

高效液相色谱法测定萝芙木中利血平的含量

张慧颖¹, 龚云麒², 蔡传涛³, 饶高雄^{1,2Δ}

(1 云南中医学院, 云南昆明 650200, 2 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南昆明 650231)

3 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南昆明 650231)

摘要: 建立了测定萝芙木属植物中利血平含量的高效液相色谱方法, 用十八烷基键合硅胶柱, 以四氢呋喃—甲醇—0.3% 磷酸 (30: 15: 55) 为流动相, 检测波长为 268nm。结果表明萝芙木属植物中利血平含量在 0.0012% ~ 0.117% 之间, 以根部含量最高。就资源开发而言, 催吐萝芙木、印度萝芙木的生物量和利血平含量均比云南萝芙木高, 是较好的种植优势种。

关键词: 萝芙木; 利血平; 含量测定; HPLC

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1000—2723(2007)02—0007—03

夹竹桃科萝芙木属 (*Rauvolfia*) 植物云南分布近 10 种, 多作中草药或民族药应用。同时, 也是提取利血平 (reserpine) 的原料^[1~3]。主要资源植物有云南萝芙木 *R. yunnanensis*, 催吐萝芙木 *R. vomitoria*, 印度萝芙木 *R. serpentina*, 但经过多年的采挖, 资源已经面临枯竭, 开展萝芙木的人工种植势在必行。

萝芙木的种植及加工, 从种源筛选、种植, 到利血平提取等, 所有环节均需要对利血平进行含量分析, 以评价和控制产品质量及生产技术, 建立一套高效准确的含量分析方法很有必要。而目前的重量法, 纸色谱电泳—光度法^[2]操作烦琐, 误差大, 已不适应现代分析的要求。

高效液相色谱 (HPLC) 对复杂成分系统具有较好的分离、分析效果, 目前已成为中药分析的主流方法, 为此, 我们系统研究并建立了萝芙木中利血平含量测定的 HPLC 方法, 具有分离效果好, 测定准确, 灵敏度高, 专属性强、分析简便快速的技术特点。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10A vp 高效液相色谱仪, N2000 色谱工作站, STAR RP-18 柱; 利血平对照品购于中国药品生物制品检定所 (编号 10041-021Q 含量测定用) (图 1); HPLC 流动相用色谱纯试剂,

水用反渗透纯化水; 药材的提取用分析纯试剂。萝芙木药材采集于云南省思茅地区、西双版纳州和德宏州, 经过中国科学院西双版纳热带植物园蔡传涛副研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

检测波长根据利血平的紫外光谱确定为 268nm (图 2); 经过对比筛选, 色谱柱用十八烷基键合硅胶柱 (4.6mm × 150mm, 5μm) 即有良好分离效果; 流动相以四氢呋喃—甲醇—0.3% 磷酸 (30: 15: 55) 分离效果较好, 流速 1mL/min, 柱温 35℃。在上述色谱条件下, 利血平对照品及萝芙木样品中利血平峰具有较好的分离效果, 利血平峰拖尾因子 1.037, 理论板数不低于 5000, 分离度大于 1.50 (图 3、图 4)。

