

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.19.009

高效液相色谱法测定罗汉松种子挥发油中川芎嗪含量*

林乐珍, 赵凯丽, 杜 坤, 黄增琼[△]

(广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 建立测定罗汉松种子挥发油中川芎嗪含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 GL Inertsil ODS-3 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(60:40, V/V), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 298 nm, 柱温为室温。结果 川芎嗪进样质量浓度在 0.38~22.72 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9998$); 平均回收率为 99.42%, RSD 为 1.31% ($n=6$)。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可用于测定罗汉松种子挥发油中川芎嗪的含量。

关键词: 罗汉松种子; 川芎嗪; 高效液相色谱法; 挥发油

中图分类号: R932; R284.1; R282.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)19-0030-03

Content Determination of Ligustrazine in Volatile Oil from the Seed of *Podocarpus Macrophyllus* by HPLC

LIN Lezhen, ZHAO Kaili, DU Kun, HUANG Zengqiong

(College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of ligustrazine in volatile oil from the seed of *Podocarpus macrophyllus*. **Methods** The chromatographic column was GL Inertsil ODS-3 C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution(60:40, V/V), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 298 nm and the column temperature was room temperature. **Results** The ligustrazine showed good linear relationship with peak area in the range of 0.38-22.72 μg/mL($r=0.9998$), the average recovery was 99.42% and RSD was 1.31% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the content determination of ligustrazine in volatile oil from the seed of *Podocarpus macrophyllus*.

Key words: seed of *Podocarpus macrophyllus*; ligustrazine; HPLC; volatile oil

罗汉松实为罗汉松科植物罗汉松 *Podocarpus macrophyllus*(Thunb.) D. Don 和短叶罗汉松 *Podocarpus macrophyllus*(Thunb.) D. Don var. *maki* Endl. 的种子和花托^[1]。罗汉松实具有治心胃痛、血虚面色萎黄、大补元气的功效^[2], 主要含降二萜内酯类及萜类化合物^[3-6]、生物碱类化合物^[7]、黄酮类化合物^[8]及多糖类、氨基酸、矿物元素和维生素^[9]等; 其提取物具有调节血脂、抗氧化、保肝和抗肿瘤等药理作用^[10-12]。本课题组的前期研究发现, 产于北海的罗汉松种子挥发油中含有大量的川芎嗪, 其在挥发油中的相对百分含量高达 97.27%^[7]。本研究中建立了罗汉松种子挥发油中川芎嗪的含量测定方法, 为建立罗汉松实药材质量标准提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 电子天平, XS-205DU 型天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司, 十万分之一); KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CD-UPH-II-20T 型超纯水器(成都超纯科技有限公司); 万能粉碎机(无锡久平仪器有限公司)。

1.2 试剂

罗汉松种子鲜品采自广西北海, 经广西医科大学药学院生药学教研室李琼讲师鉴定为罗汉松科植物短叶罗汉松 *P. macrophyllus*(Thunb.) D. Don var. *maki* Endl. 的种子; 川芎嗪对照品(上海雅吉生物科技有限公司, 批号为 16072405); 甲醇为色谱纯, 磷酸、石油醚(30~60℃)和无水硫酸钠均为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

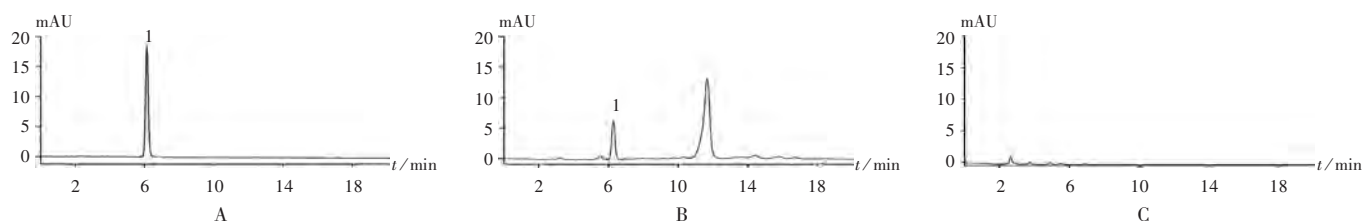
2.1 溶液制备

取川芎嗪对照品约 20 mg, 精密称定, 加甲醇溶解并定容于 25 mL 容量瓶中, 得质量浓度为 0.7572 g/L 的对照品贮备液, 精密移取 2.0 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 0.06058 g/L 的川芎嗪对照品溶液。取自然风干的罗汉松种子, 粉碎, 过 20 目筛, 称取 100 g 置圆底烧瓶中, 加入 1 000 mL 蒸馏水浸泡 12 h 后, 保持微沸蒸馏 6 h。馏出液用石油醚萃取 3 次, 每次 50 mL, 合并醚层, 加入无水硫酸钠脱水, 50℃减压回收溶剂, 得有芳香气味的淡黄色液体, 即为挥发油; 取挥发油约 100 mg, 精密称定, 加甲醇超声溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 用 0.45 μm 微孔滤膜

