

反相高效液相色谱法测定药用植物 大红袍中的两个生物活性成分

谭 青¹, 寿清耀¹, 张 盛¹, 沈征武^{1, 2*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203 ; 2. 巴塞利亚药业(中国) 有限公司, 江苏 海门 226100)

摘要 :建立了反相高效液相色谱-二极管阵列检测器(RP-HPLC-DAD)测定药用植物大红袍中具有抗菌活性的异黄酮类化合物 3'-geranyl-5, 7, 4'-trihydroxyisoflavone(化合物 1)及具有良好免疫抑制活性的紫檀烯类化合物 8, 9-dihydroxy-1-methoxy-[6', 6'-dimethylpyrano(2', 3' : 2, 3)]pterocarpene(化合物 2)含量的方法。采用的色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4. 6 mm, 5 μm) ,以乙腈-0. 1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1. 0 mL/min ;柱温 30 ℃。化合物 1 和化合物 2 分别在 4. 4 ~ 13. 2 μg 和 0. 428 ~ 1. 284 μg 范围内呈线性关系 ;平均回收率分别为 99. 65% 和 99. 11% , 相对标准偏差分别为 1. 83% 和 2. 59% (n = 5)。该方法快速简便, 灵敏度和分离度好, 适用于大红袍药材中活性黄酮类成分的测定。

关键词 :反相高效液相色谱法 ;异黄酮类化合物 ;紫檀烯类化合物 ;大红袍 ;药用植物

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)12-1150-04

Determination of two bio-active compounds in *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl. using reversed-phase high performance liquid chromatography

TAN Qing¹, SHOU Qingyao¹, ZHANG Sheng¹, SHEN Zhengwu^{1, 2*}

(1. School of Chinese Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China ;
2. Basilea Pharmaceutica China Ltd., Haimen 226100, China)

Abstract : A method of reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using diode array detection (DAD) was developed for the quantitative determination of 3'-geranyl-5, 7, 4'-trihydroxyisoflavone (compound 1) and 8, 9-dihydroxy-1-methoxy-[6', 6'-dimethylpyrano(2', 3' : 2, 3)]pterocarpene (compound 2) in *Campylotropis hirtella*. The separation and quantification were achieved using an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm), and mobile phases of acetonitrile and 0. 1% formic acid with gradient elution at a flow rate of 1. 0 mL/min and 30 ℃. The calibration curves for compounds 1 and 2 were linear in the ranges of 4. 4 - 13. 2 μg and 0. 428 - 1. 284 μg, respectively. The recoveries were 99. 65% and 99. 11% with the relative standard deviations of 1. 83% and 2. 59% (n = 5), respectively. This RP-HPLC-DAD method is rather simple, accurate and convenient. It can be used for the quantitative determination of the active flavonoids in *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl.

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ; isoflavone ; pterocarpene ; *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl. ; medicinal plant

大红袍, 常用名为大红袍, 俗称锈钉子、山黄豆、大和红、硬毛杭子梢、山皮条、地油根、白蓝地花, 为豆科杭子梢属植物毛杭子梢(*Campylotropis hir-*

tella (Franch.) Schindl.) 的干燥根, 主要分布于我国的云南、四川、广东、广西等地区。本品为《中国药典》1977 年版收载品种, 性涩微苦, 微温, 具有活

* 通讯联系人 : 沈征武, 研究员, 博士生导师, 研究方向为天然产物分离鉴定与合成。Tel : (0513) 82198003, E-mail : jeff_shen_1999@ yahoo. com.

基金项目 : 国家人事部 2007 年留学回国人员优秀项目资助。

收稿日期 : 2010-09-06

血、调经、理气、止痛等作用,常用于治疗月经不调、闭经、痛经、血崩、白带、胃及十二指肠溃疡、扭伤、外伤出血、烫伤^[1]。大红袍中含有单宁^[2]、三萜^[3]、木脂素^[4-6]、香豆素^[7]、黄酮^[8-14]等化合物。目前,该药材的质量标准比较简略,也未见对大红袍中的化学成分进行含量测定的研究报道。本文运用反相高效液相色谱-二极管阵列检测器(RP-HPLC-DAD)技术对大红袍中具有高度抗菌活性的异黄酮类化合物 3'-geranyl-5,7,4'-trihydroxyisoflavone^[13](化合物 1)及具有良好细胞免疫抑制活性的黄酮类紫檀烯类化合物 8,9-dihydroxy-1-methoxy-[6',6'-dimethylpyrano(2',3':2,3)]pterocarpene^[14](化合物 2)(结构见图 1)的含量进行测定,为该药材有效成分的检测和控制及其质量标准的建立提供实验依据。

