

梨树叶中有效成分熊果苷的确证及 HPLC 检测

赵洁¹, 何强², 姚秉华¹, 孔祥虹² (1.西安理工大学理学院, 西安 710054; 2.陕西出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 西安 710068)

摘要: 目的 确证梨树叶中含有熊果苷, 并建立高效液相色谱法测定梨树叶中熊果苷的含量。方法 将充分粉碎的梨树叶样品用甲醇提取, 蒸去甲醇后用 ENVITM-18 固相萃取柱净化, 采用在线获取的紫外光谱及扫描质谱对熊果苷进行确证。高效液相色谱分析时用 Inertsil ODS-3 色谱柱分离, 甲醇-水(1:9)洗脱, 282 nm 检测。结果 梨树叶样品中目标物的紫外吸收光谱及子离子扫描质谱图与熊果苷标准品相同。高效液相色谱法定量分析时线性关系良好, 熊果苷的回收率>93%, RSD<2.1%。结论 梨树叶中含有熊果苷有效成分, 高效液相色谱法检测梨树叶中熊果苷的含量简便、快速、准确。

关键词: 梨树叶; 熊果苷; 高效液相色谱; 含量; 确证

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)12-1129-04

Qualitative Confirmation of Active Ingredient of Arbutin in Pear Leaves and Quantitative Determination by HPLC

ZHAO Jie¹, HE Qiang², YAO Binghua¹, KONG Xianghong² (1.College of Science, Xi'an University of Technology, Xi'an 710054, China; 2.Inspection and Quarantine Technology Centre, Shaanxi Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To confirm arbutin as an ingredient in pear leaves, and develop a method for the determination of arbutin content in pear leaves by HPLC. **METHODS** The full powdered pear leaves were extracted with methanol, then cleanup was performed on ENVITM-18 SPE columns after methanol boiled off. Qualitative confirmation using the UV spectrum and mass spectra was acquired on-line. HPLC was performed on Inertsil ODS-3 column with DAD detection wavelength of 282 nm using methanol-water(1:9) as mobile phase. **RESULTS** The UV spectrum and mass spectra of the target chromatographic peak were the same as arbutin standard. The HPLC method showed good linear relationship, the recoveries of arbutin were all more than 93% and RSD was less than 2.1%. **CONCLUSION** Arbutin is an active ingredient in pear leaves, and HPLC as the content analysis method is simple, rapid and accurate.

KEY WORDS: pear leaves; arbutin; HPLC; content; confirmation

梨树叶是蔷薇科梨属植物梨树(*Pyrus sorotina*)的干燥叶, 具有清热解毒的作用, 民间用于治疗蛇咬伤、尿道炎、膀胱炎、尿道结石以及气管炎引起的咳、喘等, 但对其有效成分及药效机理尚未见有系统的研究报道, 随着梨树种植面积的规模化扩大, 梨树叶作为水果梨生产中的副产物, 获取十分容易, 对其进行开发利用具有积极的社会和经济意义。熊果苷(arbutin)是一种具有抗炎、抑菌、镇咳、祛痰、平喘作用的物质^[1-2], 并具有天然美白活性^[3], 在临床应用广泛, 熊果苷可能是梨树叶中的有效成分之一^[4], 但未见有梨树叶中熊果苷确证及含量检测的文献报道。本研究利用紫外吸收光谱和扫描质谱确证了梨树叶含有熊果苷, 明确了熊果苷是梨树叶中的主要药效成分之一。目前植物中熊果苷的含量检测方法主要有薄

层色谱法^[5-6]、液相色谱法^[7-10]、毛细管电泳法^[11]、液相色谱-质谱法^[12-13]等, 本研究通过对梨树叶样品前处理方法及分析方法的考察, 确定了一种不同于文献报道方法的 HPLC 测定熊果苷含量的方法, 该含量测定方法准确、简便、稳定, 对仪器设备要求低, 便于推广应用。

