

高效液相色谱法同时测定小叶丁香不同部位中 5 种活性成分的含量

刘普^{1,2}, 张创峰¹, 邓瑞雪¹, 赵天增², 尹卫平^{1,2*} (1. 河南科技大学化工与制药学院, 河南 洛阳 300072; 2. 河南省科学院天然产物重点实验室, 郑州 450002)

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 同时测定小叶丁香不同部位中 5 种糖苷类化合物含量的方法。方法 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 2.5) 20:80 等度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 (松果菊苷、连翘酯苷 B、类叶升麻苷、异类叶升麻苷) 334 nm, 橄榄苦苷 285 nm。柱温 30 °C。结果 松果菊苷在 0.24 ~ 2.8 μg, 连翘酯苷 B 在 0.32 ~ 1.6 μg, 类叶升麻苷在 0.48 ~ 2.4 μg, 异类叶升麻苷 0.36 ~ 1.8 μg, 橄榄苦苷在 0.4 ~ 3.6 μg 与峰面积呈良好的线性关系, *r* 分别为 0.999 7, 0.999 9, 0.999 5, 0.999 8, 0.999 9; 平均加样回收率 (*n* = 3) 分别为 99.19%, 99.40%, 99.45%, 98.45%, 99.5%; RSD 为 0.41%, 0.79%, 0.76%, 1.01%, 0.73%。结论 本方法快速简便、灵敏、可靠, 为药材小叶丁香的质量评价提供了科学依据。

关键词: 小叶丁香; 高效液相色谱法; 糖苷类化合物; 含量测定

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)24-1935-04

Simultaneous Determination of Five Glycosides in *Syringa pubescens* Turcz by HPLC

LIU Pu^{1,2}, ZHANG Chuang-feng¹, DENG Rui-xue¹, ZHAO Tian-zeng², YIN Wei-ping^{1,2*} (1. Chemical Engineering & pharmaceutical College Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Key Laboratory of Natural Products, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of echinacoside, forsythoside B, verbasoside, isoverbasoside and oleuropein in different parts of *Syringa pubescens*. **METHODS** The separation was performed on an Agilent Zorbax SB C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate solution (pH 2.5) 20:80 as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; the detection wavelengths were set at 334 nm (0-15 min) for echinacoside, forsythoside B, verbasoside and isoverbasoside, and 285 nm (15-25 min) for oleuropein. The column temperature was set at 30 °C. **RESULTS** The linear ranges of echinacoside, forsythoside B, verbasoside, isoverbasoside and oleuropein were 0.24 ~ 2.8 μg (*r* = 0.999 7), 0.32 ~ 1.6 μg (*r* = 0.999 9), 0.48 ~ 2.4 μg (*r* = 0.999 5), 0.36 ~ 1.8 μg (*r* = 0.999 8) and 0.4 ~ 3.6 μg (*r* = 0.999 9), respectively. The average recoveries (*n* = 3) were 99.19% with RSD of 0.41%, 99.40% with RSD of 0.79%, 99.45% with RSD of 0.76%, 98.45% with RSD of 1.01%, 99.5% with RSD of 0.73%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and can be used for quality control of *Syringa pubescens*.

KEY WORDS: *Syringa pubescens*; HPLC; glycosides; assay

小叶丁香 (*Syringa pubescens* Turcz) 又名毛丁香、巧玲花等, 木犀科丁香属灌木植物, 分布于河南、河北、陕西、山西、甘肃等地。生长在海拔 800 ~ 2 400 m 山地、沟内或崖石上, 河南省则主要分布于伏牛山和太行山脉^[1]。民间用其花果实泡茶饮用, 有消炎、镇咳、治疗肝炎和肝硬化之功效。文献报道小叶丁香的化学成分主要有苯乙醇苷类、裂环环烯醚萜苷类^[2]、黄酮苷类^[3]等。糖苷类化合物本身是一种具有较强生物活性的天然产物^[4-6], 而小叶丁香

