

HPCE法测定水曲柳叶中荷包花苷A的含量^Δ

陈玉娟*, 王 巍, 李成玉, 张佳佳, 杨 业, 李步步(长春理工大学生命科学技术学院, 长春 130022)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4709-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.35

摘要 目的:建立测定水曲柳叶中荷包花苷A含量的方法。方法:采用高效毛细管电泳法。毛细管为未涂层熔融石英毛细管,缓冲液为硼酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 9.3),分离电压为20 KV,采用压力进样(进样压力为50 bar,进样时间为3 s),检测波长为350 nm,柱温为30 ℃。结果:荷包花苷A检测质量浓度线性范围为50~250 μg/ml($r=0.9997$);精密性、稳定性、重复性的RSD<3%,加样回收率为97.48%~102.08%,RSD为1.12%($n=6$)。结论:该方法操作简便、重复性好,可用于测定水曲柳叶中荷包花苷A的含量。

关键词 水曲柳;叶;荷包花苷A;高效毛细管电泳法

Content Determination of Calceolarioside A in the Leaves of *Fraxinus mandschurica* by HPCE

CHEN Yu-juan, WANG Wei, LI Cheng-yu, ZHANG Jia-jia, YANG Ye, LI Bu-bu (School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of calceolarioside A in the Leaves of *Fraxinus mandschurica*. METHODS: HPCE was performed on the capillary of uncoated fused silica capillary, buffer solution of borate buffered saline (20 mmol/L, pH 9.3), separation voltage of 20 KV by pressure injection (injection pressure was 50 bar with 3 s), detection wavelength was 350 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of calceolarioside A was 50-250 μg/ml($r=0.9997$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were less than 3%, recovery was 97.48%-102.08% (RSD=1.12, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, good reproducibility, and can be used for the content determination of calceolarioside A in the Leaves of *F. mandschurica*.

KEYWORDS *Fraxinus mandschurica*; Leaf; Calceolarioside A; HPCE

水曲柳(*Fraxinus mandschurica* Rupr.)属木犀科梣属植物,其树皮具有抗炎镇痛之功效^[1]。近年来由于大量的砍伐,水曲柳资源日渐减少^[2],水曲柳皮也不易获得。经研究发现,其树叶中主要成分除了香豆素类,还含有苯乙醇苷类等成分^[3-4]。目前未见有关水曲柳叶中苯乙醇苷类成分(如荷包花苷A)含量测定的报道。为此,笔者建立了水曲柳叶中荷包花苷A的高效毛细管电泳(HPCE)含量测定方法,以为该药材的新选择及质量标准的制定提供一定的参考依据。

1 材料

1.1 仪器

G1600A型毛细管电泳仪,包括二极管阵列检测器、1200色谱工作站(美国Agilent公司);JA12002型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);LE104E型电子天平(美国Mettler-Toledo公司);KQ-400KDE型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

荷包花苷A对照品由本课题组从水曲柳皮中分离纯化,经核磁共振氢谱(¹H-NMR)和核磁共振碳谱(¹³C-NMR)鉴定结构^[5],经高效液相色谱(HPLC)峰面积归一化法测定纯度>99%;硼酸盐缓冲液(美国Agilent公司, pH 9.3);试验所用试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 药材

^Δ基金项目:吉林省科技重点科技攻关项目(No.20140204052YY)

*讲师,硕士生导师,博士。研究方向:中药新药研发。E-mail: jychenzxcv@163.com

水曲柳叶(共3批, No1、No2、No3)采自长白山,经吉林大学张静敏教授鉴定为真品,标本存放于长春理工大学生命科学技术学院。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6]与系统适用性试验^[7]

毛细管:未涂层熔融石英毛细管(50 cm×75 μm);缓冲液:硼酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 9.3);分离电压:20 KV;压力进样(进样压力为50 bar,进样时间为3 s);检测波长:350 nm;柱温:30 ℃。开机后依次用1 mol/L NaOH冲洗5 min,水冲洗3 min,硼酸盐缓冲液冲洗5 min,然后进样;每次进样之间用1 mol/L NaOH冲洗1 min,水冲洗1 min,硼酸盐缓冲液冲洗2 min。在上述色谱条件下进样测定,理论板数以荷包花苷A峰计不低于3 000,各成分基线分离良好,详见图1。

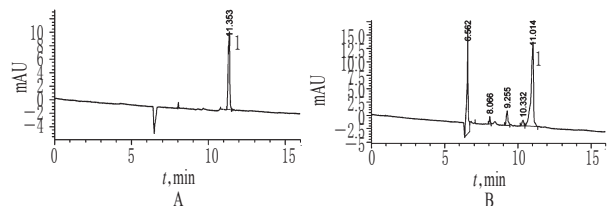


图1 高效毛细管电泳图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 荷包花苷A

Fig 1 HPCE chromatograms

A. reference substance; B. test sample; 1. calceolarioside A

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取荷包花苷A对照品5 mg,置于

50 ml量瓶中,用硼酸盐缓冲液溶解并定容,得每1 ml含荷包花苷A 0.1 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取干燥的水曲柳叶5 g,加50 ml 80%乙醇浸泡30 min,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)提取3次,每次10 min,滤过,滤液备用;残渣重复提取1次,合并2次滤液,减压浓缩得稠膏。稠膏加水100 ml分散,再用100 ml乙酸乙酯分3次萃取;萃取完的水液用水饱和正丁醇100 ml分3次萃取,合并正丁醇层,减压回收正丁醇;剩余物用乙醇10 ml溶解,取300 μ l乙醇溶液并加硼酸盐缓冲液稀释至1 ml,滤过,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察