1 仪器和试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱系统: 配四元泵、DAD 检测器、自动进样器及色谱数据处理工作站(美国 Agilent 公司); AcquityTM 超高效液相色谱仪: 配 Quattro Premier XE 串联质谱仪、电喷雾电离(ESI)接口(美国 Waters 公司); HS 501 型振荡器(德国 IKA 公司); LABOROTA 4001 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); 甲醇(色谱级, 美国 TEDIA 公司); 二氯甲烷(分析纯, 天津市科密欧化学试剂

基金项目: 陕西省农业攻关项目(2010k01-19-4); 西安理工大学科研项目(108-210927)

作者简介: 赵洁, 女, 讲师 Tel: (029)82066360 E-mail: zhaojie_1999@xaut.edu.cn

有限公司); 水为超纯水(18.2 MΩ, PURELAB PULS 超纯水器制备); ENVITM-18 固相萃取柱(3 mL, Supelco 公司); 熊果苷标准物质购自 Sigma 公司。梨树叶样品采自陕西大荔县梨树园, 经西安交通大学药教研室鉴定为蔷薇科梨属东方梨树的叶。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

将梨树叶样品在 60 °C 烘箱中烘干 3 h, 充分粉碎, 称取 0.10 g(精确至 0.1 mg)样品, 加入 10 mL 甲醇, 振荡提取 10 min, 4 500 r·min⁻¹ 离心 3 min, 上清液过滤, 残渣再用 5 mL 甲醇提取 2 次, 每次振荡 5 min, 合并甲醇提取液于浓缩瓶中, 于 40 °C 减压蒸发至干, 加入 10 mL 水溶解残渣。ENVITM-18 固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、5 mL 水活化, 将残渣水溶液上样净化, 并用 5 mL 水洗浓缩瓶, 洗涤液并入上样液中, 然后用 5 mL 10% 的甲醇淋洗固相萃取柱, 收集所有上样流出液及淋洗液, 用水定容至 25 mL, 混匀, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 供质谱确证及 HPLC 检测。

2.2 质谱确证条件

采用超高效液相色谱-串联质谱提供的在线离子扫描质谱进行确证, 检测方式为子离子扫描, 碰撞能量 10 eV; 母离子为 m/z 271.2; 子离子扫描范围为 m/z 80~280; 扫描时间 0.4 s; 扫描间隔 0.1 s, 其他超高效液相色谱及质谱条件参数参考文献[13]。

2.3 HPLC 测定条件

色谱柱: Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(1:9); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 色谱柱温度: 35 °C; 检测器: 二极管阵列检测器(DAD); 检测波长: 282 nm; 进样量: 10 μL。应用上述色谱条件, 标准溶液(20.0 μg·mL⁻¹)及梨树叶样品溶液的 HPLC 色谱图见图 1。

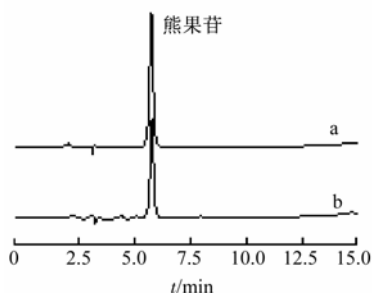


图 1 熊果苷标准品溶液(a)及梨树叶样品(b)的 HPLC 色谱图
Fig 1 HPLC chromatogram of arbutin standard(a) and pear leaves(b)

2.4 HPLC 测定的线性关系、检出限

配制浓度为 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 μg·mL⁻¹ 的熊果苷系列标准溶液, 按“2.3”项下的色谱条件进样测定, 并以标准品浓度(X , μg·mL⁻¹)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标作图, 同时用最小二乘法进行线性回归, 回归方程为 $Y=0.211X+0.011(r=1.000)$, 在 2.0~100.0 μg·mL⁻¹ 内, 熊果苷标准品浓度与峰面积值有良好的线性关系。

以信噪比为 3($S/N=3$)计算, 熊果苷最低检出浓度为 1.0 μg·mL⁻¹, 按“2.1”项下样品处理方法, 梨树叶中熊果苷的最低检出限为 0.25 g·kg⁻¹。