糖苷类粗提物具有较强的抑制肝纤维化的作用。本课题组前期的研究已经从小叶丁香中分离得到大量的苯乙醇苷类及裂环环烯醚萜苷类化合物^[7], 并且对其中一个主要成分橄榄苦苷的测定方法进行研究^[8]。目前尚未有关于小叶丁香中苯乙醇苷类化合物检测方法的报道, 因此有必要建立起小叶丁香中苯乙醇苷类和裂环环烯醚萜苷类化合物的检测方法。本实验采用高效液相色谱法对小叶丁香中 4 种苯乙醇苷类和 1 种裂环环烯醚萜苷类化合物的检测

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划资助项目 (2010B350003); 河南科技大学博士科研启动基金资助项目 (09001244, 09001334)

作者简介: 刘普, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然有机活性成分及药理活性测试; * 通讯作者: 尹卫平, 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物化学; Tel: (0379) 64232193; E-mail: ywpq@163.com

方法进行了研究,为全面控制其质量奠定了基础。

1 仪器、试剂及药材

Agilent1100 高效液相色谱仪,四元泵和二极阵列检测器(G1313A);在线脱气柱温箱,自动进样器,Agilent1100 色谱工作站(美国安捷伦公司);AR 级 2140 型电子分析天平(上海越磁电子科技有限公司)。

对照品松果菊苷,连翘酯苷 B,类叶升麻苷,异类叶升麻苷,橄榄苦苷均为本实验室自制,经 NMR 和 ESI-MS 鉴定了化合物的结构,HPLC 测定纯度大于 98%。

乙腈为色谱纯,水为双蒸水,磷酸二氢钾为色谱纯,其余试剂均为分析纯。小叶丁香不同部位采自河南省嵩县车村镇,样品由河南科技大学王忠东教授鉴定为木犀科丁香属植物小叶丁香(*S. pubescens*)叶、花和嫩枝。

2 方法与结果

2.1 吸收波长的选择

精密称取松果菊苷 8.6 mg,连翘酯苷 B 7.4 mg,类叶升麻苷 8.2 mg,异类叶升麻苷 11.8 mg,橄榄苦苷 11.6 mg,用甲醇定容于 50 mL 量瓶中,稀释 10 倍后用可见紫外分光光度计进行全波长扫描,用甲醇作空白,在波长 200~400 nm 间扫描,可以看出松果菊苷、连翘酯苷 B、类叶升麻苷、异类叶升麻苷在 330~335 nm 处有明显的吸收峰。橄榄苦苷在 232 和 285 nm 两处有明显吸收峰。

2.2 色谱条件

Agilent1100 高效液相色谱仪,色谱柱:Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-磷酸二氢钾缓冲盐(pH 2.5)(20:80);体积流量为 1.0 mL · min⁻¹;检测波长:(0~15 min) 334 nm,(15 min 后) 285 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。按照外标法测定,对照品和样品的色谱图见图 1。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取对照品松果菊苷 18.6 mg,连翘酯苷 B 16.1 mg,类叶升麻苷 22.3 mg,异类叶升麻苷 18.2 mg,橄榄苦苷 21.8 mg,加甲醇定容至 100 mL,配成质量浓度为 186,161,223,182,218 μg · mL⁻¹ 的混合溶液,即为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

分别准确称取阴干粉碎后(60 目)的小叶丁

香花、叶和嫩枝各 10 g,用滤纸包好,放入索氏提取器中,在提取器 100 mL 烧瓶中加入 50 mL 乙腈,加热回流提取 3 h。冷却后,滤液用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,定溶于 100 mL 量瓶中,即为供试品溶液。

2.5 线性关系的考察

精密吸取混合对照品储备液 2、4、6、8、10 μL 注入色谱仪,按照“2.2”项下的色谱条件进行测定,记录峰面积。以对照品的峰面积(*Y*)为纵坐标,进样量(*X*)为横坐标进行线性回归,得松果菊苷,连翘酯苷 B,类叶升麻苷,异类叶升麻苷,橄榄苦苷线性回归方程和相关系数,结果见表 1。各个化合物的最低检测限(以信噪比 *S/N* 为 3:1 计算)和定量限(以信噪比 *S/N* 为 10:1 计算)。检测限分别为 0.08, 0.01, 0.1, 0.1, 0.1 μg,定量限分别为 0.2, 0.2, 0.3, 0.3, 0.3 μg。

