

RP-HPLC 法测定番石榴叶中桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷的含量

万凯化¹, 付辉政², 罗永明², 张东明^{3*}

(1. 江西省食品药品检验所, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006;
3. 北京协和医学院中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

[摘要] 目的: 建立番石榴叶中桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷的含量测定方法。方法: 用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1% 磷酸溶液 (35: 65) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 355 nm。结果: 桑黄素来苏糖苷在 0.061 32~ 0.143 08 μg 范围内呈良好的线性关系 ($r = 0.999 9$); 桑黄素阿拉伯糖苷在 0.058 44~ 0.136 36 μg 范围内呈良好的线性关系 ($r = 1$), 平均回收率分别为 98.6% 和 100.7%, RSD 分别为 1.0% 和 1.7%。结论: 本方法对番石榴叶质量标准的制定具有很好的参考价值。

[关键词] 反相高效液相色谱; 番石榴叶; 桑黄素来苏糖苷; 桑黄素阿拉伯糖苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0021-03

RP-HPLC Determination of Morin-3-O- α -L-lyxopyranoside and Morin-3-O- α -L-arabopyranoside from *Psidium guajava* leaf

WAN Kai-hua¹, FU Hui-zheng², LUO Yong-ming², ZHANG Dong-ming^{3*}

(1. Jiangxi Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for determination of Morin-3-O- α -L-lyxopyranoside and Morin-3-O- α -L-arabopyranoside in *Psidium guajava* L. **Methods:** A Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, methanol-0.1% phosphoric acid solution (35: 65) as the mobile phase, flow rate at 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 355 nm. **Results:** The of calibration curve Morin-3-O- α -L-lyxopyranoside was linear between 0.061 32~ 0.143 08 μg ($r = 0.999 9$), The calibration curves of Morin-3-O- α -L-arabopyranoside was linear between 0.058 44~ 0.136 36 μg ($r = 1$), The average recoveries were 98.6% and 100.7%, The relative standard deviations were 1.0% and 1.7%. **Conclusion:** The method could be used for determination of Morin-3-O- α -L-lyxopyranoside and Morin-3-O- α -L-arabopyranoside from *Psidium guajava* L. .

[Key words] RP-HPLC; *Psidium guajava* L. ; Morin-3-O- α -L-lyxopyranoside; Morin-3-O- α -L-arabopyranoside; assay

番石榴叶为桃金娘科植物番石榴 *Psidium*

guajava L. 的干燥叶, 性平, 味干涩, 具有收敛止泻, 消炎止血之功效。我国及其他热带、亚热带国家民间用于治疗肠胃炎、痢疾、糖尿病等疾病。研究报道^[1], 桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖为番石榴叶的抗菌活性成分。为了有效地评价番石榴叶的质

[收稿日期] 2008-10-21

[通讯作者] * 张东明, Tel: (010) 63165227; E-mail: zhangdm@imm.ac.cn

量, 本实验以桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷为指标, 采用 HPLC 法测定番石榴叶中的桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷含量。为番石榴叶质量标准的制定和研究提供了很好的参考价值。

1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪, 包括 DAD 检测器, 自动进样器, Agilent1100 化学工作站(美国安捷伦科技有限公司); 岛津 UV-260 紫外分光光度计; Sartorius 电子天平; KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯; 水为二次蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。桑黄素来苏糖苷对照品自制, 质量分数 > 98%; 桑黄素阿拉伯糖苷对照品自制, 质量分数 > 98%; 3 批番石榴叶购自樟树药材大市场, 并经中国协和医科大学药物研究所张东明研究员鉴定为桃金娘科植物番石榴 *Psidium guajava* L. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(35: 65); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 355 nm。理论板数以桑黄素来苏糖苷峰计算不得低于 3 000。在以上色谱条件下, 番石榴叶中桑黄素来苏糖苷、桑黄素阿拉伯糖苷与其它组分的色谱峰分离度良好。见图 1。

2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 蒸干, 加水 25 mL 使溶解, 用乙酸乙酯提取 3 次, 每次 25 mL, 合并提取液, 蒸干, 用甲醇使溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 对照品溶液的制备 精密称取桑黄素来苏糖苷对照品 10.22 mg、桑黄素阿拉伯糖苷对照品 9.74 mg, 分别至 100 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 作为对照品溶液。

2.5 线性关系考察 取桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷对照品溶液, 分别进样 6, 8, 10, 12, 14 μL, 注入液相色谱仪, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 得桑黄素来苏糖苷回归方程为 $Y = 6\,546X + 0.52$, $r = 0.999\,9$, 线性范围为 0.061\,32~0.143\,08 μg; 桑黄素阿拉伯糖苷回归方程为 $Y = 7\,720.2X - 0.75$, $r = 1$, 线性范围为 0.058\,44~