2.5 仪器精密度及重复性实验

取熊果苷标准溶液按“2.3”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 熊果苷色谱峰面积的 RSD 为 0.64%, 仪器精密度良好。

称取同一梨树叶样品, 平行称取 5 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件检测熊果苷含量, 测得含量分别为 3.50, 3.45, 3.42, 3.48, 3.39 g·kg⁻¹, RSD 为 1.3%, 重复性良好。

2.6 加样回收率实验

向已知含量为 3.45 g·kg⁻¹ 的梨树叶样品中添加熊果苷标准品, 添加水平为 0.25, 0.50, 1.00 mg, 每个水平 3 个平行样, 回收率为 93%~102%, RSD<2.1%, 加样回收率精密度良好。结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果($n=3$)

Tab 1 The result of recoveries test($n=3$)

加入量/mg	样品含有量/mg	测定量/mg	回收率/%	RSD/%
0.25	0.349 1	0.585 9	94.7	2.1
	0.365 4	0.603 6	95.3	
	0.348 1	0.594 3	98.5	
0.50	0.352 9	0.836 8	96.8	1.9
	0.369 8	0.854 4	96.9	
	0.366 4	0.834 7	93.7	
1.00	0.353 3	1.351 7	99.8	1.3
	0.364 0	1.376 8	101.3	
	0.351 9	1.338 2	98.6	

2.7 样品含量测定

精密称取 0.10 g(精确至 0.1 mg)梨树叶样品, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件检测熊果苷含量, 共测试梨树叶样品 3 批, 每批平行测定 3 次, 样品中熊果苷平均含量分别为 2.75, 3.45, 5.60 g·kg⁻¹, 相对标准偏差(RSD)均<1.6%。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备条件的考察

主要考察了提取及净化方法。由于熊果苷的极性大,易溶于水和甲醇,文献报道的植物中熊果苷的提取方法多采用不同比例的甲醇(或乙醇)溶液回流提取^[6-8,11-12],操作较复杂,本研究考察了水和甲醇振荡提取,用水提取 3 次,梨树叶中熊果苷的加样回收率不到 10%,而且提取液黏度大,难以过滤,过固相萃取柱时容易堵塞,可能是由于梨树叶中大量水溶性黏液质及植物蛋白被提出;将梨树叶样品先用 1 mL 水润湿 30 min,再用甲醇提取,则熊果苷的加样回收率仅能达到 50%左右,而直接用甲醇提取,则熊果苷的加样回收率能够达到 90%以上,说明提取液中水的含量对梨树叶中熊果苷的提取有显著影响,而且用甲醇提取可以有效避免梨树叶中黏液质及植物蛋白等物质的提出,所以选择甲醇进行样品提取。提取液蒸干后呈深绿色,需要进一步净化除杂,而文献方法一般未净化或采用液液萃取净化,本研究考察了利用固相萃取及液液萃取去除杂质的效果,采用固相萃取法(见“2.1”项下方法)及二氯甲烷液液萃取法(10 mL、10 mL 萃取 2 次,弃去二氯甲烷层)均可有效去除绿色杂质,净化后的溶液呈无色透明,回收率均能达到 95%以上,鉴于固相萃取法操作简便、使用有机溶剂少、杂质去除更彻底,选择固相萃取法进行净化。

该样品前处理方法与已有的文献方法相比较,采用甲醇直接振荡提取,简化了操作,而且采用 C₁₈ 固相萃取柱进行样品净化,净化效果良好,减少了检测干扰,提高了检测的准确性和稳定性。

3.2 梨树叶中熊果苷的确证

鉴于高效液相色谱检测时对目标峰的确证存在不足,实验中利用 DAD 检测器提供的紫外吸收光谱图和超高效液相串联质谱法对梨树叶中的目标峰进行了确证。梨树叶中目标峰的紫外吸收光谱图与熊果苷标准品一致,见图 2。超高效液相-串联质谱确证时,在确定熊果苷的母离子(m/z 271.2)之后,采用子离子扫描模式对熊果苷标准溶液及梨树叶样品溶液进行检测,标准溶液(10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及样品溶液的质谱图见图 3,样品溶液中目标峰质谱图与标准品一致,实验中结合熊果苷的化学结构式,对熊果苷的质谱裂解途径分析见

