

HPLC 测定天山花楸叶提取物中6种黄酮成分

王幻, 唐辉*, 王国军, 阚萌萌, 任涵兰, 徐鹏, 李照雪

(石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832002)

[摘要] 目的: HPLC 梯度洗脱法同时测定天山花楸叶提取物中的芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷、紫云英苷、山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷。方法: 采用 Waters C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m), 乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 运行时间 30.0 min, 平衡时间 10 min, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 波长 360 nm。结果: 芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷、紫云英苷、山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷分别在 3.3 ~ 39.5, 6.2 ~ 74.1, 12.3 ~ 147.5, 14.3 ~ 171.2, 7.5 ~ 90.4, 15.6 ~ 187.5 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 98.1%, 97.5%, 94.5%, 95.8%, 102.2%, 97.9%, 其 RSD 分别为 1.37%, 1.57%, 1.02%, 1.77%, 2.48%, 1.38%。结论: 该法操作简便、快捷、准确、稳定性及重复性好, 可用于对天山花楸中6个成分的含量测定。

[关键词] 天山花楸; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷; 紫云英苷; 山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0058-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150058

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1546.018.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:46

Simultaneous Determination of Six Compounds in *Sorbus tianschanica* Extract by HPLC

WANG Huan, TANG Hui*, WANG Guo-jun, KAN Meng-meng, REN Han-lan, XU Peng, LI Zhao-xue

(College of Pharmacy Shihezi University Key Laboratory of
Xinjiang Phytomedicine Resources, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** A high-performance liquid chromatographic method was established to evaluate the quality of *Sorbus tianschanica* with a simultaneous determination of six compounds [rutin, hyperoside, isoquercitrin, quercetin-3-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucoside, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside and kaempferol-3-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucopyranoside]. **Method:** The Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) column was adopted and diluted with acetonitrile-0.4% potassium dihydrogen phosphate gradiently at the wavelength of 360 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 25 $^{\circ}$ C. **Result:** The method had good linearity over the range of 3.3-39.5, 6.2-74.1, 12.3-147.5, 14.3-171.2, 7.5-90.4, 15.6-187.5 mg·L⁻¹ for rutin, hyperoside, isoquercitrin, quercetin-3-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucoside, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-(6"-O-malonyl)- β -D-glucopyranoside, respectively. The average recovery ($n=6$) of six components were 98.1%, 97.5%, 94.5%, 95.8%, 102.2%, and 97.9%, with RSDs of 1.37%, 1.57%, 1.02%, 1.77%, 2.48%, and 1.38% ($n=6$). **Conclusion:** The developed

[收稿日期] 20131024(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260627);石河子大学国家级大学生创新创业训练计划项目(111075938)

[第一作者] 王幻, 硕士, 从事天然药物分析研究, Tel: 13565544456, E-mail: 82540129@qq.com

[通讯作者] *唐辉, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事新疆特种植物药的开发与利用研究, Tel: 0993-2055002, E-mail: th_ph@shzu.edu.cn

method is convenient, rapid and accurate with high repeatability and stability, it is suitable for the content determination.

[Key words] *Sorbus tianschanica*; rutin; hyperoside; isoquercitrin; quercetin-3-*O*-(6''-*O*-malonyl)- β -*D*-glucoside; kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside; kaempferol-3-*O*-(6''-*O*-malonyl)- β -*D*-glucopyranoside

天山花楸为蔷薇科植物^[1],其枝叶和果实维吾尔、哈萨克族民间临床中,常被用以治疗肺结核、慢性气管炎、咳嗽等疾病。药理实验证明天山花楸具有保护心肌缺血、镇咳平喘、抗动脉粥样硬化和治疗糖尿病等^[2-5]作用。天山花楸枝叶提取物中黄酮类化合物的质量分数可达 6%~8%^[6-7],对其黄酮类单体化合物的含量测定,目前仅限于几种常见的化合物,如槲皮素、芦丁、金丝桃苷等^[8-11],本课题组用高速逆流色谱仪(HSCCC)分离纯化其单体,在确定了化学成分的研究基础上,首次分离到槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷、紫云英苷、山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷 3 个化合物,并建立了 HPLC 梯度洗脱法同时测定天山花楸叶提取物中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷、紫云英苷、山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷 6 种黄酮类成分的定量分析方法。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A 型高效液相色谱仪(包括在线脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器,LC solution 工作站等,日本岛津),BP211D 型电子分析天平(德国 Staotious),AR1140 型 1/万电子分析天平(奥豪斯国际贸易有限公司),TP 300 型超声波清洗器(天鹏电子新技术有限公司),A-1000S 型水流抽气机(德国, EYELA),CCA-20 型低温冷却水循环泵。

