

高效液相色谱法测定山楂中金丝桃苷的含量

陈宝龙^{1*}, 黄琦², 郑朝华³, 陈玉英³, 谢文¹, 冯坤¹

(1. 河南省正骨研究院, 河南 洛阳 471002; 2. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023;
3. 中国药科大学分析化学教研室, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的: 建立测定山楂中金丝桃苷含量的高效液相色谱法。方法: 采用 ODS C₁₈ 色谱柱, 乙腈-水(15:85) 作流动相, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 25 °C, 检测波长 350 nm。结果: 金丝桃苷和芦丁的分离度 > 1.5; 方法学考察符合液相色谱法的要求; 所采用的山楂药材中金丝桃苷含量 > 0.17 mg·g⁻¹。结论: 该法简便、灵敏、分离度高、专属性好, 适用于山楂中金丝桃苷的含量测定。

[关键词] 山楂; 金丝桃苷; 含量测定; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0024-03

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实。山楂含有黄酮类、有机酸类、三萜酸类活性物质, 能开胃消食, 消积化滞, 活血化瘀, 收敛止痢。近年来的药理研究, 证明山楂黄酮对心血管系统等有多方面的药理作用^[1]。

金丝桃苷和芦丁是山楂黄酮的代表成分, 化学结构相近, 二者的黄酮苷元相同, 差异在金丝桃苷为半乳糖苷, 芦丁为芸香糖苷。依据文献, 不同产地的山楂中均含有金丝桃苷, 而芦丁在不同地区及不同品种的山楂中含量差异大^[2]。因此, 为客观有效地控制山楂药材及制剂的质量, 有必要建立金丝桃苷专属、准确的含量测定方法。本文通过系统方法学考察建立了金丝桃苷含量 HPLC 测定的可行性方法, 并在此基础上测定了山楂药材中金丝桃苷的含量。

1 实验材料

HPLC 色谱仪: Agilent1100 型高效液相色谱仪 (DAD 检测器)。

乙腈(色谱纯); 重蒸水(自制)。

1.3 芦丁对照品(中国药品生物制品鉴定所, 批号 0080-9705); 金丝桃苷对照品(含量 ≥98%, 安徽 DELTA 天然有机化合物信息中心)。山楂药材: 产自

山东济南与河南洛阳(栽培), 经药物室李军研究员鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实, 焦山楂为河南洛阳产山楂的炮制品。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 10 nm 孔径, 江苏汉邦生产), 流动相: 乙腈-水(15:85), 流速: 0.9 mL·min⁻¹, 检测波长: 350 nm, 温度: 25 °C, 进样量: 20 μL, 数据处理: 峰面积外标法定量。

2.2 对照品储备液的制备 精密称取芦丁对照品 10 mg 及金丝桃苷对照品 10 mg, 分别置于 100 mL 量瓶中, 用 40% 乙醇水溶液溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液备用。

2.3 供试品溶液的制备 从 1 kg 干燥的山东济南山楂粉中称取 9 份样品, 各 4 g, 以 95% 乙醇溶液为提取溶剂, 分别采取索氏提取(至回流液无色)、热回流提取 2 h 和超声提取 1 h 的 3 种方式(提取液定容至 100 mL) 制备供试品溶液^[3,4]。

从 1 kg 干燥的河南洛阳山楂和焦山楂粉中称取各 3 份样品, 每份 4 g, 以 95% 乙醇溶液为提取溶剂, 采取超声提取方式(提取液定容至 100 mL) 制备供试品溶液。

2.4 系统适用性试验 分别吸取芦丁对照品储备液(100 μg·mL⁻¹) 5 mL 和金丝桃苷对照品储备液(100 μg·mL⁻¹) 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 在选定的色谱条件下用 2 只不同 C₁₈ 柱(Licrospher ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 10 nm 孔径, 江苏汉邦

[收稿日期] 2007-06-11

[通讯作者] * 陈宝龙, Tel: (0379) 63546653; E-mail: CBL0002@126.com

生产) Kromasil ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 10 nm 孔径, 天津特纳生产)在 2 台不同型号的液相色谱仪上于不同时间测定金丝桃苷。理论塔板数按金丝桃苷峰计算不低于 3 000; 芦丁和金丝桃苷的分离度不低于 1.5, 对照品色谱图见图 1。