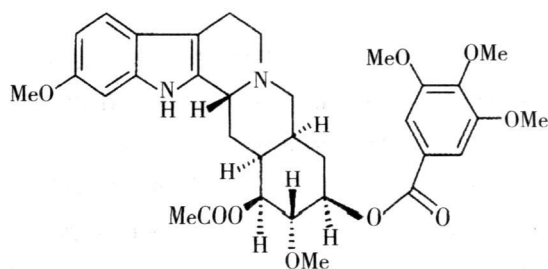


图 1 利血平的化学结构

收稿日期: 2006—09—19 修回日期: 2006—11—17

作者简介: 张慧颖 (1982), 女, 云南人, 本院 04 级研究生, 主要从事中药化学及中药质量控制研究工作。

Δ 通讯作者: 饶高雄, Tel 0871- 6212194, E-mail: raowufan@vip.sohu.com

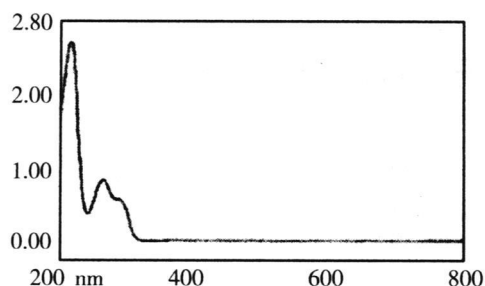


图 2 利血平对照品的 UV 光谱图

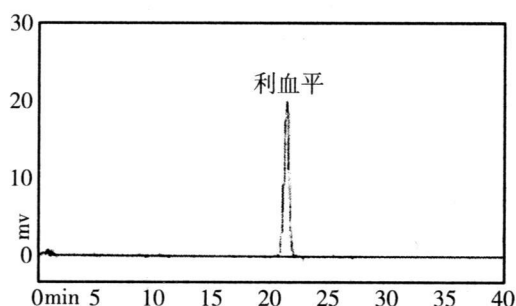


图 3 利血平对照品 HPLC 色谱图

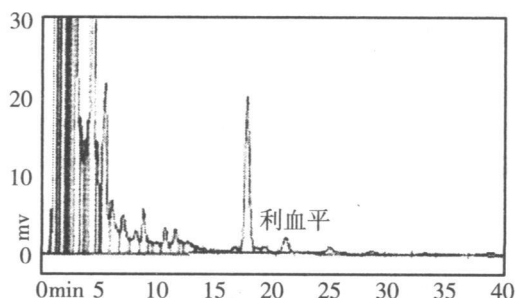


图 4 萝芙木药材样品 HPLC 色谱图

2.2 标准曲线

精密称取利血平对照品用甲醇制成储备液 (0.16mg/mL), 分别精密吸取储备液 0.05、0.5、1、2、5、7mL, 甲醇稀释至 10mL, 分别测定, 数据回归分析, 回归方程为: Y (利血平峰面积) = $732802X$ (进样量 μg) - 2626 $r=0.9999$ ($n=7$)。结果表明, 利血平进样量在 0.016 μg ~ 3.2 μg 时, 峰面积和进样量呈现良好的线性关系。

2.3 方法学考察

精密度试验: 取同一对照品溶液重复进样 6 次, 利血平峰保留时间的 $RSD=0.99\%$ ($n=6$), 峰面积的 $RSD=1.71\%$ ($n=6$), 符合 HPLC 测定

方法要求。

稳定性试验: 取同一对照品溶液分别于 0、2、4、8、24、48h 测定, 利血平峰保留时间的 $RSD=1.32\%$ ($n=6$), 峰面积的 $RSD=1.64\%$, 说明利血平对照品溶液至少在 48h 内是稳定的, 可用于含量测定。

重现性试验: 精密称取同一份萝芙木药材粉末末 2g 总共 6 份, 按照萝芙木药材样品测定项下的方法操作测定利血平的含量, 利血平含量 $RSD=1.47\%$ ($n=6$), 符合含量测定要求。

加样回收试验: 精确称取已测定含量 (0.57mg/g) 的萝芙木药材 2g, 每组 3 份, 共 3 组。分别加入相当于样品含量 80%、100%、120% 的利血平, 按样品测定项下的方法测定。利血平回收率在 97.7% ~ 102.4% 之间, 平均 98.7%, $RSD=1.83\%$ ($n=9$), 符合含量测定要求。

