HPLC 法测定腺毛黑种草子中山柰酚

希尔艾力·吐尔逊[1]，帕依曼·亥米提[2*]，吐鲁洪·卡地尔[1]，库尔班尼沙·买提卡思木[1]
1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所 维吾尔药方剂学重点实验室，新疆 乌鲁木齐　830049
2. 新疆维吾尔自治区药物研究所，新疆 乌鲁木齐　830004

摘　要：目的　建立腺毛黑种草子中山柰酚的 HPLC 测定方法。**方法**　采用高效液相色谱法，色谱柱为 Symmetry RP C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，流动相为甲醇－0.4%磷酸水溶液（70∶30），体积流量 1.0 mL/min，检测波长 365 nm，进样量 10 μL。**结果**　山柰酚在 0.022 4～0.134 4 μg 呈良好的线性关系（r=0.999 9），平均回收率为 97.59%，RSD 值为 1.29%（n=9）。**结论**　该方法操作简便、准确、重复性好，可用于腺毛黑种草子中山柰酚的测定。

关键词：腺毛黑种草子；山柰酚；高效液相色谱
中图分类号：R286.02　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2013)01 - 0044 - 03
DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.012

Determination of kaempferol in seeds of *Nigella glandulifera* by HPLC

XIRALI Tursun[1], PAYIMA Hamit[2], TURGUN Kadir[1], KURBANNISA Matkasimu[1]
1. Key Laboratory of Traditional Uyghur Medicine Prescription, Institute of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Urumqi 830049, China
2. the Xinjiang Institute of Meteria Medic, Urumqi 830004, China

Abstract: **Objective**　To establish an HPLC method for determination of kaempferol in the seeds of *Nigella glandulifera*. **Methods** HPLC was carried out on Symmetry C_{18} column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with methanol-0.4% phosphoric acid (70∶30) as mobile phase. The detection wavelength was 365 nm and injection volume was10 μL at the flow rate of 1.0 mL/min. **Results**　The calibration curve was linear over the range of 0.022 4—0.134 4 μg (r=0.999 9) for kaempferol. The average recovery rate was 97.59% with RSD value at 1.29%. **Conclusion**　The established method is rapid, sensitive, and accurate, and could be used for the determination of kaempferol in the seeds of *N. glandulifera*.

Key words: seeds of *Nigella glandulifera*; kaempfeml; HPLC

腺毛黑种草子为毛茛科植物腺毛黑种草 *Nigella glandulifera* Freyn et Sint.的种子，为新疆维吾尔族习用药材，维吾尔药名为斯亚旦，秋季采收成熟果实，除泥沙及果皮，晒干，得干燥种子入药。其性味二级干热，具有行气、通经、利尿、健胃、止痛、化痰、润肤生辉、乌发的功效，用于腰背酸疼、腹痛、神经衰弱、白癜风、哮喘、关节炎、闭经、腹水、感冒及毒虫咬伤。长期使用可乌白发，另外拌醋食用可打虫，伴蜜食用可治气喘。本课题组研究发现腺毛黑种草子药材中以山柰酚为代表的黄酮类成分是一类重要成分。因此本研究建立高效液相色谱法对黑种草子中山柰酚进行测定的方法，结果证明该方法具有分离效果好、灵敏度高、测定准确等优点[1-4]。

1　仪器与材料

美国 Waters 高效液相色谱仪，包括 Waters 600 泵，2996 二极管阵列检测器，Waters 717 自动进样器（美国沃特斯公司），Empower 数据采集系统及化学工作站；SGT7200HBT 型超声清洗器（上海冠特超声仪器有限公司）；JA1203 电子分析天平（1/10 万，上海恒平科学仪器有限公司）。

山柰酚对照品（批号 100081-200406，供含量

收稿日期：2012-10-18
基金项目：新疆维吾尔自治区科技攻关和重点科技项目（200433115）
作者简介：希尔艾力·吐尔逊，男（维吾尔族），副主任药师，博士生，研究方向为维药制剂与开发。Tel: (0991) 2565663　E-mail: xirlion@sohu.com
***通信作者**　帕依曼·亥米提，女，实验师。E-mail: pahime1029@163.com

测定用）购自中国药品生物制品检定所；腺毛黑种草子购于新疆和田墨玉县，经新疆维吾尔自治区维吾尔医医院阿布都热依木副主任药师鉴定为毛茛科植物腺毛黑种草 *Nigella glandulifera* Freyn et Sint.的种子；甲醇为色谱纯（美国 Tedia 公司），水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　色谱条件与系统适用性

色谱柱为 Symmetry RP C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，流动相为甲醇－0.4%磷酸水溶液（70∶30），体积流量 1.0 mL/min，检测波长 365 nm，进样量 10 μL。在上述色谱条件下，山柰酚与样品中其他组分色谱峰可基线分离，山柰酚与相邻色谱峰的分离度大于 1.5；按山柰酚峰计算，理论塔板数为 4 000 以上，拖尾因子为 1.02。

2.2　对照品溶液的制备

精密称取山柰酚对照品 5.6 mg，置于 50 mL 量瓶内，加甲醇 40 mL 溶解并稀释至刻度，得 0.112 mg/mL 山柰酚对照品溶液，备用。

2.3　供试品溶液的制备

取腺毛黑种草子细粉约 1.0 g，置于圆底烧瓶中，加入 80%甲醇 50 mL，称定质量，回流提取 90 min，补足减失的质量，滤过，取续虑液 20 mL，精密加入 25%盐酸 7.0 mL，置于 85 ℃水浴中水解 30 min，取出，迅速冷却，转移至 50 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4　专属性试验