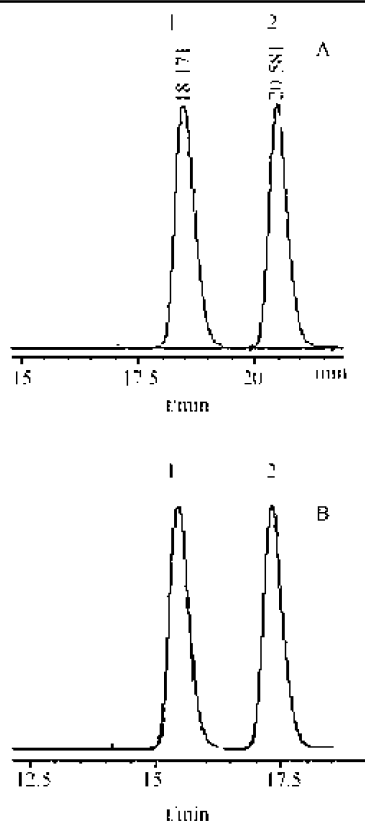


图 1 芦丁和金丝桃苷对照品在不同型号色谱柱和色谱仪上的色谱图

注: A. Agilent HPLC Microspher ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 10 nm 孔径, 江苏汉邦生产); B. Waters HPLC, Kromasil ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 10 nm 孔径, 天津特纳生产)

1. 芦丁; 2. 金丝桃苷

2.5 金丝桃苷线性关系的考察 分别吸取金丝桃苷对照品储备液(100 μg · mL⁻¹) 0.2, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL, 至于 10 mL 量瓶中, 用 40% 乙醇水溶液定容、摇匀, 作为系列对照品溶液, 在选定的色谱条件下测定金丝桃苷, 以进样量(X)和峰面积(Y)进行线性回归, 求得回归方程为 $Y = -9\,983 + 17\,229X$, $r = 0.999\,9$; 线性范围为(2~ 100) μg · mL⁻¹。

2.6 精密度试验 取线性关系考察项下的 6 μg · mL⁻¹ 对照品溶液, 照实验方法重复进样 6 次, 测定峰面积, 求得金丝桃苷的 RSD 为 0.7%。表明仪器的精密度良好, 对照品色谱图见图 2。

2.7 稳定性试验 取 2.3 项下济南山楂超声制备的供试液, 依实验方法在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定峰面积, 求得金丝桃苷 RSD 为 1.8%。表明供试液

在 10 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取 2.3 项下济南山楂超声制备的供试液 6 份, 依实验方法测定峰面积, 计算金丝桃苷的含量, 求得金丝桃苷的 RSD 为 4.4% ($n = 6$)。表明有良好的重复性。

2.9 专属性试验 利用 DAD 检测器, 对供试品溶液中的金丝桃苷吸收峰在峰起始拐点处、峰顶处及峰结束拐点处进行(190~ 800) nm 扫描, 比较 3 处的吸收图。结果显示 3 处的吸收图基本相同, 且与对照品的吸收图基本一致。峰纯度检验表明考察峰为一纯峰。提示本 HPLC 法有良好的专属性。

2.10 回收率试验 采用加样回收法, 分别精密称取已知含量样品中金丝桃苷重量 80%, 100%, 120% 的金丝桃苷对照品各 3 份, 置 100 mL 量瓶中, 加入已知含量的济南山楂超声提取制备的供试液定容。依实验方法测定峰面积, 求算金丝桃苷的含量, 计算平均回收率 98.6% (RSD= 3.8%, $n = 9$)。表明方法的准确度良好, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

样品金丝桃苷的量(mg)	加入金丝桃苷的量(mg)	测出金丝桃苷的量(mg)	回收率 (%)	\bar{x} (%)	RSD (%)
1.10	0.88	1.96	97.7		
1.10	0.88	2.00	102		
1.10	0.88	1.94	95.5		
1.10	1.10	2.2	105		
1.10	1.10	2.13	93.6	98.6	3.8
1.10	1.10	2.15	95.5		
1.10	1.30	1.42	102		
1.10	1.30	1.39	99.2		
1.10	1.30	1.36	96.9		