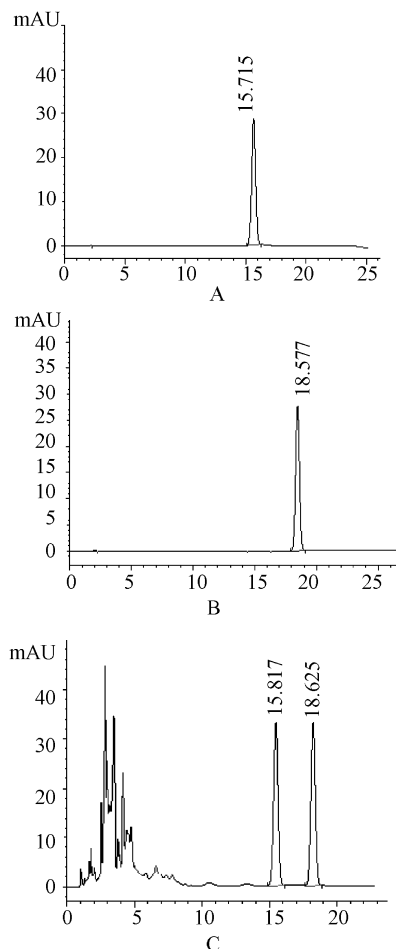


图 1 桑黄素来苏糖苷对照品(A)、桑黄素阿拉伯糖苷对照品(B)和番石榴叶药材(C)的 HPLC 图

0.136\,36 μg。

2.6 精密度试验 精密吸取供试品溶液, 重复进样 6 次, 结果桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷对照品峰面积的精密度良好, RSD 分别为 0.3%、0.8%。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于配制后的 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 分别进样 10 μL 测定, 结果表明样品溶液在 24 h 内稳定, 桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.1%。

2.8 重复性试验 取同一批番石榴叶样品 6 份制备供试品溶液, 测定每份样品中桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷量, 结果桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷的平均含量分别为 0.21 mg·g⁻¹、0.20 mg·g⁻¹, RSD 分别为 0.6%、1.4%。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的番石榴叶供试品 6 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 分别精密添加桑黄素来苏糖苷(浓度 0.010\,22 mg·mL⁻¹) 和桑黄素阿拉伯糖苷(浓度 0.00\,974 mg·mL⁻¹) 对照品溶液各 5 mL, 制备供试品溶液, 分别进样 10 μL, 测定结果见表 1。

表 1 加样回收率试验测定结果(n= 6)

| 称样量 (g) | 桑黄素来苏糖苷 | | | | | 桑黄素阿拉伯糖苷 | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| | 加入量 (mg) | 测出量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) | 加入量 (mg) | 测出量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
| 0.250 4 | 0.051 1 | 0.103 9 | 100.4 | | | 0.048 7 | 0.099 4 | 101.2 | | |
| 0.2511 | 0.051 1 | 0.103 2 | 98.9 | | | 0.048 7 | 0.099 1 | 100.4 | | |
| 0.249 3 | 0.051 1 | 0.102 7 | 98.5 | 98.6 | 1.0 | 0.048 7 | 0.099 9 | 102.8 | 100.7 | 1.7 |
| 0.250 9 | 0.051 1 | 0.102 7 | 97.9 | | | 0.048 7 | 0.098 6 | 99.4 | | |
| 0.248 4 | 0.051 1 | 0.102 4 | 98.3 | | | 0.048 7 | 0.097 5 | 98.2 | | |
| 0.252 3 | 0.051 1 | 0.102 8 | 97.5 | | | 0.048 7 | 0.100 2 | 102.1 | | |

3.10 样品含量测定 取批号不同的样品 3 批, 制备供试品溶液, 进行测定, 计算桑黄素来苏糖苷、桑黄素阿拉伯糖苷的质量分数, 测定结果见表 2。

表 2 番石榴叶中桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷的测定结果(n= 3)

| 批号 | 桑黄素来苏糖苷 含量(%) | 桑黄素阿拉伯糖苷 含量(%) |
|----------|------------------|-------------------|
| 20070912 | 0.021 | 0.020 |
| 20070914 | 0.026 | 0.024 |
| 20070916 | 0.024 | 0.023 |

3 讨论

3.1 波长的选择 经紫外扫描测定, 桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷在 210, 262, 355 nm 波长处都有特征吸收, 本实验选择 355 nm 作为测定波长, 结果选择性好, 灵敏度高。

3.2 提取方法的考察 精密称取同一批样品 2 份, 各 0.5 g, 分别用甲醇为溶剂, 一份超声提取(功率为 250 W, 频率为 25 KHz)、一份加热回流提取, 结果加热回流比超声提取的含量高, 故选择加热回流提取。

3.3 提取时间的考察 精密称取同一批样品 3 份, 各 0.5 g, 分别加热回流 40, 50, 60, 70 min, 结果表明加热回流 1 h 后, 桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷的量基本不再增加, 故确定提取时间为 1 h。

3.4 提取溶剂的选择 精密称取同一批样品 3 份, 分别用甲醇、70% 甲醇、乙醇 3 种溶剂进行考察, 采用加热回流提取方法进行提取, 结果采用甲醇为溶剂的桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷峰形好, 含量高, 故确定甲醇为最佳提取溶剂。

3.5 提取次数的考察 在试验中, 对萃取次数进行了考察, 分别比较了萃取 2, 3, 4 次, 桑黄素来苏糖苷和桑黄素阿拉伯糖苷的含量分别为 0.18, 0.21, 0.21 mg·g⁻¹ 和 0.16, 0.20, 0.21 mg·g⁻¹ 结果表明, 萃取 3 次和 4 次样品含量基本一致, 故选择萃取 3 次为佳。

[参考文献]

- [1] Hidetoshi ARIMA, Gerichi DANNŌ. 番石榴叶中抗菌化合物的分离和结构鉴定[J]. 生物化学, 2002, 66(8): 1727-1730.