2.6 精密度实验

按“2.2”项下色谱条件,取对照品混合物溶液,连续进样 6 次,记录峰面积,计算松果菊苷、连翘酯苷 B、类叶升麻苷、异类叶升麻苷和橄榄苦苷峰面积

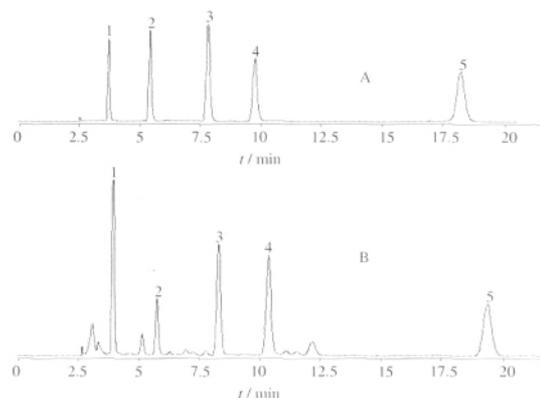


图 1 小叶丁香对照品(A)和样品的色谱图(B)

1 - 松果菊苷; 2 - 连翘酯苷 B; 3 - 类叶升麻苷; 4 - 异类叶升麻苷; 5 - 橄榄苦苷

Fig. 1 Chromatograms of reference substances (A) and sample (B) of *S. pubescens*

1 - echinacoside; 2 - forsythoside B; 3 - verbascoside; 4 - isoverbacoside; 5 - oleuroprin

表 1 5 种对照品的线性关系

Tab. 1 Linearity of the calibration curves of 5 compounds

Sample	Regression formulation	<i>r</i>
Echinacoside	$y = 512.3x + 27.376$	0.999 7
Forsythoside B	$y = 621.49x + 106.97$	0.999 9
Verbascoside	$y = 889.97x + 170.67$	0.999 5
Isoverbacoside	$y = 825.74x + 74.593$	0.999 8
Oleuroprin	$y = 1287.2x + 8.4492$	0.999 9

的 RSD 分别为 0.54% ,0.74% ,1.13% ,0.98% ,0.43% 。

2.7 稳定性实验

取同一供试品溶液 ,分别于配制后 0、2、4、8、12、24、48 h 进样 ,记录峰面积 ,结果松果菊苷、连翘酯苷 B、类叶升麻苷、异类叶升麻苷和橄榄苦苷的峰面积的 RSD 值分别为 1.78% ,1.63% ,2.34% ,1.91% ,1.63% 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.8 重复性实验

精密称取小叶丁香花样品粉末 5 份 ,每份 5 g ,按照“2.4”项下方法操作 ,制备所需供试品溶液 ,测定松果菊苷、连翘酯苷 B、类叶升麻苷、异类叶升麻苷、橄榄苦苷的含量 ,计算各组分含量平均值分别为 1.50% ,0.16% ,0.052% ,0.055% ,1.36% ; RSD 分别为 1.05% ,1.33% ,1.24% ,0.76% ,0.72% 。

2.9 加样回收率实验

精密称取已经测得含量的小叶丁香花粉末 9 份 ,每份 5 g 3 份为一组 ,分别精密加入一定量的松果菊苷、连翘酯苷 B、类叶升麻苷、异类叶升麻苷、橄榄苦苷对照品(约相当于样品中各对照品含量的 80% ,100% ,120%) ,按照“2.4”项下方法操作 ,制备所需溶液 ,进样 10 μ L ,测定提取液中 5 种组分的含量并计算加样回收率。松果菊苷 ,连翘酯苷 B ,类叶升麻苷 ,异类叶升麻苷 ,橄榄苦苷平均加样回收率和 RSD 见表 2。

