3.
- [5] 杜 娟,徐瑞军,崔 晞,等. 月腺大戟水提物诱导 P388 白血病细胞的凋亡[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(4): 454-458.
- [6] 张涵庆,丁云梅,陈桂英,等. 月腺大戟根中有效成分的研究[J]. 植物学报,1987,29(4): 429-431
- [7] 颜秉强,张永清. 月腺大戟研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(5): 432-435.
- [8] 谢演晖,严小红,王灿坚,等. RP-HPLC 法测定月腺大戟中狼毒乙素的含量[J]. 中药材,2010,33(4): 568-570.

- [9] 赵奎君,徐国钧,金蓉鸾,等. HPLC法测定月腺大戟根中狼毒甲素及狼毒乙素的含量[J]. 中草药,1995,26(2):66-67.
- [10] 张涵庆. 月腺大戟根中有效成分乙素和丙素的结构研究[J]. 植物资源与环境,1992,1(3):6.
- [11] 袁海建,贾晓斌,陈彦,等. 正交试验优选龙葵的提取工艺[J]. 中成药,2009,31(1):120-122.
- [12] 袁海建,贾晓斌,陈彦,等. 不同产地龙葵药材中澳洲茄碱量的分析研究[J]. 中草药,2008,39(5):772-774.

RP-HPLC法同时测定内异消大鼠血浆中各成分

冯彬彬¹, 张建设¹, 李金玲², 徐晓玉^{2*}

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 西南大学, 重庆 400716)

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 法同时测定内异消大鼠血浆中川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素的方法。方法 采用 RP-HPLC 法, Agilent SB-C₁₈ ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.3% 冰醋酸 (42:58) 为流动相, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm。结果 川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素分别在 0.035 1 ~ 16.875 0 μg/mL、0.032 2 ~ 16.480 0 μg/mL 和 0.016 1 ~ 8.250 μg/mL 范围内线性关系良好; 平均回收率均在 80% ~ 120% 之间, RSD 均小于 10%; 低质量浓度精密密度 RSD 均小于 20%, 中、高质量浓度精密密度 RSD 均小于 15%。结论 本方法准确可靠, 分离度好, 适用于同时测定内异消大鼠血浆样品中川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素。

关键词: 川芎嗪; 阿魏酸; 延胡索乙素; RP-HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2012)07-1398-03

内异消是本课题组研制开发的用于治疗子宫内膜异位症的中药新药, 由川芎、当归、延胡索等药材组成。川芎嗪 (tetramethylpyrazine, TMPZ) 是川芎中的一种活性生物碱成分, 可以改善微循环, 并对心血管疾病有着显著的疗效^[1]; 阿魏酸 (ferulic acid, FA) 是当归、川芎中的主要有效成分之一, 具有抗氧化、抗炎、镇静、抑制血小板聚集及抗血栓形成等作用^[2]; 延胡索乙素 (Tetrahydropalmatine, TET) 是中药延胡索中所含具有镇痛作用的有效成分^[1]。对川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素单一成分的 HPLC 的测定有较多报道^[3-9], 但是采用 HPLC 法同时测定性质差别较大的川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素尚无报道。本实验建立了同时测定川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素的 RP-HPLC 法, 为内异消的质量控制提供实验依据。

1 材料、仪器和药品

1.1 仪器和药品 美国 Agilent1200 (智能柱温箱; MWV 紫外检测器); H1650-W 台式微量高速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); EL-204 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; WH-2 微型涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器厂); Millipore 纯水系统。甲醇为色谱纯 (购自迪马公司); 冰醋酸为分析纯; 水为去离子水; 阿魏酸对照品 (批号: 110773-200611)、川芎嗪对照品 (批号: 110817-200305)、延胡索乙素对照品 (批号: 110726-

200610) (均购自中国药品生物制品检定所); 香豆素对照品 (购自 Sigma 公司); 阿魏酸原料药、川芎嗪原料药、延胡索乙素原料药 (购自南京泽朗有限责任公司, 纯度均在 95% 以上)。

1.2 动物 SD 大鼠, 清洁级, 雌性, 体质量为 (220 ± 20) g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (渝) 2007-0001。

2 方法和结果

2.1 对照溶液的配制 取川芎嗪对照品 15 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 并定容至刻度, 得川芎嗪贮备液质量浓度为 0.15 mg/mL; 同样方法配制阿魏酸贮备液质量浓度为 0.5 mg/mL, 延胡索乙素贮备液质量浓度为 0.66 mg/mL; 香豆素贮备液质量浓度为 0.73 mg/mL, 将上述香豆素贮备液稀释至 13.687 5 μg/mL。

2.2 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.3% 冰醋酸 (42:58); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 温度 30 °C。

2.3 生物样品预处理和测定方法专属性考察 精密吸取大鼠血浆样品 100 μL, 加 150 μL 内标和 150 μL 甲醇, 涡旋震荡 2 min, 沉淀蛋白, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 取 10 μL 进样, 并按 2.2 项下色谱条件进行分析。按上述血浆样品处理方法处理空白血浆加内

收稿日期: 2011-11-17

基金项目: 重庆市重大科技攻关项目 (CSTC, 2008AA5004)

作者简介: 冯彬彬, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药理与新药开发。E-mail: fbb200596@126.com

* 通信作者: 徐晓玉, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药药理与新药研发。Tel: (023) 68251225, E-mail: xxy0618@sina.com