将山柰酚对照品溶液和腺毛黑种草子供试品溶液按照上述色谱条件分别进样，结果见图 1。供试品色谱图中，在山柰酚对照品色谱峰相应的位置上可见对应的色谱峰。

2.5　线性关系考察

分别精密量取 0.112 mg/mL 山柰酚对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 μL，上述色谱条件下进样分析，记录色谱图，测定其峰面积值，并以峰面积对进样质量进行回归，得标准曲线方程 Y＝3 682 081.6 X−31 440.2（r＝0.999 9）。结果表明山柰酚在 0.022 4～0.134 4 μg 时，峰面积值与进样质量呈良好的线性关系。

2.6　精密度试验

精密吸取 0.112 mg/mL 山柰酚对照品溶液，在上述色谱条件下，连续进样 6 次，测定山柰酚峰面积，计算得其峰面积的 RSD 值为 1.1%。

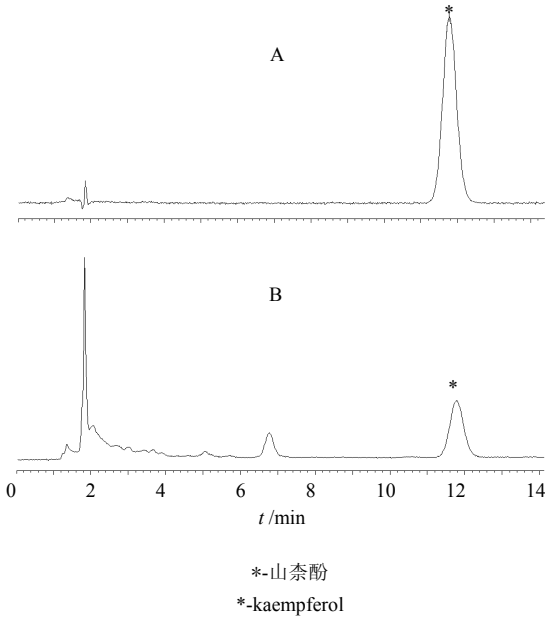

图 1　山柰酚对照品（A）和腺毛黑种草子（B）HPLC 图谱

Fig. 1　HPLC chromatograms of kaempferol reference substance (A) and seeds of *N. glandulifera* (B)

精密称取批号 050915 腺毛黑种草子 1.0 g，制备供试品溶液，重复进样 6 次，测定山柰酚峰面积，计算得山柰酚峰面积的 RSD 值为 1.5%（n=6）。

2.7　稳定性试验

取批号 050915 腺毛黑种草子 1.0 g，制备供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8 h 进样 10 μL，测定山柰酚的峰面积值，计算得其 RSD 值为 0.8%。结果表明，供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.8　重现性试验

取批号 050915 腺毛黑种草子 1.0 g，平行 6 份，分别制备供试品溶液，进样测定山柰酚的峰面积值，计算各样品中山柰酚的质量分数，结果其 RSD 值为 1.85%（n=6）。

2.9　回收率试验

称取批号 050915 腺毛黑种草子 0.5 g，共 10 份，第一份作为空白对照，其余 9 份分为 3 组，分别加入 11.2 μg/mL 山柰酚对照品溶液 1.0、2.0、3.0 mL，制备供试品溶液，进样测定，计算得山柰酚的平均回收率为 97.59%，RSD 值为 1.29%（n=9）。

2.10　样品测定

分别称取不同来源的腺毛黑种草子药材粉末约 1.0 g，制备供试品溶液，进样测定，外标法计算山柰酚的质量分数，结果见表 1。

表 1 腺毛黑种草子中山柰酚的测定结果（*n*=2）

Table 1　Determination of kaempferol in seeds of *N. glandulifera* (*n*=2)

批　号	山柰酚/(mg·g^{-1})
050812	0.332
050830	0.648
050915	0.932
060810	0.412
060901	0.659
060917	0.968

可见各批次腺毛黑种草子中山柰酚平均质量分数可达 0.66 mg/g。考虑到药材的来源、产地、加工炮制、贮藏等因素，暂定腺毛黑种草子药材中山柰酚的质量分数按山柰酚计应不低于 0.5 mg/g。

3　讨论

对山柰酚对照品溶液和腺毛黑种草子药材供试品溶液在 200～500 nm 进行紫外光谱扫描，结果在 265、365 nm 处均有最大吸收，265 nm 干扰较多。因此选择 365 nm 为检测波长。按照《中国药典》2010 年版一部“红花”[5]项下山柰酚含量测定流动相比例进行测定时，分离度不是很理想，对不同比例甲醇－0.4%磷酸水溶液组成的流动相进行考察，结果甲醇－0.4%磷酸（70∶30）分离较好、保留时间适宜。所以经过多次实验最终流动相比例确定为甲醇－0.4%磷酸（70∶30）。

本实验过程中仪器精密度良好，实验重现性好，样品在 8 h 内基本稳定。根据上述实验结果，考虑到药材的来源、产地、加工炮制、储藏等方面的因素，暂定本品含山柰酚不得少于 0.5 mg/g。

本方法操作简便、准确、灵敏度高、重复性好，可作为腺毛黑种草子中山柰酚含量测定的方法

参考文献

[1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志 [M]. 第 2 卷. 第 1 分册. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 231-232.

[2] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准 [M]. 上册. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993: 340-342.

[3] 田红林, 张砾岩, 杨　飞. 维药黑种草籽中铁、铜、锰和锌的测定 [J]. 光谱实验室, 2010, 27(6): 2524-2528.

[4] 古力伯斯坦·艾达尔, 依明江·居玛苏皮, 亚森江·阿吉. 超声辅助溶剂法提取黑种草子总皂苷含量测定及工艺研究 [J]. 中国酿造, 2009(12): 97-99.

[5] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 141-142.