2.4 萝芙木药材样品测定

萝芙木药材样品 (根或茎) 共 16 份, 粉碎为粗粉 (过 40 目筛), 精密称取 2g 置 100mL 圆底烧瓶中, 再准确加入甲醇 50mL, 称重, 放置浸泡 2h 后水浴回流 1h, 放冷, 以甲醇补足减失的重量, 过滤, 取续滤液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。吸取供试品溶液进样测定含量, 结果见表 1 (Y—云南萝芙木, V—催吐萝芙木, S—印度萝芙木。)

3 结果与讨论

利血平的紫外光谱在 218nm、268nm 和 292nm 处均有较强吸收, 但 218nm 靠近末端吸收, 292nm 是肩峰, 均不适合作为 HPLC 的检测波长, 而 268nm 峰形平缓, 干扰相对较少, 所以选择 268nm 为检测波长。

流动相用甲醇—水、乙腈—水、四氢呋喃—水等二元系统均无好的分离效果, 加入酸碱或离子对试剂调节, 也无明显改变, 但根据上述系统的变化情况, 调整为四氢呋喃—甲醇—0.3% 磷酸 (30: 15: 55) 的混合溶液, 具有较好的分离效果, 利血平峰的拖尾因子在 0.95~ 1.05 之间, 理论板数以利血平峰计算不低于 5000。

萝芙木根中利血平含量分别为: 印度萝芙木约 0.083%、催吐萝芙木约 0.070%、云南萝芙木约 0.025%, 含量和物种有直接关系。从根和茎的

表 1 云南不同产地萝芙木药材中利血平的含量

样品	部位	利血平含量 (%)	产地	样品	部分	利血平含量 (%)	产地
Y- 1	根	0. 022	思茅市	C- 3	根	0. 071	西双版纳州
Y- 2	茎	0. 0012		C- 4	茎	0. 0065	
Y- 3	根	0. 024		S- 1	根	0. 068	思茅市
Y- 4	茎	0. 0016	西双版纳州	S- 2	根	0. 064	
Y- 5	根	0. 027		S- 3	根	0. 085	
Y- 6	茎	0. 0012	德宏州	S- 4	茎	0. 0037	德宏州
C- 1	根	0. 057		S- 5	根	0. 117	
C- 2	茎	0. 0022		S- 6	茎	0. 0044	

比较看,所有种的茎中利血平的含量均很低,约为根含量的 5% ~ 10%, 不宜作为提取利血平的资源。

就根部的比较而言,云南萝芙木植株较小,生物产量低,利血平的含量也低;催吐萝芙木植株高大,生物产量多,利血平含量较高;印度萝芙木植株中等但可密植,生物产量也较多,利血平含量最高。因此,作为提取利血平的原料开发,在制定种植规划及开展人工繁育及种植产业,应首先选择催吐萝芙木和印度萝芙木。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1986 4117- 4119

[2] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究 (第一卷) [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995 306- 325

[3] 王宗玉, 刘伦辉. 中国原料植物药 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2002 295- 297

(编辑: 岳胜难)

HPLC Determination of Reserpine in *Rauvolfia* Plants

ZHANG Hui-ying¹, GONG Yun-q², CAI Chuan-tao³, RAO Gao-xiong^{1,2}

(1. Yunnan College of TCM, Kunming Yunnan 650200, China; 2. Institute of Medicinal Plant of YAAS, Kunming Yunnan 650231, China; 3. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650231, China)

ABSTRACT: The HPLC method has been established for determination of reserpine in *Rauvolfia* plants. The analysis course used the C-18 column as the immovable phase and a mixture of tetrahydrofuran-methanol-0.3% phosphoric acid solution (35:15:55) as the mobile phase. Reserpine was determined with a UV detector at 268nm. The results showed the reserpine content in the samples was in the range of 0.0012% ~ 0.117%, and reserpine was distributed in the roots of *Rauvolfia* plants mainly. According to comparison of the biologic output and the reserpine content of different samples, the species *Rauvolfia vomitoria* and *R. serpentina* were the best choice for planting.

KEY WORDS *Rauvolfia* Plants; Reserpine; Content Determination; HPLC