

HPLC 法测定藜芦中虎杖苷和白藜芦醇的含量

丛悦, 王金辉, 李铤 (沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 法测定由甲醇加热回流和甲醇超声两种方法提取的藜芦中虎杖苷和白藜芦醇的含量的方法。方法: 采用 Spherigel C₁₈ 色谱柱 (150mm × 4.6mm, 5 μm), 流动相为四氢呋喃-乙腈-水 (40:40:220), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 303nm。结果: 虎杖苷在 0~50mg·L⁻¹ 内成良好线性关系, 平均回收率甲醇加热回流提取 102.4%, RSD1.1%; 甲醇超声提取 97.2%, RSD1.1%。白藜芦醇在 0~100mg·L⁻¹ 内成良好线性关系, 平均回收率甲醇加热回流提取 96.6%, RSD1.5%; 甲醇超声提取 96.6%, RSD1.2%。结论: 本法可作为藜芦质量控制的手段之一。

[关键词] 藜芦; 虎杖苷; 白藜芦醇

藜芦为百合科藜芦属植物 *Veratrum nigrum* L. 的根及根茎部分, 入药历史可追溯到《神农本草经》, 通常认为藜芦有涌吐风痰、杀虫疗疮的功效, 治疗中风痰壅、喉痹不通、癫痫等^[1]。虎杖苷和白藜芦醇是其有效成分之一, 具有保护心血管和保肝等作用。目前认为藜芦的有效成分是生物碱, 所以质量控制主要集中在生物碱, 对虎杖苷和白藜芦醇的含量测定少见报道, 作者利用 HPLC 法首次对由甲醇加热回流和甲醇超声两种制备方法提取的藜芦中虎杖苷和白藜芦醇进行了测定, 为藜芦的质量控制提供了一种方法。

1 仪器与药品

色谱仪: HITACHI Pump L-7110, HITACHI UV-VIS Detector L-7420, Anastar 色谱工作站, FA1004N 型电子分析天平 (上海精密科学仪器有限公司), 乙腈 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 四氢呋喃 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 水 (纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司)。

藜芦购于河北安国药材市场, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定, 虎杖苷对照品 (批号: 0407056, 含量: 98%) 和白藜芦醇对照品 (批号: 0407057, 含量: 98%) 为西安宇源生物工程有限责任公司产品。虎杖苷和白藜芦醇的结构式分别见图 1、2。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: 瑞士 Spherigel C₁₈ 柱 (150mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 四氢呋喃-乙腈-水 (40:40:220), 检测波长: 303nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为室温。

2.2 系统适应性试验 在上述色谱条件下, 虎杖苷和白藜芦醇达到基线分离 ($R_s > 1.0$), 保留时间分别为 14.78、54.64min, 理论塔板数均不低于 2300。色谱图见图 3。

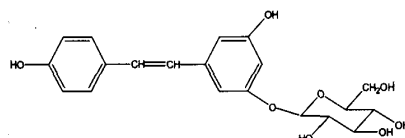


图 1 虎杖苷结构式

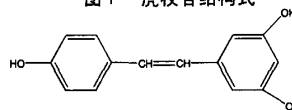


图 2 白藜芦醇结构式

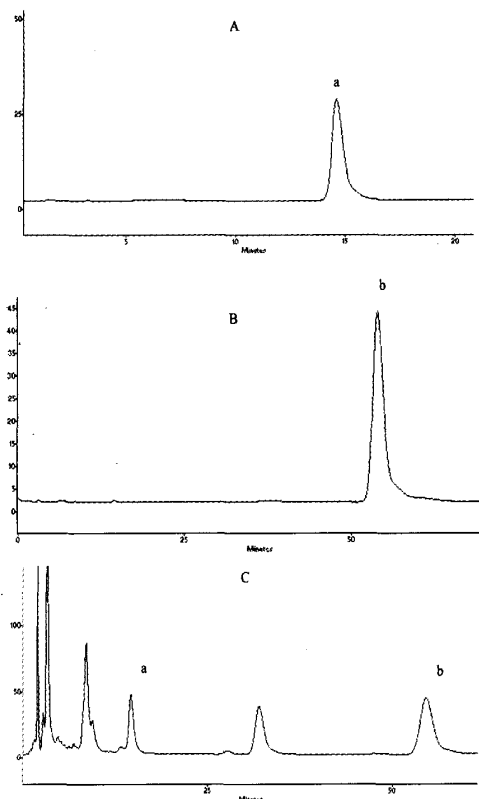


图 3 HPLC 色谱图

A. 虎杖苷 B. 白藜芦醇 C. 样品
a- 虎杖苷色谱峰 b- 白藜芦醇色谱峰

2.3 对照品溶液的制备 精密称取虎杖苷对照品 0.5mg, 置 10mL 量瓶中, 流动相溶解, 超声处理 10min, 稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得虎杖苷对照品溶液。