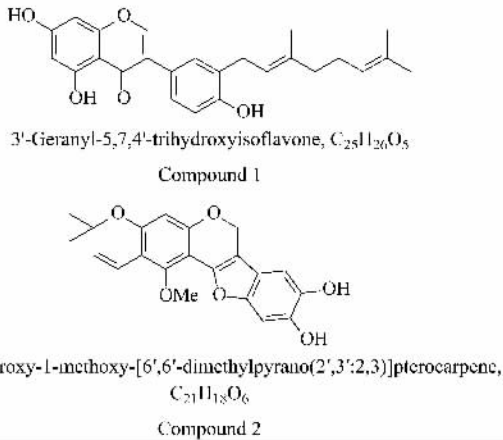


图 1 化合物 1 及化合物 2 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1 and 2

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695/2998 LC/DAD 系列高效液相色谱仪(含在线真空脱气机、低压四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器, Waters Empower2 software 色谱工作站, 美国 Waters 公司)。

化合物 1、化合物 2 对照品由本课题组从大红袍中分离得到,经紫外光谱、红外光谱、高效液相色谱-质谱、核磁共振氢谱、碳谱及二维核磁共振谱鉴定, HPLC 归一化法测定其含量在 98% 以上。乙腈为色谱纯,甲酸、乙醇为分析纯,水为超纯水。

实验用药材购于云南楚雄。经上海中医药大学周秀佳教授鉴定为毛茛子梢 *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl. 的根。生药样品经粉碎后,过 40 目筛,置于干燥器中备用。

1.2 对照品溶液的制备

精密称取 11.00 mg 化合物 1、1.07 mg 化合物 2,用乙腈-水(70:30, v/v)溶解并定容至 10 mL,制成质量浓度分别为 1.100 g/L 和 0.107 g/L 的对照品溶液,备用。

1.3 样品溶液的制备

取干燥大红袍药材粉末 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 95% 乙醇 20 mL,称定质量,超声 30 min,放冷后再称定质量,用 95% 乙醇溶液补足减失的质量,摇匀,过滤。取续滤液 2 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相:乙腈(A)和 0.1% 甲酸水溶液(B)。梯度洗脱程序:0~5 min, 40% A; 5~15 min, 40% A~65% A; 15~30 min, 65% A~85% A; 30~35 min, 85% A~100% A; 35~40 min, 100% A。流速:1.0 mL/min。柱温:30 ℃。检测波长:230 nm。进样量:10 μL。记录时间:40 min。滞留时间 2.1 min。

2 结果与讨论

2.1 样品预处理方法的优化

试验比较了 40 kHz 超声提取和回流提取,结果发现对大红袍中化学成分的提取效果差不多,故本文采用简便快捷的超声提取法。还试验比较了甲醇和不同浓度(100%、95%、75%、50%, 体积分数)乙醇溶液的提取效果,结果发现 95% 乙醇对化合物 1 和 2 的提取效率和纯乙醇、甲醇一样。考虑溶剂的毒性和挥发性,本文选择以 95% 乙醇作提取溶剂。

2.2 色谱条件的选择

化合物 1 和 2 因均含有酚羟基而具有一定的酸性和极性,易解离出质子,在流动相中添加适当比例的酸可抑制解离以获得稳定的色谱峰。故本研究采用 0.1% 甲酸水溶液和乙腈作为流动相。

