

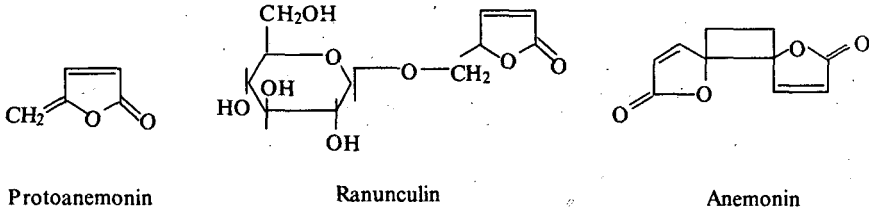
# 白头翁中毛茛甙及合成毛茛甙的高效液相色谱测定法

张秀琴 刘爱茹 徐礼桑

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

白头翁为毛茛科属植物 *Pulsatilla chinensis*, 以根入药, 其煎剂能抑制阿米巴原虫的生长、杀灭阴道滴虫等作用, 用于细菌性痢疾和阿米巴痢疾的治疗<sup>(1)</sup>。

白头翁中主要成分有原白头翁素 [protoanemonin, 系由毛茛甙(ranunculin)酶解而得]、白头翁素(anemonin)等<sup>(2)</sup>, 其结构如下:



据报道<sup>(3)</sup>某些有抗菌、抗病毒及抗癌活性的化合物均含有  $\alpha, \beta$  不饱和的  $\gamma$ -内酯结构, 毛茛甙即属此类结构。本所合成室已进行了毛茛甙的合成<sup>(4)</sup>, 因此研究其含量测定具有一定的意义。

本文研究并建立了白头翁中毛茛甙及合成毛茛甙的反相 HPLC 含量测定方法。实验表明生药中毛茛甙以甲醇提取, 无需进行净化即可测定, 本法操作简便、快速、重现性好。

## 实 验 部 分

### 一. 仪器与试剂

高效液相色谱仪 由 510 型恒流泵(Waters)、可变波长紫外检测器 SPD-2A 型(Shimadzu)、7125 型进样阀(Rheodyne)、台式自动平衡记录器(上海自动化仪表二厂)与数据处理机(Chromatopac) C-R1B 型(Shimadzu)等组成。毛茛甙对照品 mp 138 ~ 140 °C, 本所合成室提供, 用薄层色谱法, 多种展开剂作色谱检查仅出现一个斑点。倍他米松 mp 238.5 °C, 天津中央药厂。其它试剂均为分析纯。白头翁生药样品由本所宋万志同志鉴定。

内标液 精密称取倍他米松约 50 mg 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇 40 ml, 溶解后用蒸馏水稀释至刻度、摇匀, 备用。

对照品溶液 精密称取毛茛甙对照品约 25 mg, 置 25 ml 量瓶中, 用 MeOH-H<sub>2</sub>O(4:1) 溶解并调至刻度, 摇匀, 备用。

### 二. 色谱条件

色谱柱 4 mm × 250 mm 不锈钢柱, 填充以 LiChrosorb PR18(10  $\mu$ m, Merck) 化学键合

固定相。流动相 MeOH—H<sub>2</sub>O (40 :10), 流量:1.0 ml/min;检测波长 225 nm; 检测器灵敏度 0.04 AUFS。

三. 线性关系

精密量取对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 ml, 分别置于 5 ml 具塞试管中, 用流动相稀释至 3.0 ml, 在上述色谱条件下进行测定, 毛茛甙量在 0.68 ~ 2.72 μg 间与峰高呈一通过原点的直线。

四. 色谱分离

在上述色谱条件下, 毛茛甙对照品或生药提取样品与内标物的色谱分离图如图 1。

五. 校正因子的测定

精密量取对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5 及 2.0 ml 分别置于 5 ml 具塞磨口试管中各精确加入内标液 1.0 ml 后, 加 MeOH—H<sub>2</sub>O (40 :10) 至 3.0 ml, 摇匀, 取 4 μl 注入色谱柱, 结果如表 1。校正因子 8 次平均值为 1.91, 标准差为 0.64%。