2.10 样品含量的测定

表 2 小叶丁香中 5 种组分回收率测定结果. $n=3$

Tab. 2 Recoveries of 5 compound of *S. pubescens*. $n=3$

Component	Quantity in sample / μ g	Added quantity / μ g	Determined quantity / μ g	Recovery /%	RSD /%
Echinacoside	1 513.2	1 205.6	2 695.7	99.15	0.41
	1 513.2	1 489.2	2 966.1	98.79	
	1 513.2	1 798.5	3 299.4	99.63	
Forsythoside B	148.5	110.3	259.4	100.24	0.79
	148.5	135.6	282.2	99.32	
	148.5	171.3	315.6	98.68	
Verbascoside	51.7	38.6	89.1	98.64	0.76
	51.7	46.5	98.3	100.14	
	51.7	58.6	109.8	99.56	
Isoverbascoside	56.1	45.6	100.8	99.12	1.01
	56.1	57.2	110.3	97.31	
	56.1	65.1	119.9	98.93	
Oleuropein	1 320.2	985.6	2 310.4	100.20	0.73
	1 320.2	1 256.3	2 564.5	99.54	
	1 320.2	1 500.7	2 785.9	98.76	

取产自豫西伏牛山区的小叶丁香不同部位样品(叶、花、嫩枝)各 5 份 ,按照“2.4”项下的方法制备供试品溶液。精密吸取对照品混合物和供试品溶液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪 ,照上述色谱条件分别测定 ,外标法计算不同部位中各个组分的含量 ,结果见表 3。

3 讨论

3.1 供试品制备方法的建立

本实验比较了甲醇、乙醇和乙腈等溶剂的提取效率 ,同时对不同的提取方法(超声、索氏回流、冷浸) ,回流提取时间、料液比及溶剂浓度进行了优化 ,结果发现 ,采用 10 倍量的乙腈用索氏提取器回流 3 h 效果最好 ,大于用其他提取方法得到的含量。

3.2 检测波长的选择

通过全波长扫描 ,发现松果菊苷 ,连翘酯苷 B ,类叶升麻苷 ,异类叶升麻苷都在 330 ~ 335 nm 附近有较强的紫外吸收 ,松果菊苷在 334 nm 处有最大吸收 ,连翘酯苷 B 在 334 nm 有最大吸收 ,类叶升麻苷在 335 nm 有最大吸收 ,异类叶升麻苷在 334 nm 有最大吸收。橄榄苦苷在 232 和 285 nm 有两处明显吸收峰 ,而橄榄苦苷在 232 和 285 nm 处 $\log \epsilon$ 分别为 3.50 和 4.18。综合考虑 ,最终选择 334 nm 作为测定的苯乙醇苷类化合物的波长 ,选择 285 nm 为作为检测橄榄苦苷的波长。

3.3 流动相的选择

曾尝试了采用甲醇-水 ,甲醇-1% 醋酸水溶液 ,乙腈-水 ,乙腈醋酸水溶液等洗脱体系 ,均不能达到理想的分离效果 ,而选择乙腈-2% 磷酸二氢钾 (pH 2.5) 进行等度洗脱可以使 5 种成分在短时间里完全分离 ,满足测试需要。

本实验建立了同时测定小叶丁香不同部位中 4 种苯乙醇苷类和 1 种裂环烯醚萜苷类化合物含量的测定方法 ,为系统评价小叶丁香的质量提供了理论依据。测定结果表明 ,在药材小叶丁香的的不同部位 ,几种成分的含量不一致 ,花中含量普遍较高 ,叶

表 3 小叶丁香样品含量测定结果. % $n=3 \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Results of determination of *S. pubescens* samples. % , $n=3 \bar{x} \pm s$

Parts	Flower	Leaf	Spray
Echinacoside	1.52 \pm 0.06	1.05 \pm 0.04	1.21 \pm 0.06
Forsythoside B	0.15 \pm 0.03	0.081 \pm 0.009	0.072 \pm 0.07
Verbascoside	0.052 \pm 0.08	0.024 \pm 0.004	0.015 \pm 0.005
Isoverbascoside	0.058 \pm 0.008	0.022 \pm 0.005	0.018 \pm 0.003
Oleuropein	1.35 \pm 0.04	0.88 \pm 0.03	1.01 \pm 0.04