图 4, m/z 271, 161, 113, 108, 101 等离子碎片与图 3 质谱图中基本一致。综合色谱保留时间、紫外光谱图、扫描质谱图、质谱裂解碎片分析等信息,可确证梨树叶中的目标物质为熊果苷。

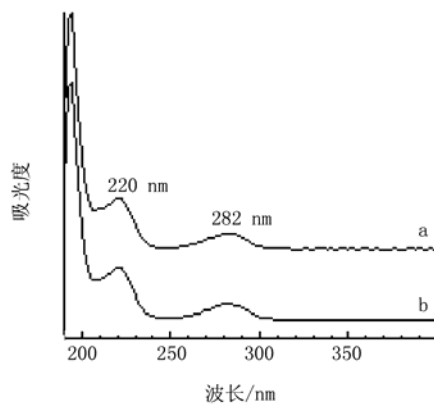


图 2 熊果苷标准品(a)及梨树叶样品(b)的紫外吸收图谱
Fig 2 UV spectrum of arbutin standard(a) and pear leaves(b)

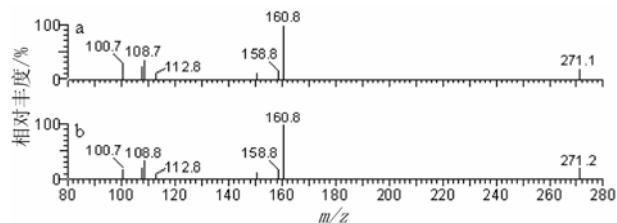


图 3 熊果苷标准品(a)及梨树叶样品(b)的扫描质谱图
Fig 3 Scan mass spectra of arbutin standard(a) and pear leaves(b)

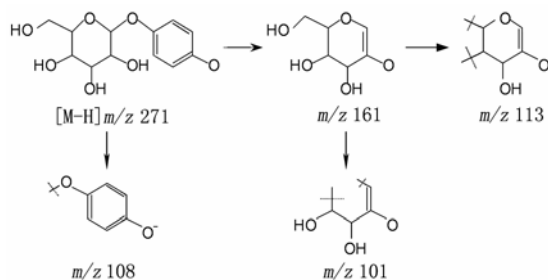


图 4 熊果苷的质谱裂解途径
Fig 4 The MS fragment pathways of arbutin

3.3 方法应用

本研究确认了梨树叶中含有熊果苷成分,证明熊果苷是梨树叶具有药理作用的主要成分之一,为梨树叶的药理作用机理的阐明及梨树叶的进一步开发利用提供了参考,利用本实验建立的 HPLC 对 3 批梨树叶样品进行了检测,含量均较高,而且梨树叶作为梨树种植过程中的副产物,利用其提取制备熊果苷具有一定的开发利用价值。