六. 分析方法

**生药的提取** 准确称取白头翁生药细粉(40目) 1g。置改良式提取器中, 加入 25 ml 甲醇, 在沸水浴中回流提取 2h, 浓缩提取液并定容为 10.0 ml, 取 5 ml 置离心管中, 离心后取上清液备用。

**合成毛茛甙样品溶液** 精密称取毛茛甙样品约 10 mg, 置 10 ml 量瓶中, 用 MeOH—H<sub>2</sub>O (40 :10) 溶解并调节至刻度。

**拟定方法** 准确吸取生药提取液(或毛茛甙样品

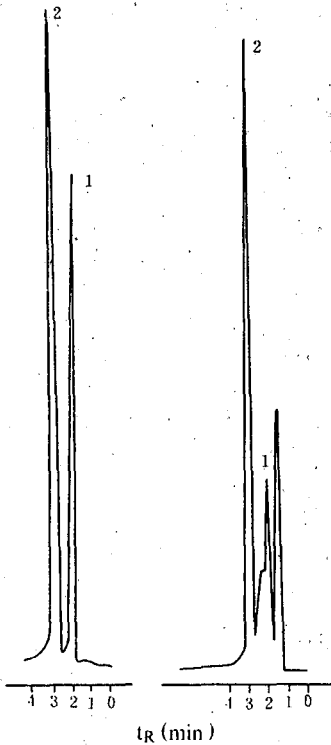


Fig 1. HPLC chromatogram of ranunculin (1); betamethasone (2) and sample extract (right).

Tab 1. Determination of calibration factor

No.	Amount of ranunculin(μg)	Amount of beta metamethasone(μg)	Peak height of ranunculin(cm)	Peak height of betamethasone (cm)	Factor
1	0.680	1.427	4.15	16.6	1.91
	"	"	4.20	16.9	1.91
2	1.360	"	8.40	16.8	1.91
	"	"	8.55	17.0	1.90
3	2.040	"	12.90	17.2	1.91
	"	"	12.70	17.0	1.91
4	2.720	"	16.70	16.8	1.92
	"	"	16.70	16.8	1.92

溶液)1.0 ml, 内标溶液 1.0 ml 及 MeOH—H<sub>2</sub>O (4 :1) 1.0 ml, 混匀后, 在上述色谱条件下, 量取 4 μl 注入色谱柱中, 分离后由色谱图上测量毛茛甙及内标物的峰高, 按下式计算含量:

$$\text{含量 \%} = \frac{f \cdot h_s \cdot M_i}{h_i \cdot M_s} \times 100\%$$

$f$  = 校正因子;  $h_s$  = 样品峰高;  $h_i$  = 内标物峰高;  $M_s$  = 样品量( $\mu\text{g}$ );  $M_i$  = 内标物量( $\mu\text{g}$ )

方法精密度 以合成毛茛甙样品测定 6 次, 其变异系数为 1%。

### 七. 样品分析

按上述色谱条件及拟定方法, 测定合成毛茛甙样品及白头翁生药样品, 其结果如表 2 及表 3。

Tab 2. Results of determination for synthetic ranunculin

No.	Amount of sample ( $\mu\text{g}$ )	Amount of internal standard ( $\mu\text{g}$ )	Peak height of sample (cm)	Peak height of internal standard (cm)	Content (%)
1	1.6932	1.4268	10.55	17.50	97.0
	"	"	10.50	17.40	97.1
	"	"	10.40	17.10	97.9
2	1.6532	"	10.20	17.40	96.6
	"	"	10.20	17.30	97.2
3	1.7600	"	10.70	17.30	95.8
	"	"	10.95	17.70	95.8
	"	"	10.60	17.20	95.4
4	1.6668	"	10.40	17.55	96.9
	"	"	10.40	17.50	97.2
5	1.6668	"	10.15	17.20	96.5
	"	"	10.40	17.60	96.6
	"	"	10.60	18.00	96.3
6	1.8800	"	12.10	17.70	99.1
	"	"	11.90	17.45	98.8

