

高效液相色谱法测定天山花楸中 金丝桃苷的含量

杨玲玲, 常军民*, 姚 军
(新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘 要: 目的: 建立天山花楸枝叶中金丝桃苷的含量测定方法。方法: 采用 HPLC Shim-pack VP-ODS 柱(150mm × 4.6mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(25:75, V/V), 流速为 1.0ml/min, 柱温为 25℃, 检测波长为 360nm。结果: 金丝桃苷在 0.04~0.32mg/ml 之间线性关系良好, $r = 0.9992$, 平均回收率 99.7%, RSD 为 2.6%; 结论: 本法快速、灵敏、准确、可靠、重复性好, 可用于天山花楸药材的质量控制。

关键词: 天山花楸; 金丝桃苷; 高效液相色谱法

HPLC Determination of Hyperoside in Stems and Leaves of *Sorbus tianschanica* Rupr

YANG Ling-ling, CHANG Jun-min*, YAO Jun
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: Hyperoside was extracted from stems and leaves of *Sorbus tianschanica* Rupr with methanol and then subjected to HPLC analysis. The determination (at 360 nm) was performed on a Shim-pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column (25 °C) using acetonitrile - water (25:75, V/V) as a mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min. A good linearity was obtained within the range of 0.04 – 0.32 mg and the correlation coefficient was 0.9992. The average recovery for hyperoside was 99.7% and the RSD was 2.6%. The method is simple, rapid, sensitive, precise, reliable and repeatable and can be applied to the quality control of stems and leaves of *Sorbus tianschanica* Rupr as a kind of Chinese medicinal material.

Key words: *Sorbus tianschanica* Rupr; hyperoside; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)12-0154-03

天山花楸(*Sorbus tianschanica* Rupr.), 系蔷薇科(Rosaceae)花楸属(*Sorbus*)植物(*Sorbus tianschanica* Rupr.)^[1]。天山花楸嫩枝叶, 茎皮和果实常作为维吾尔医用药, 维吾尔名称为 Tianxan Qitini, 为“花楸”正品之一。《新疆药品标准》(1980 年版)将其收载并规定为蔷薇科植物 *Sorbus tianschanica* 的干燥果实, 其有清热利肺、补脾生津、止咳的功效^[2]。现代研究表明, 天山花楸主要药效成分为黄酮类和氰苷类化合物^[3]。金丝桃苷具有很好的治疗慢性气管炎、哮喘的作用^[4], 是天山花楸中主要的活性成分、含量高, 用于天山花楸的质量控制专属性强。因此本实验拟建立高效液相色谱法测定其含量的方法, 为评价天山花楸药材质量提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

天山花楸的枝叶样品采自新疆维吾尔自治区昌吉州米泉市铁仓沟林场, 经新疆医科大学药学教研室帕丽达教授鉴定为 *Sorbus tianschanica* Rupr.。

金丝桃苷标准品(批号: 111521-200303) 中国药品生物制品检定所。甲醇(色谱纯); 超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪 日本岛津公司; SPD-M20A 检测器; SIL-20A 自动进样器; KQ-200KDE 型高功率数控超声波清洗器(超声功率 200W, 工作频率 60Hz) 昆山市超声仪器有限公司; 2-16K sartorius 离心机 Sigma

收稿日期: 2008-09-08

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2005119)

作者简介: 杨玲玲(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。E-mail: muyiling@sina.com

* 通讯作者: 常军民(1965-), 男, 副教授, 研究方向为药物分析。E-mail: cjmecn2471@yahoo.com.cn

公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

Shim-pack VP-ODS 色谱柱(150mm × 4.6mm, 5μm); 流动相为乙腈-水(25:75, V/V); 柱温为 25℃; 流速为 1.0ml/min; 检测波长: 360nm。

按上述色谱条件进行实验, 金丝桃苷的 $n=1794.96$; $R_1=1.74$ 、 $R_2=1.52$ 、 $T=0.89$, 符合《中国药典》(2005 版) I 部附录中理论塔板数、分离度、拖尾因子的规定。标准品与样品的色谱图见图 1。

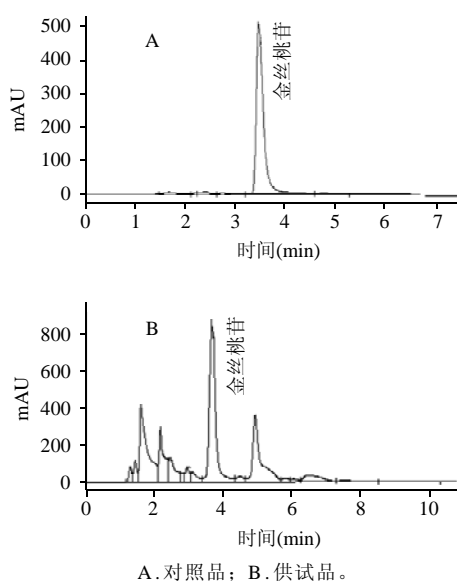


图1 金丝桃苷对照品与样品色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of hyperoside standard (A) and sample (B)

1.3.2 标准品溶液的制备

精密称取 10mg 金丝桃苷标准品, 加甲醇溶解并定容于 25ml 容量瓶中, 浓度为 400 μg/ml, 待用。

1.3.3 供试品溶液的制备

样品研磨均匀, 精密称取 5g, 置 100ml 具塞三角瓶中, 加甲醇 50ml, 60℃ 超声提取 30min, 相同条件提取三次, 合并提取液, 4000r/min 离心 15min, 取上清液将甲醇挥尽, 后用水溶解, 再用乙醚萃取, 最终将水溶液浓缩后用甲醇定容至 10ml, 摇匀, 再精密量取 1ml 稀释定容至 10ml, 摇匀, 即的供试品溶液, 备用。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