1.2 试剂 对照品芦丁(批号 100080-200707)、金丝桃苷(批号 111521-200505)、紫云英苷(批号 110756-200110)均购自中国食品药品检定研究院、异槲皮素苷(上海博蕴生物科技有限公司,批号 21637-25-3)、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷(自制,纯度 97%) and 山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷(自制,纯度 96%)由本实验室分离得到,经 MS,¹H-NMR,¹³C-NMR 确定结构,并通过 HPLC 峰面积归一化法分析测定纯度。乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。天山花楸叶采自新疆玛纳斯林场,经石河子大学药学院李鹏副教授鉴定为蔷薇科天山花楸 *Sorbus tianschanica* Rupr. 天山花楸黄酮提取物自制(批号 20150324);以芦丁为对照品,采用紫外分光光度法测定了天山

花楸叶提取物中总黄酮的质量分数 >65%。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液配制 精密称取经减压干燥至恒重的芦丁、金丝桃苷、异槲皮素苷、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷、紫云英苷、山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷适量,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇配置成含芦丁 65.9 mg·L⁻¹、金丝桃苷 123.5 mg·L⁻¹、异槲皮素苷 245.8 mg·L⁻¹、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷 285.3 mg·L⁻¹、紫云英苷 150.7 mg·L⁻¹、山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷 312.5 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,即得。

2.2 样品溶液的制备 称取天山花楸叶粉 1 kg,用 60% 乙醇超声循环提取 2 次,每次提取 30 min,浓缩。加入澄清剂沉淀过滤后,经 AB-8 大孔吸附树脂,经水和 60% 乙醇分别洗脱,收集 60% 醇洗脱液,浓缩冷冻干燥即得天山花楸总黄酮提取物 74 g。精密称取天山花楸叶总黄酮提取物粉末 24.8 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇定容。精密量取 3 mL 于 10 mL 量瓶中,用流动相定容,过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液做为样品溶液,待测。

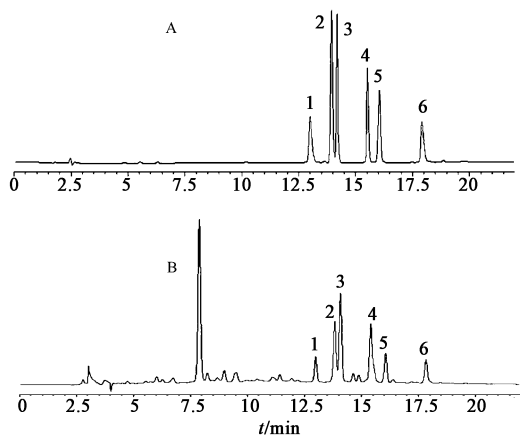
2.3 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),检测波长 254 nm,柱温箱温度 25 $^{\circ}$ C,流动相乙腈-0.4% 磷酸溶液梯度洗脱(0~20 min, 15%~22% A; 20~30 min, 22%~30% A),平衡时间 5 min,进样量 10 μ L,流速 1 mL·min⁻¹。见图 1。在上述色谱条件下,样品保留时间适宜,样品中各个组分的色谱峰分离度良好。

2.4 标准曲线的绘制 分别精密取 2.1 项下的对照品溶液 0.5, 1.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,以甲醇定容,摇匀,即得系列浓度的混合对照品溶液,进样体积为 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图。以色谱图峰面积(*Y*)为纵坐标,对照品溶液进样量(*X*)为横坐标,进行线性回归,得回归方程,见表 1。取混合对照品不断稀释后进样分析,以 3 倍信噪比确定检测限,结果见表 1。