取对照品适量,加硼酸盐缓冲液稀释成质量浓度为50、100、150、200、250 μ g/ml的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以荷包花苷A质量浓度(x , μ g/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=64.024x-144.58$ ($r=0.9997, n=6$)。结果表明,荷包花苷A检测质量浓度线性范围为50~250 μ g/ml。

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,荷包花苷A峰面积的RSD为0.29% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一供试品(No.1)溶液适量,分别于放置0、2、4、6、8 h时进样测定,记录峰面积。结果,荷包花苷A峰面积的RSD为2.3% ($n=5$),表明供试品溶液在8 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(No.1)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,荷包花苷A峰面积的RSD为2.4% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的样品(No.1)适量,共6份,分别加入一定质量对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

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

取样量, g	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, %
5.32	7.283 1	1.000 0	8.257 9	97.48	98.78	1.12
5.09	6.968 2	1.000 0	7.949 2	98.10		
5.13	7.023 0	1.000 0	8.002 3	97.93		
5.44	7.447 4	1.000 0	8.431 2	98.38		
4.93	6.749 2	1.000 0	7.735 9	98.67		
5.02	6.872 4	1.000 0	7.893 2	102.08		

2.8 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表2。

3 讨论

预试验中制备供试品时,与传统的加热回流和冷浸法比较,超声提取法效果好、用时短;采用乙酸乙酯进行萃取,除去了极性较低成分的干扰。对水曲柳叶中荷包花苷A测定干扰最大的是香豆素类成分,本试验通过以下两个方面减少相关

表2 样品含量测定结果($n=3$)

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

No	荷包花苷A, %
1	0.1383
2	0.1435
3	0.1418

成分干扰:(1)选用350 nm的检查波长,在此波长下,荷包花苷A有最大吸收,而香豆素类成分吸收相对较弱;(2)在pH 9.3硼酸盐缓冲液中,含量最多的白蜡树精苷呈中性,与溶剂峰的保留时间一致,在6.6 min左右出峰;荷包花苷A可在此缓冲盐溶液中电离成负离子,在11 min左右出峰,所以避免了白蜡树精苷的干扰。

文献中测定苯乙醇苷含量多采用HPLC法^[8-10],与HPLC法比较,HPCE法不仅同样具有快速分析的特点,并且操作更简单,而且所用缓冲液便宜易得、无毒、用量少。

综上所述,该法操作简便、重复性好,可用于测定水曲柳叶中荷包花苷A的含量。

参考文献

- [1] 严仲铠,李万林.中国长白山药用植物彩色图谱[M].北京:人民卫生出版社,1997:339.
- [2] 贾淑霞,赵妍丽,丁国泉,等.落叶松和水曲柳不同根序细根形态结构,组织氮浓度与根呼吸的关系[J].植物学报,2010(2):174.
- [3] Chen YJ, Zhang HG, Li X. Phenylethanoid glycosides from the bark of *Fraxinus mandshurica*[J]. *Chem Nat Compd*,2009,45(3):330.
- [4] Drenkhan R, Sander H, Hanso M. Introduction of *Mandshurian ash* (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) to Estonia: is it related to the current epidemic on European ash (*F. excelsior* L.)[J]. *Eur J Forest Res*,2014,133(5):769.
- [5] 陈玉娟,王会堂,张宏桂,等.水曲柳皮中化学成分的研究[J].中国药学杂志,2009,44(15):1133.
- [6] Karaźniewicz-Łada M, Danielak D, Głowska F. HPCE and HPLC methods for determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in biological samples: a comparative analysis[J]. *J Liq Chromatogr RT*,2014,37(5):620.
- [7] 彭明丽,赵冠人,温筱煦.HPLC法同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量[J].中国药房,2015,26(6):837.
- [8] 李茂星,尉丽力,陶锐,等. RP-HPLC法同时测定4种唇形科植物中3种苯乙醇苷的含量[J].中国药房,2014,25(11):1027.
- [9] 黄永林,刘金磊,陈月圆,等.红背山麻杆叶的化学成分研究(II):黄酮和苯乙醇苷类化合物[J].广西植物,2014,34(2):143.
- [10] 曲正义,金银萍,孙成贺,等. RP-HPLC同时测定向日葵列当中苯乙醇苷类化合物 *Crenatoside* 和类叶升麻苷[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):87.

(收稿日期:2014-11-25 修回日期:2015-06-25)

(编辑:张静)