HPLC法测定珍珠梅中槲皮素的含量

张乐华[1],董陆陆[1],尹春华[2],刘秉义[1],杨平传[3],董 明[3],于敬海[1*]
(1. 哈尔滨医科大学药学院,黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学附属第二医院,
黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 哈药集团技术中心,黑龙江 哈尔滨 150020)

珍珠梅 *Sorbaria sorbifolia* (L.) A. Brown又名山高粱,为蔷薇科灌木,生于村边、山谷、溪旁[1]。民间用其活血祛瘀、消肿止痛,治骨折、跌打损伤[2]。有关珍珠梅的化学成分和临床应用报道较少,现代研究报道珍珠梅中含有珍珠梅苷和黄酮类物质等[3]。黄酮类物质具有抗氧化、扩张血管、调血脂等作用,因此,开发利用珍珠梅中黄酮类物质,在临床中有广泛的应用前景。研究发现珍珠梅中的黄酮类物质具有极强的抗缺氧作用,可能成为治疗心血管疾病的良药。珍珠梅中槲皮素的含量可能影响其他黄酮的含量且具有极强的抗缺氧作用。实验中采用萃取法粗提得到珍珠梅中总黄酮,再用高效液相色谱法测定了珍珠梅中槲皮素的含量。

1 实验材料

珍珠梅于 2000年秋采集于黑龙江省帽儿山地区。L-7200高效液相色谱仪(日本日立公司)。槲皮素(中国药品生物制品检定所);甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 珍珠梅总黄酮的提取[4]: 称取干燥并切成细段的珍珠梅 500 g,用 6倍量 75%乙醇浸泡过夜,加热回流,滤过,残渣再反复提取两次,合并滤液。用醋酸乙酯萃取至无色,萃取液浓缩,得醋酸乙酯干燥提取物 20.5 g;醋酸乙酯萃取后的残液用正丁醇萃取 3次,萃取液浓缩,得正丁醇干燥提取物 8.94 g。

2.2 色谱条件: 色谱柱选用 Microsorb mv C_{18}柱(250 mm× 3.9 mm);流动相为甲醇-0.4%磷酸(1∶1);流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL;柱温 20℃。

2.3 检测波长的选择: 取槲皮素对照品适量,用流动相溶解后作紫外扫描,测得最大吸收波长为 360 nm,作为检测波长。

2.4 标准曲线制作及线性关系: 精密称取干燥至恒重的槲皮素对照品 10 mg,用甲醇定容至 100 mL容量瓶中,得到槲皮素对照品溶液。再分别准确吸取上述溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,置于 10 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,然后分别准确吸取 10 μL注入高效液相色谱仪中,记录色谱图。以峰面积值为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程为 A= 40 356 C+ 37 820, r= 0.999 1。结果表明,在 5.10~ 51.0 μg/mL线性关系良好。

2.5 精密度试验: 取 100 μg/mL的槲皮素对照品溶液重复进样 5次,测得测量值的 RSD为 0.43% (n= 5)。

2.6 稳定性试验: 在相同色谱条件下,样品液每隔 30 min测定一次含量,结果 2.5 h的相对含量为 99.08%, RSD= 0.406%。

2.7 重现性试验: 取同一样品 5份,制备样品液,取样品液 10 μL,在相同色谱条件下,测定其含量,结果重现性良好, RSD为 0.412% (n= 5)。

2.8 回收率试验: 精密量取已知含量的醋酸乙酯干燥提取物及正丁醇干燥提取物,加入一定量的槲皮素对照品,甲醇定容,按样品测定方法进行测定,平均回收率为 97.36%, RSD= 1.03% (n= 5)。

2.9 珍珠梅中槲皮素含量测定: 称取醋酸乙酯干燥提取物 0.22 g及正丁醇干燥提取物 0.36 g,各加入 20 mL 25%盐酸,水浴回流酸解 60 min,冷却后滤过,滤液用甲醇溶解并定容至 50 mL量瓶中,摇匀后用 0.45 nm微孔滤膜滤过,分别吸取以上两种溶液及对照品各 10 μL进样,测定,结果醋酸乙酯干燥提取物槲皮素含量为 1.52%;正丁醇干燥提取物槲皮含量为 3.67%;珍珠梅中槲皮素总含量为 0.62%。高效液相色谱图见图 1。

3 讨论

珍珠梅的化学成分比较复杂,直接测定某种物质的含量时,都会受到其他成分的干扰,测定结果

* 收稿日期: 2003-07-21
基金项目: 黑龙江省科技攻关项目的一部分(GB01C0703)
作者简介: 张乐华(1964-),女,哈尔滨医科大学药学院副教授,硕士研究生,研究方向为中草药药用有效成分的研究。
Tel (0451) 86674718
* 通讯作者 Tel (0451) 86655935