2.5 精密度试验 将 2.1 项下中间质量浓度梯度点的混合对照品,依照 2.3 中的色谱条件连续进样

表 1 天山花楸中 6 个成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

成分	标准曲线方程	<i>r</i>	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
芦丁	$Y = 150.0X + 69.53$	0.999 8	3.3 ~ 39.5	0.23
金丝桃苷	$Y = 208.7X + 46.99$	0.999 9	6.2 ~ 74.1	0.34
异槲皮素苷	$Y = 155.6X + 53.56$	0.999 8	12.3 ~ 147.5	0.21
槲皮素-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -丙二酰基)- β - <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y = 112.2X + 58.84$	0.998 0	14.3 ~ 171.2	0.53
紫云英苷	$Y = 111.8X + 43.16$	0.999 9	7.5 ~ 90.42	0.36
山柰素-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -丙二酰基)- β - <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y = 61.64X + 16.41$	0.999 7	15.6 ~ 187.5	0.67



A 混合对照品; B 供试品; 1. 芦丁; 2. 金丝桃苷;
3. 异槲皮苷; 4. 槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷;
5. 紫云英苷; 6. 山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷

图 1 天山花楸 HPLC

测定 6 次, 进样量 10 μL , 记录每个对照品的峰面积, 求得日内精密性; 连续进样 3 d, 每天进样 1 次, 求得日间精密性。结果表明, 6 种成分峰面积的日内精密性的 RSD 分别为 1.17% , 0.27% , 0.38% , 0.77% , 0.49% , 0.27% ; 日间精密性的 RSD 分别为 2.08% , 0.51% , 0.44% , 0.89% , 0.63% , 0.32% , 结果表明仪器精密性良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 按 2.2 项中色谱条件于 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 分别进样测定, 记录 6 种成分的峰面积。结果 6 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.36% , 1.47% , 1.10% , 0.50% , 1.60% , 1.40% , 表明各个组分在 24 h 内稳定良好。

2.7 重复性试验 按照 2.2 项下的条件平行配置供试品溶液 6 份, 按项目 2.3 中色谱条件进样测定, 记录 6 种成分的积分峰面积, 6 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.61% , 1.41% , 0.90% , 1.34% , 1.44% , 1.94% , 结果表明方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取 2.2 项下处理的已知含量的天山花楸叶总黄酮提取物粉末 6 份, 每份约 6.12 mg, 精密称定, 定容至 10 mL 量瓶中。精密

量取芦丁 ($73.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、金丝桃苷 ($153.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、异槲皮素苷 ($297.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷 ($317.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、紫云英苷 ($199.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷 ($256.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 过 0.45 μm 滤膜。计算各化合物的平均加样回收率见表 2。

表 2 天山花楸叶提取物中 6 种成分加样回收率试验 ($n = 6$)

成分	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	平均值 / $\%$	RSD / $\%$
芦丁	7.2	7.38	14.44	98.1	1.37
金丝桃苷	13.50	15.36	28.48	97.5	1.57
异槲皮素苷	29.4	29.7	57.50	94.5	1.02
槲皮素-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - 丙二酰基)- β - <i>D</i> -葡萄 糖苷	31.32	31.73	61.55	95.8	1.77
紫云英苷	17.65	19.98	38.06	102.2	2.48
山柰素-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - 丙二酰基)- β - <i>D</i> -葡萄 糖苷	24.66	26.50	49.01	97.9	1.38

2.9 样品含量测定 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样体积 10 μL , 计算芦丁、金丝桃苷、异槲皮素苷、槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷、紫云英苷、山柰素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖苷的含量。4 批样品测定结果见表 3。

3 讨论

考察了提取溶剂 (甲醇及 30% , 60% , 80% , 95% 乙醇)、提取方法 (热回流和超声法)、提取时间 (20, 30, 40 min) 和提取次数 (1, 2 次), 结果以 60% 乙醇作为提取溶剂, 超声法提取 30 min, 超声 2 次, 色谱峰数目较多, 且方法简单, 经济实用。

分别对甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水、乙腈-乙酸水等多个流动相系统不同比例进行了等度和梯度试验, 结果甲醇-水和甲醇-磷酸水系统条件下, 槲皮素-3-*O*-(6''-*O*-丙二酰基)- β -*D*-葡萄糖

表 3 天山花楸叶提取物黄酮苷的含量($n=4$)