用 DAD 检测对照品化合物 1 和 2 溶液,在 190~400 nm 范围内进行扫描。化合物 1 在 261 nm 处出现了一个吸收峰,化合物 2 在 231 nm、280 nm、346 nm 处出现吸收峰(见图 2)。为减少溶剂、流动相及样品中其他成分的干扰,确保目标物含量测定结果的准确性,根据化合物 1、2 的紫外吸收谱图,选择 261 nm 作为化合物 1 的检测波长,280 nm 作为化合物 2 的检测波长。

2.3 线性关系

精密吸取质量浓度为 1.100 g/L 的化合物 1 对

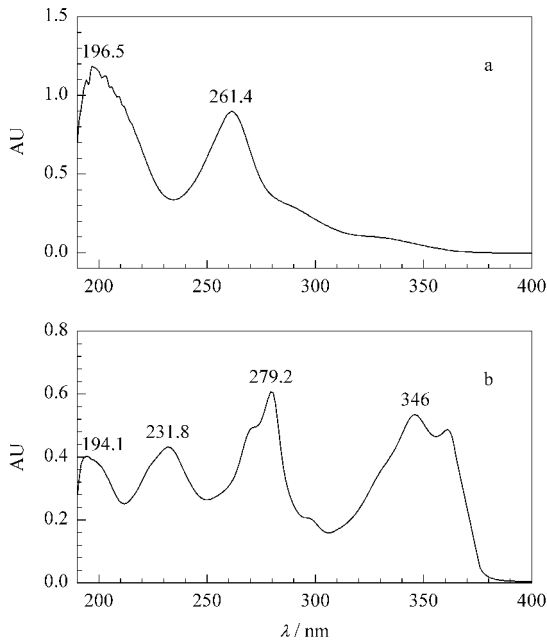


图 2 (a) 化合物 1 和 (b) 化合物 2 的紫外吸收谱图
Fig. 2 UV spectra of (a) compound 1
and (b) compound 2

照品储备溶液 加乙腈-水(70:30, v/v)溶液配制得到 0.220、0.330、0.440、0.550、0.660 g/L 的对照品溶液。精密吸取质量浓度为 0.107 g/L 的化合物 2 对照品储备溶液,加入乙腈-水(70:30, v/v)溶液配制得到 0.0214、0.0321、0.0428、0.0535、0.0642 g/L 的对照品溶液,摇匀。分别进样 20 μ L 分析,记录各自峰面积。以对照品峰面积 Y 为纵坐标,进样量 X 为横坐标进行线性回归,得到的线性回归方程为:化合物 1, $Y = 189\,864.2X + 50\,104$, $r = 0.999\,4$ ($n = 5$); 化合物 2, $Y = 192\,574.2X - 124\,200$, $r = 0.999\,9$ ($n = 5$)。结果表明,化合物 1 在 4.4 ~ 13.2 μ g、化合物 2 在 0.428 ~ 1.284 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.4 精密度、重复性和稳定性

分别精密吸取稀释后的化合物 1、化合物 2 对照品溶液,重复进样 6 次,以峰面积计,化合物 1、2 峰面积测定值的相对标准偏差(RSD)分别为 0.389% 和 0.708%,表明系统的精密度较好。

分别从 3 批大红袍药材粉末中各取 1 g,每批取 2 份,共 6 份,精密称定,按 1.3 节方法制备供试品溶液并分析,化合物 1 和 2 在 3 批药材中的平均含量分别为 1.289% 和 1.512% (质量分数,下同),RSD 分别为 1.834% 和 3.752%,表明方法的重复性较好。

取同一份供试品溶液,分别于 0、1、2、4、12、24 h 进样,化合物 1 和化合物 2 峰面积测定值的 RSD 分

别为 0.812% 和 0.947%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 加标回收率

取已知含量的大红袍药材粉末约 1 g,共 6 份,精密称定,分别精密加入化合物 1 和化合物 2 对照品 1.100 mg 和 0.214 mg,按 1.3 节方法制备供试品溶液并进行分析测定,得到化合物 1、化合物 2 的平均回收率分别为 99.65% 和 99.11%,RSD 分别为 1.83% 和 2.59%。

2.6 实际样品测定

采用建立的方法对某批大红袍药材进行分析测定,在该批药材中化合物 1 的含量为(1.289 \pm 0.029)% ($n = 3$),化合物 2 的含量为(0.152 \pm 0.006)% ($n = 3$)。色谱图见图 3。