精密吸取金丝桃苷标准贮备液 1、2、4、6、8ml, 分别置于 10ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。按 1.3.1 节色谱方法, 取 10μl 注入液相色谱仪分别测定,

以峰面积为横坐标、浓度为纵坐标、进行线性回归, 回归方程为 $y = -2.575 + 5.748 \times 10^{-2}x$, $r=0.9992$, 实验表明, 金丝桃苷在 0.04~0.32mg/ml 范围内呈良好的线性关系。最低检测浓度为 42ng/ml ($S/N=3$)。

2.2 精密度实验

精密吸取金丝桃苷标准溶液, 按 1.3.1 节色谱条件测定, 取 10 μl 注入液相色谱仪, 重复 5 次, 测定峰面积, 其 RSD 为 1.2% ($n=5$), 表明精密度良好(表 1)。

表1 金丝桃苷精密度实验

Table 1 RSD of precision

| 序号 | 峰面积 | 峰面积平均值 | RSD(%) |
|----|---------|---------|--------|
| 1 | 6352.12 | 6335.75 | 1.2 |
| 2 | 6412.39 | | |
| 3 | 6321.29 | | |
| 4 | 6377.52 | | |
| 5 | 6215.44 | | |

2.3 稳定性实验

取同一供试品溶液, 分别于 2、4、8、10h 进样, 按 1.3.1 节色谱条件测定, 所测峰面积的 RSD 为 1.8%, 表明供试品溶液在 10h 内稳定性良好(表 2)。

表2 金丝桃苷稳定性实验

Table 2 RSD of stability

| 序号 | 峰面积 | 峰面积平均值 | RSD(%) |
|----|---------|---------|--------|
| 1 | 2729.25 | 2755.43 | 1.8 |
| 2 | 2826.84 | | |
| 3 | 2792.11 | | |
| 4 | 2709.84 | | |
| 5 | 2719.09 | | |

2.4 重复性实验

取同一批天山花楸 5 份, 每份 5.0g, 按 1.3.3 节方法提取样品, 含量按 1.3.1 节的方法重复测定, 以外标法计算其 RSD 为 2.6% ($n=5$), 结果见表 3。

表3 金丝桃苷重复性实验

Table 3 RSD of repeatability

| 样品(g) | 金丝桃苷含量(mg) | 含量平均值(mg) | RSD(%) |
|--------|------------|-----------|--------|
| 5.0103 | 1.579 | 1.547 | 2.6 |
| 4.9923 | 1.533 | | |
| 5.0038 | 1.569 | | |
| 5.0096 | 1.573 | | |
| 5.0079 | 1.482 | | |

2.5 回收率实验

精密称取样品粉末 5g, 共 6 份, 分别加入标准品溶液, 按供试品溶液的制备方法制备测试溶液, 经一次稀释定容至 10ml 并测定, 计算回收率, 结果见表 4。计算得金丝桃苷的平均回收率为 99.7%, $RSD = 2.5\%$ 。

表4 金丝桃苷回收率实验

Table 4 Average recovery for hyperoside in sample spiked and the RSD

| 样品 (g) | 金丝桃苷含量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|-----------|----------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| 5.0069 | 1.411 | 0.412 | 1.824 | 100.2 | | |
| 5.0103 | 1.579 | 0.412 | 1.989 | 99.5 | | |
| 5.0038 | 1.569 | 0.824 | 2.395 | 100.2 | 99.7 | 2.5 |
| 5.0096 | 1.573 | 0.824 | 2.388 | 98.9 | | |
| 4.9882 | 1.528 | 1.648 | 3.174 | 99.9 | | |
| 4.9923 | 1.533 | 1.648 | 3.176 | 99.7 | | |

2.6 样品测定

表5 样品金丝桃苷含量测定结果(n = 5)

Table 5 Parallel determination results of hyperoside in 5 g of sample

| 实验号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 样品(g) | 5.0069 | 5.0103 | 5.0096 | 4.9882 | 5.0038 |
| 金丝桃苷含量(mg/g) | 2.98 | 3.15 | 3.14 | 3.09 | 3.13 |
| RSD(%) | | | 2.3 | | |

精密称取样品粉末 5g(精度 0.0001g), 按 1.3.3 节方法提取, 并按 1.3.1 节色谱方法进行测定, 以外标法计算金丝桃苷的含量, 结果见表 5, 得样品平均含量

为 3.10mg/g。

3 结 论

本实验采用 HPLC 定量分析方法测定天山花楸枝叶中金丝桃苷的含量, 测定条件为流动相乙腈 - 水(25:75, V/V)、流速 1.0ml/min、柱温 25℃、检测波长 360nm, 此色谱条件下金丝桃苷在 0.04~0.32mg/ml 之间线性关系良好($r = 0.9992$), 平均回收率 99.7%, RSD=2.6%, 分离效果较好。金丝桃苷含量高达 3.10mg/g, 充分说明天山花楸枝叶中黄酮含量较高, 且本法快速、灵敏、准确、可靠、重复性好, 可用于天山花楸枝叶药材的质量控制。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第三十六卷[M]. 北京: 科学技术出版社, 1974:284
- [2] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志: 第二卷(第二分册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1973: 62
- [3] 赵永昕, 帕提古丽·马合木提. 新疆天山花楸不同药用部位总黄酮的提取及其定量测定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 414-415.
- [4] 陶遵威. 金丝桃甙药理作用研究进展[J]. 天津药学, 2002,14(2): 14-16.