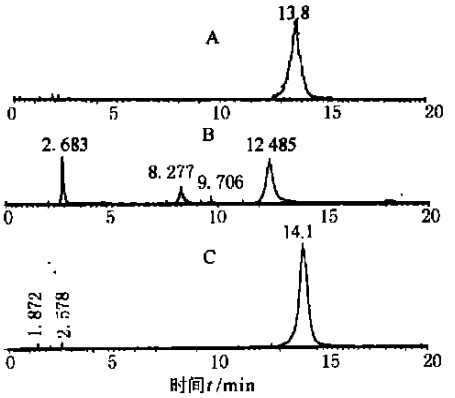

图 1 槲皮素对照品(A)、醋酸乙酯提取物(B)和正丁醇提取物(C)的 HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of quercetin reference substances (A), ethyl acetate extract (B), and n-butanol extract (C)

也不准确。我们在研究中发现,珍珠梅中的黄酮类物质有极强的抗氧化作用,槲皮素是黄酮类物质的一种,它的含量多少影响着其他黄酮类物质的含量和其抗缺氧作用。我们把萃取和 HPLC法联合起来测定珍珠梅中槲皮素的含量,得到了较好的结果,珍珠梅中槲皮素的含量为 0.627%。本实验采用萃取法得到了总黄酮粗品,然后用高效液相色谱法测定总黄酮粗品中的槲皮素含量,该方法干扰较少,操作简便、易行,重现性和线性关系良好,回收率较高,是测定黄酮类物质槲皮素的比较好的方法。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.

[2] Wu Y M. *Normal Chinese Herbal Medicine of Northeast in China* (东北常用中草药) [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Publishing House, 1984.

[3] Zaitsev V C, Makarova G V, Komissarenko N F. A new flavone glycoside from *Sorbifolia* [J]. *Khinm Prir Soedin*, 1969, 5(6): 504-507.

[4] Zhang L H. Influence of solvent concentration to extracting total flavonoids in *Sorbaria* [J]. *J Harbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 2000, 35(5): 387.

HPLC法测定当归中阿魏酸的含量

闵凡新[1],李文玉[2],王彦为[1],胡彦武[1],董艳辉[1],吴 [1]

(1. 通化师范学院,吉林 通化 134002; 2. 通化市药品检验所,吉林 通化 134001)

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels是伞形科当归属一种多年生草本植物。干燥的贮藏根入药,是一种常用中药材,有"十方九归"之称。有补血、和血、调经止血、润肠通便之功效。当归的乙醇提取物中分离出 6种化合物,阿魏酸是其中之一。当归的抑制血小板聚集作用与阿魏酸有关。本实验以阿魏酸为测定指标,采用 HPLC法对当归中阿魏酸的提取方法进行优选,并测定其含量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100高效液相色谱仪。甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,冰醋酸为分析纯。阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 0773-9607)。当归购于通化市药材供应站。

2 实验方法

2.1 色谱条件:色谱柱用十八烷基键合硅胶为填充剂。甲醇-2% 冰醋酸溶液(20∶80)为流动相,检测波长 320 nm,理论塔板数按阿魏酸峰计算应不低于 5 000。柱温 25 ℃。HPLC色谱见图 1。

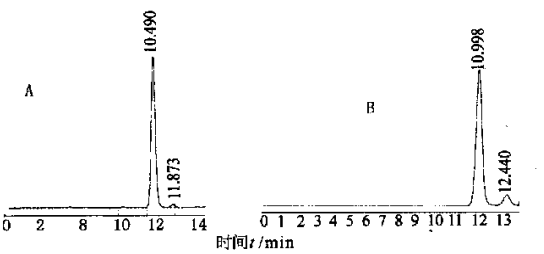

图 1 当归(A)和阿魏酸对照品(B) HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *A. simensis* (A) and ferulic acid (B)

2.2 对照品溶液的制备:精密称取阿魏酸对照品 5.29 mg,置于 25 mL量瓶中,加甲醇-2% 冰醋酸溶液(20∶80)溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(含阿魏酸 0.211 8 mg/mL)。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取当归细粉 2.0 g,置于索氏提取器中,加入 100 mL乙醚-甲醇溶液(20∶1)连续回流提取 4 h,回收提取液至干。残渣加适量甲醇-2% 冰醋酸溶液(20∶80)温热使溶解,

* 收稿日期: 2003-07-18