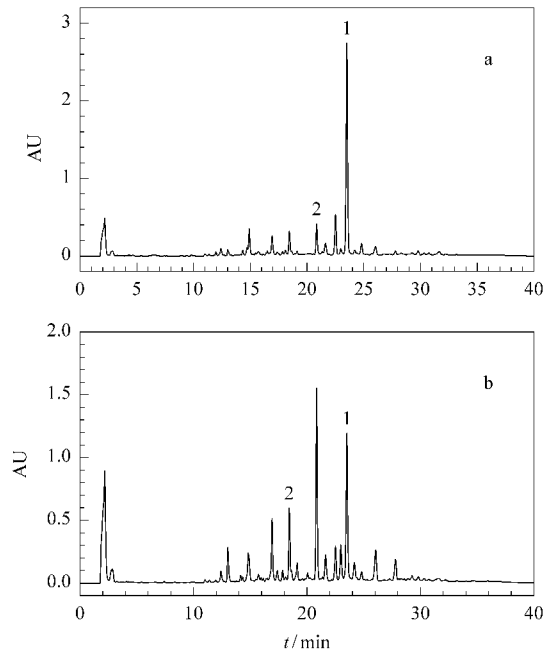


图 3 大红袍样品的色谱图
Fig. 3 Chromatograms of a sample of *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl
Detection wavelengths: a. 261 nm; b. 280 nm.
1. compound 1; 2. compound 2.

3 结论

采用 RP-HPLC-DAD 技术测定了大红袍中具有抗菌活性的异黄酮类化合物 3'-geranyl-5,7,4'-trihydroxyisoflavone 及具有良好细胞免疫抑制活性的紫檀烯类化合物 8,9-dihydroxy-1-methoxy-[6',6'-dimethylpyrano(2',3':2,3)]pterocarpene。该方法所用流动相系统和样品预处理方法简单、快速,能准确有效地测定大红袍中主要黄酮类成分的含量,为该药材质量标准的建立提供实验依据,也为进一步研究开发大红袍药材提供了参考。

参考文献 :

- [1] Pharmacopoeia Commission of People 's Republic of China. Pharmacopoeia of People 's Republic of China. Part 1. Beijing : People 's Health Press(中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京 : 人民卫生出版社), 1977 : 30
- [2] Qin L , Chen X M , Chen W X , et al. Natural Product Research and Development(秦力,陈新民,陈维新,等. 天然产物研究与开发), 1991 , 3(4) : 31
- [3] Lu X Z , Han G Q. China Journal of Chinese Materia Medica (鲁学照,韩桂秋. 中国中药杂志), 1997 , 2(11) : 681
- [4] Wen P , Han H Y , Wang N L , et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs(文屏,韩慧英,王乃利,等. 中草药), 2008 , 39(8) : 1143
- [5] Han H Y , Liu H W , Yao X S , et al. Nature Product Research , 2008 , 22 : 984
- [6] Han H Y , Wang X H , Wang N L , et al. J Agric Food Chem , 2008 , 56 : 6928
- [7] Han H Y , Wen P , Liu H W , et al. Chem Pharm Bull , 2008 , 56(9) : 1338
- [8] Wen P , Han H Y , Wang N L , et al. Asian J Tradit Med , 2007 , 2(4) : 149
- [9] Wen P , Han H Y , Wang N L , et al. Journal of Shenyang Pharmaceutical University(文屏,韩慧英,王乃利,等. 沈阳药科大学学报), 2008 , 25(6) : 448
- [10] Shou Q Y , Tan Q , Shen Z W. J Agric Food Chem , 2009 , 57 : 6712
- [11] Shou Q Y , Tan Q , Shen Z W. Bioorg Med Chem Lett , 2009 , 19 : 3389
- [12] Shou Q Y , Tan Q , Shen Z W. Planta Med , 2009 , 75 : 1
- [13] Kang L , Zhou J X , Shen Z W. Chinese Journal of Chemistry , 2007 , 25(9) : 1323
- [14] Tan Q , Zhang S , Shen Z W. Planta Med , 2010 , in press