

HPLC法测定藤梨根中异秦皮苷的含量

马秉智*,周宇,赫军,赵铁,李淑芳[#](中日友好医院药学部,北京 100029)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2150-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.49

摘要 目的:建立测定藤梨根中异秦皮苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为乙腈-1%乙酸溶液(8:92, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为350 nm,柱温为25 ℃。结果:异秦皮苷质量浓度在9.9~156.4 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<1.6%;平均回收率为97.60%,RSD为0.61%($n=6$)。结论:该方法简单、准确、专属性强,可作为藤梨根药材的质量控制方法。

关键词 藤梨根;异秦皮苷;高效液相色谱法

Content Determination of the Isofraxoside in Actinidia Arguta by HPLC

MA Bing-zhi, ZHOU Yu, HE Jun, ZHAO Tie, LI Shu-fang (Dept. of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of isofraxoside in *A. arguta*. METHODS: HPLC was conducted on Kromasil C₁₈ with the mobile phase of acetonitrile-1% acetic acid (8:92, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 350 nm and the temperature was 25 ℃. RESULTS: Isofraxoside had a good linear relationship in the range of 9.9-156.4 μg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.6%. The average recovery was 97.60% (RSD=0.61%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific, and can be used for the quality control of *A. arguta*.

KEYWORDS Actinidia arguta; Isofraxoside; HPLC

藤梨根为猕猴桃科植物中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch. 的干燥根,具有清热解毒、活血散结、祛风利湿之功效,可用于治疗风湿性关节炎、淋巴结结核、跌打损伤、痈疖等^[1]。现代研究表明,其对胃癌、食管癌、肺癌、肝癌、大肠癌均有作用^[2]。郭洁等^[3]报道藤梨根提取物对人胃癌 BGC-823 细胞的增殖具有明显抑制作用,在试验浓度范围内呈浓度依赖性,可促进细胞凋亡。孙春霞等^[4]报道含有藤梨根的“化浊解毒方”可降低模型裸鼠血管内皮生长因子(VEGF)、环氧合酶-2(COX-2)的表达,联合用药疗效更佳。关于藤梨根的质量标准研究,邸学等^[5]对藤梨根药材进行了高效液相色谱(HPLC)指纹图谱及质量研究,并测定了其中熊果酸、齐墩果酸的含量^[6],但是它们的含量均不超过0.1%。还有滕坤等^[7]测定了藤梨根中大黄素的含量,但其含量仅为6.30 μg/g。为此,笔者通过研究藤梨根的化学成分^[8],发现了其中一个含量较大的成分——异秦皮苷,而且是从猕猴桃科中首次分离得到。本研究将其作为质控指标,并采用HPLC法对藤梨根药材进行含量测定,为藤梨根的质量控制提供科学依据。

1 材料

LC-10A型HPLC仪(日本岛津公司);BSA4235-CW电子天平(德国赛多利斯仪器系统有限公司);KQ5200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

异秦皮苷对照品(中日友好医院自制,纯度>98%);乙腈

* 主管药师,硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及质量标准。电话:010-84205688。E-mail:mbz20052002@aliyun.com

[#] 通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:010-84205330。E-mail:763674274@qq.com

为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

藤梨根分别购自北京华邈中药工程技术开发中心,产地:四川,产品批号:209061,生产日期:2012年9月6日;北京卫仁中药饮片厂,产地:浙江,产品批号:113612101,生产日期:2012年6月4日;北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,产地:河北,生产批号:001003287,生产日期:2010年9月6日。经中日友好医院中药库唐永和药师鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物软枣猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch. 的根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), C₁₈ 预柱(4.0 mm×3.0 mm);流动相:乙腈-1%乙酸溶液(8:92, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:350 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。色谱见图1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取异秦皮苷对照品9.90 mg,置于50 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取样品粉末1.0 g,精密称定,置于100 ml圆底烧瓶中,加入甲醇25 ml,称定质量,回流提取30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 空白对照溶液的制备

精密移取甲醇25 ml,置于100 ml圆底烧瓶中,按供试品溶液的制备方法制成空白对照溶液。

2.5 线性关系考察

分别精密移取对照品溶液0.5、1、2、4、8 ml至10 ml量瓶

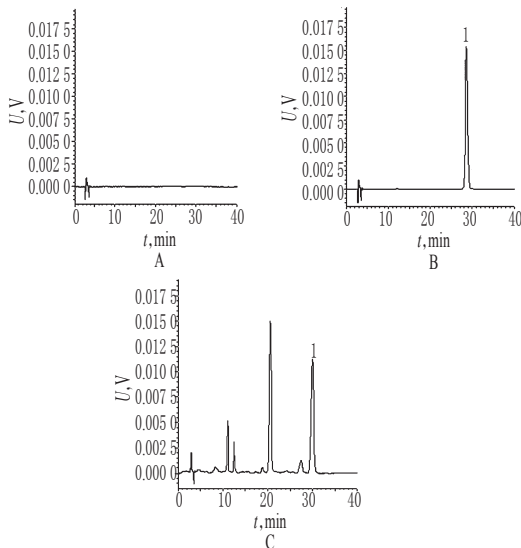


图1 高效液相色谱图

A.空白对照;B.对照品;C.供试品;1. 异秦皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.negative control; B.control; C. test sample; 1. isofraxoside