Tab 3. Determination of ranunculin in crude drug

No.	Amount of sample ( $\mu\text{g}$ )	Amount of internal standard ( $\mu\text{g}$ )	Peak height of sample (cm)	Peak height of internal standard (cm)	Content (%)
1	133.3	1.4268	5.75	17.70	0.66
2	"	"	5.70	17.70	0.66
3	"	"	5.80	18.20	0.65

### 八. 回收率试验

称取一定量对照品加入生药样品中, 按拟定方法操作后进行测量, 其回收率见表 4。

Tab 4. Recovery of ranunculin

No.	Amount added ( $\mu\text{g}$ )	Amount determined ( $\mu\text{g}$ )	Recovery (%)
1	1.36	1.36	100
2	1.36	1.34	98.6
3	1.36	1.33	97.9
4	0.68	0.67	98.6
5	0.68	0.66	97.1
6	0.68	0.66	97.1
mean			98.2

### 结果与讨论

一. 曾用硅胶柱及十八烷基化学键合相色谱柱比较了各种流动相的分离效果, 实验表明在化学键合柱上以 MeOH-H<sub>2</sub>O(40 :10)或(30 :10)为流动相, 分离效果较好, 故选用 40 :10 作流动相。

二. 毛茛甙样品溶液不稳定, 随着放置时间的增加, 在色谱图上出现的杂质峰的峰高随之增大, 结果如图 2。因此样品配成溶液后不要放置过夜, 应立即进行色谱分析, 出现之杂峰可能是毛茛甙的水解产物, 但有待进一步探索。

三. 生药中毛茛甙的提取, 比较了冷浸后超声法和热回流提取法, 超声法提取结果偏低, 故采用热回流法提取, 其结果如表 5。

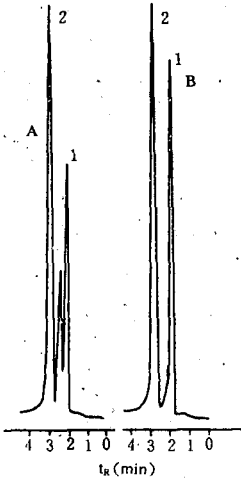


Fig 2. HPLC chromatogram of ranunculin and betamethasone. A. Solution prepared for two days; B. Solution freshly prepared. 1. Ranunculin; 2. Betamethasone.

Tab 5. Results of determination by different methods

Extraction method	Amount of sample (μg)	Amount of internal standard (μg)	Peak height of sample (cm)	Peak height of internal standard (cm)	Content (%)
Ultra sonic wave	133.3	1.427	3.65	17.5	0.43
	133.3	1.427	3.65	17.5	0.43
Reflux	133.3	1.427	5.75	17.7	0.66
	133.3	1.427	5.70	17.7	0.66
	133.3	1.427	5.80	18.2	0.65

关键词 毛茛甙; 白头翁; 高效液相色谱

### 参考文献

- 1.《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(上册). 北京: 人民卫生出版社, 1975:283.
- 2.沙世炎, 等编. 中草药有效成份分析法. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1982:67.
3. Pattenden G. Natura-4-ylidenebutenolides and 4-ylidenetetrone acids. *Fortschr Chem Org Naturst* 1978;35:133.
- 4.方政, 等. 毛茛甙全合成的研究. *药理学报* 1989;24:182.

## DETERMINATION OF RANUNCULIN IN *PULSATILLA CHINENSIS* AND SYNTHETIC RANUNCULIN BY REVERSED PHASE HPLC

XQ Zhang, AR Liu and LX Xu

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

**ABSTRACT** A method for the determination of ranunculin in *Pulsatilla chinensis* and synthetic ranunculin by reversed phase HPLC using betamethasone as internal standard is described. The column employed was a 10 μm LiChrosorb RP-18 (230 × 4 mm), the eluting solvent consisted of methanol-water (40 :10, V/V) and the effluent was monitored at 225 nm.

The advantages of this method are simple, rapid and accurate. The coefficients of variation are less than 1%.

**Key words** Ranunculin; *Pulsatilla chinensis*; HPLC