和嫩枝中含量相对较低。在 5 种活性成分中小叶丁香样品中松果菊苷含量较高,连翘酯苷 B 含量较低。

REFERENCES

- [1] Institute of Botany, *The Chinese Academy of Sciences. The Picture Index of Senior China Plant*(中国高等植物图鉴) [M]. Beijing: Science Press, 1983: 350.
- [2] WU M J, ZHAO T Z, ZHANG H Y, *et al.* Studies on chemical constituents of *Syringa pubescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2003, 34(1): 7-9.
- [3] WU M J, ZHAO T Z, ZHANG H Y, *et al.* Studies on chemical constituents of *Syringa pubescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2003, 34(7): 594-595.
- [4] JING H, ZUO J F, LI J S. Development in research of phenylethanoid glycosides [J]. *Lishizhen Med Mater Res* (时珍国医国药), 2006, 17(3): 440-441.
- [5] ZHENG X K, LIU Y Y, FENG W S. Development in research of natural phenylethanoid glycosides [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2011, 20(3): 230-234.
- [6] BISIGNOAO G, TOMAINO A, CASCIO R L, *et al.* On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(8): 971.
- [7] DENG X D, YUAN H, LIU P, *et al.* Chemical constituents from *Syringa pubescens* Turcz [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38(9): 813-815.
- [8] DENG R X, WANG Z, DUAN W L, *et al.* HPLC Determination of oleuropein in from different parts of *Phlomis umbrosa* [J]. *Lishizhen Med Mater Res*(时珍国医国药), 2010, 21(9): 2230-2231.

(收稿日期: 2011-06-21)

高效毛细管电泳测定甘草饮片中 6 种指标成分的含量

周逸芝, 韩乐, 刘训红*, 傅兴圣, 许虎, 李俊松, 蔡宝昌, 图提古丽·奥布力(南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029)

摘要: 目的 建立高效毛细管电泳法 (HPCE) 同时测定甘草饮片中甘草次酸、异甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸和异甘草素含量的方法。方法 40 mmol · L⁻¹ 硼砂-10 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢钠-10% 甲醇 (pH 8.6) 为电泳介质, 未涂渍标准熔融石英毛细管 (75 μm × 64.5 cm, 有效长度 56 cm) 为分离通道, 分离电压为 20 kV, 检测波长为 254 nm, 毛细管温度为 20 °C, 压力进样为 5 kPa × 6 s。结果 6 种指标成分的含量与峰面积的线性关系良好 ($r > 0.995$); 加样回收率为 95.00% ~ 100.90%; 用此法测定了甘草饮片中 6 种指标成分的含量, 结果满意。结论 该方法简单、准确, 重复性较好, 可用于甘草饮片内在质量的评价和控制。

关键词: 高效毛细管电泳法; 甘草; 指标成分; 含量测定

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)24-1938-05

Simultaneous Determination of Six Index Components in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by HPCE

ZHOU Yi-zhi, HAN Le, LIU Xun-hong*, FU Xing-sheng, XU Hu, LI Jun-song, CAI Bao-chang, Tutiguli · Aobuli (Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicines Processing, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a high performance capillary electrophoresis (HPCE) method for simultaneous determination of glycyrrhetic acid, isoliquiritin, liquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid and isoliquiritigenin in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. **METHODS** 40 mmol · L⁻¹ sodium borate-10 mmol · L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate-10% methanol was used as the buffer solution (pH 8.6). Uncoated fused silica capillary (75 μm × 64.5 cm, 56 cm of effective length) was used with separation voltage of 20 kV. The detection wavelength was 254 nm. The column temperature was maintained at 20 °C, and the sample was injected at 5 kPa × 6 s. **RESULTS** The calibration curves of the 6 index components showed good linearity ($r > 0.995$) in the range of the tested concentration, the average recoveries of the method were between 95.00% - 100.90%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for quality control of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma.

KEY WORDS: HPCE; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; index components; determination

基金项目: 江苏省中药炮制重点实验室开放式课题 (ZYPZ007); 江苏省科技厅“科技基础实施建设计划”专项 (BM2009903)

作者简介: 周逸芝, 女, 硕士研究生 研究方向: 中药品质评价 * 通讯作者: 刘训红, 男, 教授 研究方向: 中药品质评价与资源开发

Tel: (025) 85811511 E-mail: liuxunh1959@sohu.com

• 1938 • *Chin Pharm J*, 2011 December, Vol. 46 No. 24

中国药理学杂志 2011 年 12 月第 46 卷第 24 期