精密称取白藜芦醇对照品 1.0mg 置 10 mL 量瓶中, 流动相溶解, 超声处理 10min, 稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 即得白藜芦醇对照品溶液。

2.4 样品溶液的制备 对甲醇加热回流、甲醇超声两种提取方式进行考察。称取藜芦样品 4g 两份, 分别加入甲醇 32mL, 回流提取 120min, 超声提取 20min, 滤过, 置 50mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过即得样品溶液。

2.5 线性关系考察 精密吸取虎杖苷对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 分别进样, 按上述色谱条件进行 HPLC 分析。以在 20 μ L 进样的虎杖苷对照品溶液浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果表明, 虎杖苷在 0~50mg $\cdot$ L⁻¹ 内呈现良好线性关系。回归方程为: $Y=56591X$, $r=0.9981$ 。见图 4。

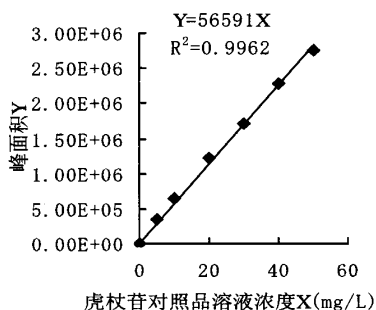


图4 虎杖苷标准曲线

精密吸取白藜芦醇对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 分别进样, 按上述色谱条件进行 HPLC 分析。以在 20 μ L 进样的白藜芦醇对照品溶液浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果表明, 白藜芦醇在 0~100mg $\cdot$ L⁻¹ 内呈现良好线性关系。回归方程为: $Y=121228X$, $r=0.9996$ 。见图 5。

2.6 样品测定 按上述色谱条件测定样品含量, 甲醇加热回流提取虎杖苷含量为 0.136mg $\cdot$ g⁻¹, 白藜芦醇含量为 0.363 mg $\cdot$ g⁻¹。甲醇超声提取虎杖苷含量为 0.450mg $\cdot$ g⁻¹, 白藜芦醇含量为 0.553mg $\cdot$ g⁻¹。

2.7 精密度试验 精密量取虎杖苷对照品 8 μ L, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 记录峰面积。虎杖苷

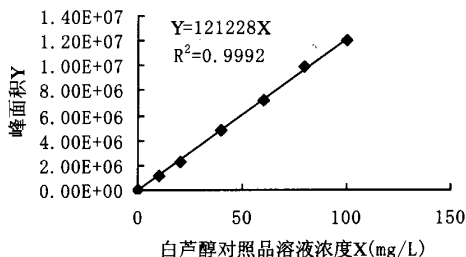


图5 白藜芦醇标准曲线

面积的 RSD 为 1.7% ($n=6$), 精密量取白藜芦醇对照品 8 μ L, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 记录峰面积。白藜芦醇面积的 RSD 为 1.5% ($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

2.8 重现性试验 甲醇加热回流提取样品和甲醇超声提取样品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 甲醇加热回流提取样品中虎杖苷面积的 RSD 为 1.9% ($n=6$), 白藜芦醇面积的 RSD 为 1.2% ($n=6$), 甲醇超声提取样品中虎杖苷面积的 RSD 为 1.6% ($n=6$), 白藜芦醇面积的 RSD 为 1.0% ($n=6$)。

2.9 稳定性试验 甲醇加热回流提取样品和甲醇超声提取样品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48h 进样, 记录峰面积。虎杖苷峰面积的 RSD 为 2.5%; 白藜芦醇峰面积的 RSD 为 2.0%。结果表明供试品溶液在制备后至少 48 h 内稳定。

2.10 回收率试验 精密量取甲醇加热回流提取样品和甲醇超声提取样品个 5mL, 置 10mL 量瓶中, 分别加入虎杖苷样品 1、3mL, 分别加入白藜芦醇 1.5、2mL, 用流动相定容, 按上述色谱条件测定, 结果甲醇加热回流提取虎杖苷平均回收率为 102.4%, RSD 为 1.1%; 白藜芦醇平均回收率为 97.2%, RSD 为 1.1%。甲醇超声提取虎杖苷平均回收率为 96.6%, RSD 为 1.5%; 白藜芦醇平均回收率为 96.6%, RSD 为 1.2%。

3 讨论

曾用无水乙醇、甲醇、氯仿 3 种溶剂进行提取试验, 结果甲醇提取完全, 能除去水溶性基质, 利于样品的检测。超声提取考察 20min 能提取完全。通过本实验证明了甲醇超声提取的虎杖苷和白藜芦醇含量高于甲醇加热回流提取。本法可作为藜芦质量控制的手段之一。TCM