中,加甲醇定容。按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,得到异秦皮苷的回归方程为 $y=14\ 893x+1\ 289.5$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,异秦皮苷质量浓度在 $9.9\sim 156.4\ \mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

分别精密吸取同一异秦皮苷对照品溶液 $10\ \mu\text{l}$,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果,异秦皮苷峰面积的RSD为1.5%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

分别精密吸取同一供试品溶液 $10\ \mu\text{l}$,分别于放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,异秦皮苷峰面积的RSD为1.3%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

分别取同一样品(批号:001003287)适量,共6份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,异秦皮苷含量的RSD为1.0%,表明本方法重复性较好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的河北产藤梨根样品(批号:001003287)约 $0.50\ \text{g}$,共6份,分别加入一定量的异秦皮苷对照品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

| 样品含量,mg | 加入量,mg | 测得量,mg | 加样回收率,% | 平均加样回收率,% | RSD,% |
|----------|---------|---------|---------|-----------|-------|
| 0.372 22 | 0.368 3 | 0.733 9 | 98.20 | | |
| 0.371 48 | 0.368 3 | 0.729 8 | 97.29 | | |
| 0.370 74 | 0.368 3 | 0.733 1 | 98.39 | | |
| 0.371 63 | 0.368 3 | 0.730 7 | 97.49 | 97.60 | 0.61 |
| 0.371 11 | 0.368 3 | 0.727 6 | 96.79 | | |
| 0.371 85 | 0.368 3 | 0.730 6 | 97.41 | | |

2.10 样品含量测定

分别取不同产地的3批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,以外标法计算样品中异秦皮苷的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination($n=3$)

| 样品产地 | 批号 | 异秦皮苷含量,mg/g |
|------|-----------|-------------|
| 四川 | 209061 | 0.95 |
| 浙江 | 113612101 | 0.53 |
| 河北 | 001003287 | 0.74 |

3 讨论

3.1 提取方法的选择

笔者考察了甲醇超声提取10、20、30 min和甲醇回流提取30、60 min 5种提取方法。结果发现,甲醇回流提取30 min,测得的异秦皮苷的含量最高,故最终确定甲醇回流提取30 min作为本研究的提取方法。

3.2 检测波长的选择

分别将异秦皮苷对照品溶液在 $200\sim 800\ \text{nm}$ 波长范围内作全波长扫描,发现其在 $350\ \text{nm}$ 波长下有最大吸收,因此选择 $350\ \text{nm}$ 作为本研究的检测波长。

3.3 流动相的选择

分别将甲醇-1%醋酸、甲醇-1%甲酸、乙腈-1%醋酸作为流动相,按不同比例进行研究。最终发现,采用乙腈-1%醋酸(8:92, V/V)为流动相时,基线平稳,峰形、分离度效果较佳。

3.4 关于异秦皮苷的研究

笔者查阅近年来国内外文献发现,有关异秦皮苷的报道^[9]很少,且主要是化学成分方面的研究。但是,它是否具有药理活性、是否是藤梨根的活性成分,尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 北京市药品监督管理局.北京市中药饮片炮制规范:2008年版[S].北京:化学工业出版社,2008:107.
- [2] 龙凯花,王小平,白吉庆,等.中药藤梨根抗肿瘤研究[J].中国现代中药,2013,15(10):846.
- [3] 郭洁,王小平,白吉庆.藤梨根提取物对人胃癌BGC细胞凋亡及Bax蛋白表达的影响[J].亚太传统医药,2014,10(13):12.
- [4] 孙春霞,李佃贵,闫翠环,等.化浊解毒方对裸鼠人胃癌原位移植瘤VEGF与COX-2的影响[J].中国药房,2012,23(19):1 735.
- [5] 邸学,王海波,杨欣欣,等.藤梨根药材HPLC指纹图谱及质量研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):135.
- [6] 邸学,王海波,翟延君,等.HPLC测定藤梨根中熊果酸、齐墩果酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):66.
- [7] 滕坤,于思文.高效液相色谱法测定藤梨根中大黄素的含量[J].通化师范学院学报:自然科学版,2014,35(3):42.
- [8] 赫军,马秉智,赵铁,等.藤梨根的化学成分研究[J].中国药理学杂志,2014,49(3):184.
- [9] 刘宏伟,姚新生,王乃利,等.长柄七叶树的化学成分[J].中国天然药物,2005,3(6):350.

(收稿日期:2014-10-31 修回日期:2014-12-22)

(编辑:余庆华)