*基金项目: 广西壮族自治区中青年教师基础能力提升项目[KY2016YB096]。

第一作者: 林乐珍, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为天然活性成分提取分离, (电子信箱)295181873@qq.com。

[△]通信作者: 黄增琼, 男, 壮族, 博士研究生, 研究方向为中药民族药开发, (电子信箱)huangzengqiong@163.com。



1. 川芎嗪

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照溶液

图1 高效液相色谱图

滤过,取续滤液,即得供试品溶液。以甲醇为阴性对照溶液。

2.2 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:GL Inertsil ODS-3 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(60:40, V/V),等度洗脱;流速:0.8 mL/min;检测波长:298 nm;柱温:室温;进样量:20 μL。分别精密吸取2.1项下3种溶液进样测定。在此色谱条件下,理论板数以川芎嗪峰计大于20 000,分离度大于1.5。色谱图见图1。

2.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取对照品贮备液0.005, 0.010, 0.020, 0.040, 0.050, 0.100, 0.200, 0.300 mL,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释,摇匀,定容,即得系列对照品溶液。按2.2项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以川芎嗪进样质量浓度(X)为横坐标、相对应的峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 82.182X + 11.538$, $r = 0.9998$ ($n = 8$)。结果表明,川芎嗪进样质量浓度在0.38~22.72 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.1项下对照品溶液,按2.2项下色谱条件连续进样6次,测定川芎嗪的峰面积。结果的RSD为0.32% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取挥发油样品6份,每份约100 mg,精密称定,依法制备供试品溶液,并按2.2项下色谱条件进样测定。结果川芎嗪平均含量为117.17 μg/g, RSD为1.60% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.1项下供试品溶液,室温放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时,按2.2项下色谱条件测定。结果的RSD为0.50% ($n = 6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:取已知含量的挥发油6份,精密称定,分别置容量瓶中,各精密加入一定质量的川芎嗪对照品,按2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱条件进样测定含量,计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取罗汉松实挥发油3份,精密称定,按2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱条件进样测定。结果3份样品含量分别为118.35, 117.72, 116.62 μg/g,

表1 川芎嗪加样回收试验结果($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.100 85	7.609	7.572	15.279	101.29	99.42	1.31
0.100 15	7.556	7.572	15.076	99.31		
0.100 10	7.552	7.572	15.155	100.41		
0.100 02	7.546	7.572	14.968	98.02		
0.100 90	7.613	7.572	15.143	99.45		
0.100 78	7.604	7.572	15.025	98.01		

平均117.56 μg/g。

3 讨论

本研究中采用水蒸气蒸馏法对罗汉松种子进行提取,得淡黄色的挥发油,提取率为0.18%。在提取挥发油的过程中发现,将种子浸泡一段时间再蒸馏,可提高挥发油的提取率。考察了沸程为30~60℃和60~90℃石油醚对萃取效果的影响,结果2种石油醚的萃取效果相当。此外,萃取剂用量为被萃取液体积的1/2,萃取次数3次时,可获得最佳萃取效果。

经紫外扫描发现,川芎嗪在298 nm波长处有较强吸收,故选择298 nm作为测定波长。在加样回收试验中,对照品的加入量对测定结果的准确性有影响。选择川芎嗪含量较高的挥发油样品,加入大量的对照品,可获得理想的测定结果。经测定,产于北海的罗汉松种子挥发油中川芎嗪含量为117.56 μg/g,种子中川芎嗪的含量为0.212 μg/g。

罗汉松种子中含有川芎嗪,而川芎嗪已广泛用于冠状动脉粥样硬化性心脏病和缺血性脑病的治疗^[13-14],故建议将川芎嗪作为罗汉松药材质量评价指标成分之一。本研究中建立了罗汉松种子中川芎嗪含量测定方法,操作简单,结果准确,分离度和重复性均良好,可用于罗汉松实药材的质量控制。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004:412.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1912-1913.
- [3] ITÔ S, KODAMA M, SUNAGAWA M, et al. Structure of inumakilactone A, a bisnorditerpenoid[J]. Tetrahedron Lett, 1968, 9(17):