参考文献

- [1] 徐敬海, 徐雅红. 藜芦属植物化学成分和药理作用[J]. 国外医药植物药分册, 2002, 17(5):185-189. (收稿日期 2005-5-25)

(下转第 19 页)

参皂苷 R_{g_1} 进样量 (μg) 为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程如下: $Y=243854.96X-4221.68$, $r=0.9999$, 线性范围 $0.39\sim3.53\ \mu\text{g}$ 。

4.3 精密度试验 精密吸取 $0.2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的人参皂苷 R_{g_1} 对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 连续进样 5 次, 结果峰面积 $\text{RSD}=0.95\%$ 。

4.4 重现性试验 依法对同一批号的样品进行 5 次独立测定, RSD 为 2.15% 。

4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 依法分别于 0, 4, 8, 12, 24h 测定, RSD 为 0.80% 。

4.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 2.5g , 分别精密加入人参皂苷 R_{g_1} 对照品溶液 ($2.192\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 0.2mL , 按“样品测定”方法测定, 结果 5 次测定的平均回收率为 99.5% , RSD 为 0.43% 。

4.7 样品测定 按项“3”制备对照品溶液及供试品溶液, 分别进样, 记录色谱图 (见图 1-A, B) 测定峰面积, 计算 030101, 030102, 030103,

030401, 030402 批人参皂苷 R_{g_1} 含量分别为 0.10, 0.10, 0.11, 0.09, $0.11\text{mg}/\text{粒}$ 。

5 讨论

5.1 曾实验测定人参皂苷 R_e 及人参皂苷 R_{g_1} 两种成分, 但本制剂处方较大, 在人参皂苷 R_e 附近有一杂质峰干扰, 重现性差, 故选择测定人参皂苷 R_{g_1} 的含量, 方法重现性、准确性均好。

5.2 由于本制剂药味较多, 干扰性大, 供试品加正丁醇提取后, 试验了加氨试液洗涤 2 次, 4 次两种方法, 测其含量无明显差异, 而前者杂质峰较多, 故选用用氨试液洗涤 4 次的提取方法。

5.3 流动相的选择: (1) 乙腈- 0.05% 磷酸溶液 (21:79); (2) 乙腈- 0.05% 磷酸溶液 (20:80)。作为流动相, 结果 (2) 能够使人参皂苷 R_{g_1} 峰与其它峰完全分离。由于主峰出现后, 其它杂质峰出现的时间较长, 故采用梯度洗脱的方法, 使得分析时间缩短。**TCM**

(收稿日期 2005-6-17)

HPLC Determination of Ginsenoside R_{g_1} in Huoyang bushen Capsule

WANG Xiaonan, LI Xiufen, WEN Liyi

(Jilin province Institute for Drug control, Changchun 130062, China)

[Abstract] Objective: To establish method for HPLC determination of Ginsenoside R_{g_1} in Huoyang bushen capsule. **Method:** The condition of HPLC was Alltima C_{18} column ($4.6\times250\text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) mobile phase of acetonitrile- 0.05% phosphoric (20:80) with $0.8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ of flow rate, and the determination wavelength was at $203\ \text{nm}$. **Result:** The standard curve was linear in the range of $0.39\sim3.53\ \mu\text{g}$ and the correlation coefficient was 0.9999 . An average recovery was 99.5% , RSD was 0.43% ($n=5$). **Conclusion:** The method shows good separating result, accuracy and reproducibility, can be used for the quality control of Huoyang bushen capsule.

[Key words] HPLC; Ginsenoside R_{g_1} ; Huoyang bushen Capsule

(上接第 17 页)

HPLC determination of the contents of polydatin and resveratrol in the root and stem of *Veratrum nigrum* L.

CONG Yue, WANG Jinhui, LI Xian

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] Objective: An HPLC method was developed to determine the contents of polydatin and resveratrol in the root and stem of *Veratrum nigrum* L. by two means of under reflux by methanol and ultrasonic by methanol. **Method:** The separation was performed on Spherigel C_{18} column ($150\text{mm}\times4.6\text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) with tetrahydrofuran-acetonitrile-water (40:40:220) as the mobile phase. The flow rate was $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the detection wavelength was 303nm . **Result:** The standard curve of polydatin was linear in the range of $0\sim50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The average recovery was 102.4% with $\text{RSD}\ 1.1\%$ by under reflux by methanol and 97.2% with $\text{RSD}\ 1.1\%$ by ultrasonic by methanol. The standard curve of resveratrol was linear in the range of $0\sim100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The average recovery was 96.6% with $\text{RSD}\ 1.5\%$ by under reflux by methanol and 96.6% with $\text{RSD}\ 1.2\%$ by ultrasonic by methanol. **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate, it can be used for the quality control of the root and stem of *Veratrum nigrum* L. .

[Key words] *Veratrum nigrum* L.; polydatin; resveratrol