REFERENCES

- [1] WANG P, LAI Y, WU X M. Research on anti-inflammation effects of arbutin [J]. Chin Archives Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2008, 26(9): 1933-1935.
- [2] WANG Y F, ZHOU Y H, ZHANG J J. Pharmacodynamics of arbutin on relieving cough, dispelling phlegm and preventing asthma [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2003, 34(8): 739-741.
- [3] FANG J, DU S J, JIN Y L. Research progress of arbutin using in cosmetic [J]. J Hyg Res(卫生研究), 2009, 38(1): 111-113.
- [4] YAN X Y, TANG X F, WANG X Y, et al. Advances of research and application of arbutin [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2007, 24(4):18-22.
- [5] CHEN S M, LIANG J J, PANG Z W, et al. Analysis of arbutin in microbe fermentation solution by thin layer chromatography [J]. Mod Food Sci Tech(现代食品科技), 2007, 23(5): 76-78.
- [6] ALINA P, KATARZYNA B, ADAM S. Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves(*Vaccinium vitis idaeae*) [J]. Acta Pol Pharm Res, 2007, 64(5): 395-400.
- [7] THONGCHAI W, LIAWRUANGRATH B, LIAWRUANGRATH S. High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts [J]. J Cosmet Sci, 2007, 58(1): 35-44.
- [8] CHUKARINA E V, VLASOV A M, ELLER K I. Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in leaves of *Arctostaphylos*, *Vaccinium vitis-idaea*, and the plant preparations [J]. Voprosy Pitaniia, 2007, 76(3): 82-87.
- [9] RYCHLINSKA I, GUDEJ J. Qualitative and quantitative chromatographic investigation of hydroquinone derivatives in *Pyrus Communis* L. flowers [J]. Acta Pol Pharm Res, 2003, 60(4): 309-312.
- [10] KITIPONGPATANA N, CHAIWAN A, PUSOD U, et al. High-performance liquid chromatographic method for separation and quantitative analysis of arbutin in plant tissue cultures [J]. CMU J Nat Sci, 2007, 6(1): 65-74.
- [11] CHEN Z G, ZHANG K, MO J Y, et al. The determination of arbutin in *Paederia scandens* (Lour) Merr by capillary electrophoresis with amperometric detection [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2002, 30(7): 886.
- [12] CARMEN P, LAURIAN V, MIRCEA T. Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia*(L.) fritsch. acclimated in Romania [J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2009, 37(1): 129-132.
- [13] KONG X H, HE Q, YUE A S, et al. Determination of arbutin in apple juice concentrate by ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2010, 28(6): 632-634.

收稿日期: 2011-01-11

HPLC 考察硫酸头孢噻利在右旋糖酐注射液中的配伍稳定性

朱雅艳¹, 华俊彦¹, 田伟强^{1*}, 张颖异²(1.丽水市中心医院药剂科, 浙江 丽水 323000; 2.温州医学院药学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 考察注射用硫酸头孢噻利在右旋糖酐 40 葡萄糖注射液中的配伍稳定性。方法 考察配伍液分别在 4, 25, 37 °C 下, 6 h 内外观、pH 值的变化, 同时采用高效液相色谱法(HPLC)测定配伍液中硫酸头孢噻利的含量变化。结果 在 4, 25, 37 °C 下配伍液 6 h 内外观、pH 值、含量无明显变化。结论 硫酸头孢噻利与右旋糖酐 40 葡萄糖注射液在 6 h 内配伍稳定。

关键词: 高效液相色谱法; 硫酸头孢噻利; 配伍; 稳定性

中图分类号: R927.13; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)12-1132-04

Compatible Stability of Cefoselis Sulfate for Injection in Dextran 40 Glucose Injection by HPLC

ZHU Yayan¹, HUA Junyan¹, TIAN Weiqiang^{1*}, ZHANG Yingyi²(1. Pharmacy Department, Lishui Central Hospital, Lishui 323000, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the compatible stability of cefoselis sulfate for injection in dextran 40 glucose injection. **METHODS** Investigated the transmutation of the compatible fluid in appearance, pH value in 6 h at 4, 25, 37 °C, then determined the content of cefoselis sulfate in dextran 40 glucose injection by HPLC. **RESULTS** There were no obvious changes in appearance, pH value, and also no significant changes in the content of the compatible fluid in 6 h at 4, 25, 37 °C. **CONCLUSION** The cefoselis sulfate for injection is stable in 6 hours after mixing with dextran 40 glucose injection.

KEY WORDS: HPLC; cefoselis sulfate; compatible; stability

基金项目: 浙江省医学会基金项目(2007ZYC57)

作者简介: 朱雅艳, 女, 副主任药师 Tel: (0578)2681490
Tel: (0578)2681490 E-mail: lztianwq@126.com

E-mail: zjlszj0051@yahoo.com.cn

*通信作者: 田伟强, 男, 主任药师