批号	提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$						RSD/%					
	芦丁	金丝桃苷	异槲皮素苷	槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷	紫云英苷	山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷	芦丁	金丝桃苷	异槲皮素苷	槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷	紫云英苷	山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷
20130310	0.870 6	1.632 4	3.555	3.788 4	2.134 2	2.981 8	0.52	0.69	1.02	1.37	0.97	1.14
20130328	0.830 6	1.592 4	3.258	3.389 3	1.868 9	2.583 3	0.45	0.84	1.09	1.39	0.87	1.22
20130405	0.884 3	1.942 4	3.699	3.628 4	2.345 6	3.233 4	0.60	0.75	1.12	1.53	0.94	1.26
20130427	0.927 7	1.740 2	3.899	3.982 4	2.033 4	3.372 2	0.55	0.72	0.97	1.34	0.99	1.13

苷不能达到完全分离,基线漂移严重;乙腈-水系统条件下,槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷、紫云英苷、山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷存在拖尾现象;乙腈-乙酸水系统条件下,黄酮类为酚酸类化合物,容易造成拖尾峰,基线不稳;因此选择乙腈-磷酸水系统为流动相。曾尝试过体积分数 0.05%、0.1%、0.3%、0.4% 磷酸水溶液,经试验证明体积分数 0.4% 磷酸水溶液梯度洗脱各测定物质的柱效和相邻两物质之间的分离度最佳,有效消除了峰的拖尾现象。故确定流动相为乙腈-0.4% 磷酸水溶液梯度洗脱。本实验采用二极管阵列检测器在 200~500 nm 检测,结果表明 360 nm 下各指标成分都具有适宜的灵敏度,且在此波长下基线平整,其他成分干扰小。故选择 360 nm 为测定波长。

本试验中所涉及的部分对照品为本实验室自制,通过 HSCCC 分离天山花楸叶黄酮提取物中的黄酮化合物,经过大孔树脂纯化后,通过二级质谱数据分析、 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR 及对照品比对,明确了天山花楸叶黄酮提取物中 6 种主要化合物的结构^[12-13],并通过 HPLC 峰面积归一化法分析测定纯度。

本文所建立的天山花楸中 6 种化合物的含量测定方法简单准确、稳定可靠、精密度高、重复性好符合快速分析的要求,达到了快速测定黄酮苷含量的目的。

[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 36 卷[M]. 北京:科技出版社,1974:284.
- [2] 于明,李铤. 花楸属植物化学成分药理作用及其研究进展[J]. 辽宁中医学院学报,2004,6(5):364.

- [3] 张芹,李根,唐辉,等. 天山花楸不同的提取部分对心肌缺血性保护作用的筛选[J]. 中国药理学通报,2009,25(2):277.
- [4] 付伟,刘婷,杨彩玉,等. 天山花楸叶总黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(2):251.
- [5] Termentzi A, Alexiou P, Demopoulos V, et al. Inhibitory effect of Sorbus domestic-ca fruits extracts on aldose reductase enzyme in correlation to their phenolic content[J]. Phar Mazie,2008,63(9):8567.
- [6] 张芹,刘宝刚,李鹏,等. 天山花楸中总黄酮和槲皮素测定[J]. 石河子大学学报,2006,24(6):709.
- [7] 常军民,向阳,李毓斌,等. 天山花楸药材质量标准研究[J]. 新疆医科大学学报,2013,36(6):785.
- [8] 李乐,李鹏,张芹,等. HPLC 法测定天山花楸中芦丁的含量[J]. 四川中医,2008,26(9):51.
- [9] LI Le, TANG Hui, WU Tao, et al. Chemical composition of leaves [J]. Chem Nat Comp, 2010, 46:811.
- [10] 张薇,常军民,沈美英,等. RP-HPLC 法测定天山花楸果实中苦杏仁苷、芦丁、金丝桃苷和橙皮苷的含量[J]. 药物分析杂志,2011(05):935.
- [11] 李毓斌,常军民,王岩. 天山花楸药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2011,33(5):742.
- [12] YU Chang-zhi, ZHENG Yong-gang, LI Le, et al. Flavonoids from leaves of *Sorbus tianschanic*[J]. Chem Nat Comp,2013,49(3):115.
- [13] YU Chang-zhi, ZHENG Yong-gang, TANG Hui, et al. Preparative isolation and purification of four bioactive compounds from *Sorbus tianschanica* Rupr by High-Speed Counter-Current Chromatography[J]. J Medicinal Plants Research,2012, 38(6):5142.

[责任编辑 顾雪竹]