2.11 样品测定 取 2.3 项下制备的各供试液, 照实验方法进样, 测定峰面积, 求算金丝桃苷的含量, 结果见表 2~ 3, 样品色谱图见图 2。

表 2 山东济南山楂供试液中金丝桃苷测定结果($n = 3$)

样品	索氏提取* (mg · g ⁻¹)	热回流提取* (mg · g ⁻¹)	超声提取* (mg · g ⁻¹)
1	0.23	0.27	0.28
2	0.27	0.26	0.27
3	0.28	0.29	0.29
$\bar{x} \pm SD (\times 10^{-2})$	0.26 ± 2.4	0.27 ± 1.1	0.28 ± 0.8
RSD (%)	9.2	4.1	2.2

* 经 t 检验分析, 3 种供试液中金丝桃苷含量不具有显著性差异。($P > 0.05$)

表 3 河南洛阳山楂供试液中金丝桃苷测定结果($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)($n=3$)

样品	栽培山楂	焦山楂(炮制)
1	0.35	0.18
2	0.37	0.15
3	0.33	0.17
$\bar{x}\pm SD(\times 10^{-2})$	0.35 ± 1.6	0.17 ± 1.2
RSD(%)	4.7	7.5

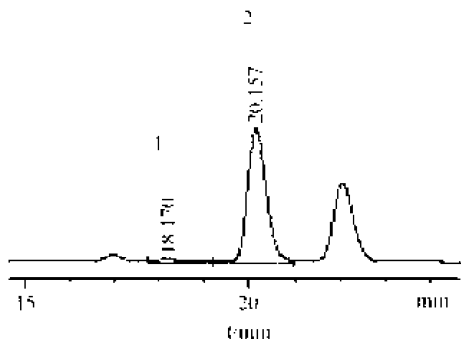


图 2 山楂提取溶液的 HPLC 图

1. 芦丁; 2. 金丝桃苷

3 讨论

山楂中黄酮醇苷类成分金丝桃苷和芦丁具有防治心血管疾病和降血脂的活性,但它们在产地不同的山楂中的含量有明显差异^[2]。加之金丝桃苷和芦丁结构相近,为考察山楂提取工艺和控制山楂及其制剂的质量有必要进行分别测定。

由于金丝桃苷和芦丁结构的相近,HPLC法对两者进行分离测定的文献报道少,不易重复^[2,5]。本研究认为两者糖基的不同及空间结构上的差别决定了其在色谱柱上保留行为存在差异,也使得采用 HPLC 法同时进行分析测定存在可行性。本研究以色谱理

论为指导,经反复试验和系统优化后确定了金丝桃苷不受芦丁干扰的 HPLC 简便分析方法。方法学研究显示所建方法符合液相色谱法的要求,具有良好的可行性和可靠性,可作为山楂测定方法。

依据金丝桃苷(190~800)nm 波长扫描图,选择特征吸收波长 350 nm 作为测定波长。

通过对乙腈-水、甲醇-水、异丙醇-水、甲醇-四氢呋喃-水及各自的磷酸-三乙胺溶液作为流动相的比较试验,本研究选用能使金丝桃苷与芦丁等干扰成分分离良好且保留时间适中,组成简单的乙腈-水为流动相。

炮制的焦山楂中金丝桃苷的含量显著低于生山楂,说明黄酮类成分在高温炮制发生了受热破坏,提示利用黄酮类活性成分时宜采用生山楂入药。

[参考文献]

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖,等.中药现代研究与应用[M].第一卷.北京:学苑出版社.1997.597.
- [2] 高光跃,冯毓秀,秦秀芹.山楂类果实的化学成分分析及质量评价[J].药学学报,1995,30(2):138.
- [3] 张研,李厚伟,张永春,等.山楂总黄酮几种提取分离方法的考察及含量测定[J].哈尔滨医科大学学报,2001,35(3):183.
- [4] 王立娟,张世润.山楂叶中黄酮类化合物及提取方法[J].中国林副特产,2000,(1):47.
- [5] 王福成,豆文太,朱文学.HPLC 测定山楂中牡荆苷、牡荆苷-2-O-鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁的含量[J].中成药,2002,24(2):122.