

毛细管区带电泳法测定侧柏叶中槲皮苷含量

丁红梅*, 盛振华, 葛尔宁

(浙江中医药大学分析测试中心, 杭州 310053)

[摘要] 目的:建立毛细管区带电泳(CZE)分离测定中药侧柏叶中槲皮苷的新方法。方法:以 30 mmol·L⁻¹硼砂-硼酸(体积比 1:3)为运行缓冲液,分离电压 25 kV,温度 25 °C,压力进样 0.5 psi × 8 s,运行时间 7 min 为电泳条件,在 254 nm 波长下检测侧柏叶中的槲皮苷。结果:槲皮苷在 1~200 mg·L⁻¹线性关系良好,精密度、稳定性、加样回收率 RSD 均小于 3%,测得 3 个批次侧柏叶中槲皮苷含量分别为 2.551 3, 2.546 7, 2.478 0 mg·g⁻¹。结论:该方法简便、准确,为此类药物的质量控制提供了一种快速的检测方法。

[关键词] 毛细管区带电泳;侧柏叶;槲皮苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)11-0073-03

Determination of Quercitrin from *Platycladus orientalis* Leaves by Capillary-zone Electrophoresis

DING Hong-mei*, SHENG Zhen-hua, GE Er-ning

(Analytical Testing Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a new determination method for quercitrin from *Platycladus orientalis* leaves by capillary-zone electrophoresis (CZE). **Method:** Under the optimized CZE conditions: a running buffer composed of 30 mmol·L⁻¹ borax-boric acid (volume 1:3), separation voltage at 25 kV, temperature at 25 centigrade, injection time for 8 sec with 0.5 psi pressure, quercitrin from *P. orientalis* leaves was detected at 254 nm wavelength. **Result:** Quercitrin was linear in the range of 1-200 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 3$). The RSD of exactitude, stability, and recovery of the method was 1.1346%, 2.6046% and 2.3315%, respectively. The contents of quercitrin in three batches of *P. orientalis* leaves were 2.551 3, 2.546 7, 2.478 0 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The method was simple, fast and accurate for determination of the drugs containing quercitrin.

[Key words] capillary-zone electrophoresis; *Platycladus orientalis* leaves; quercitrin

侧柏叶为侧柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢及叶,具有凉血止血、生发乌发之功效。槲皮苷 quercitrin 又名栲素,是侧柏叶中的一种黄酮类化合物^[1],具有抗病毒、抗炎等功效^[2],对大鼠急性肝损伤具有良好保护作用^[3]。目前常见的槲皮苷检测方法为液相色谱法,此法虽灵敏,但由于侧柏叶样品的成分复杂,色谱柱易被污染

不易再生,给样品前处理带来很大的困难,且 HPLC 试剂耗费大、分析耗时长限制了其在临床实际检测中的应用。毛细管区带电泳 (capillary-zone electrophoresis, CZE) 是一种基于溶质各组分电荷比差异而在电场中迁移率不同进行分析的方法,已应用于槟榔碱、通光藤苷、莨菪碱、喜树碱、绿原酸、小檗碱、黄芩苷等多种中药成分的检测^[4-7],具有工作条件简单,试剂用量少,柱效高等优点。但用 CZE 检测侧柏叶中的槲皮苷成分,至今未见报道。我们首次建立了用 CZE 分离检测侧柏叶中槲皮苷的方法,为此类药物的质量控制提供参考。

[收稿日期] 20100302(004)

[基金项目] 浙江中医药大学科研基金([2008]10号)

[通讯作者] * 丁红梅,副研究员, Tel: 0571-86613589, E-mail: littlebaby@zjtcn.net

1 材料

1.1 仪器 Benckman P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪, 使用 32 Karat 8.0 软件采集和处理数据; Benckman eCAP 未涂层石英毛细管 70 cm × 75 μm, 有效长度 60 cm; 超声仪; METTLER ABS135-S 电子分析天平。

1.2 试药 槲皮苷对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 111538-200302); 侧柏叶购自浙江中医药大学中药饮片厂(产地安徽); 纯净水购自浙江娃哈哈实业股份有限公司饮用水分公司, 甲醇 HPLC 级, 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 毛细管电泳条件 运行缓冲液 30 mmol·L⁻¹ 硼砂-硼酸(1:3), 电压 25 kV, 温度 25 °C, 压力进样 0.5 psi × 8 s, 运行时间 7 min; 检测波长 254 nm。为提高迁移时间、峰面积和峰高的重现性, 2 次运行之间, 用纯水、0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠、纯水、运行缓冲液依次冲洗 2 min。

2.2 对照品储备液制备 精密称取槲皮苷对照品 0.005 0 g, 用甲醇溶解并定容至 5 mL。

2.3 供试样品溶液制备 取干燥侧柏叶用植物粉碎机粉碎, 过 60 目筛。精确称取侧柏叶粉, 用滤纸

包好, 置索氏提取器中用石油醚(沸点 60 ~ 90 °C) 85 °C 回流提取 12 h 脱脂, 将样品置通风处干燥至无醚味, 60 °C 烘干至恒重, 称重, 干燥器中保存备用。精确称取处理好的侧柏叶粉约 0.200 0 g 于具塞瓶中, 加入 10 mL 甲醇, 超声萃取 30 min 过滤, 滤液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 定容至 10 mL, 稀释 10 倍作为供试样品溶液。

2.4 定性分析 分别取对照品溶液、供试样品溶液、对照品和供试样品混合溶液电泳, 比较电泳图谱中样品峰与标准峰的迁移时间是否一致, 混合样中槲皮苷标准峰与样品峰是否完全重叠, 有无再分离现象。

2.5 方法学考察 参考《中国药典》2005 年版进行方法学考察^[8]。

2.6 含量测定 取 3 个批次侧柏叶粉按 2.3 项下方法制备供试样品溶液, 各样平行电泳 3 次, 取其峰面积的平均值按外标法测定含量。

3 结果与分析

3.1 定性分析 经反复电泳, 观察比较对照品、供试品和混合样品的电泳图谱, 结果表明供试品峰、标准峰的迁移时间基本一致; 混合样品中样品峰与标准峰完全重叠且峰型完好, 无肩峰或再分离现象, 由此确定侧柏叶样品中的槲皮苷成分见图 1。

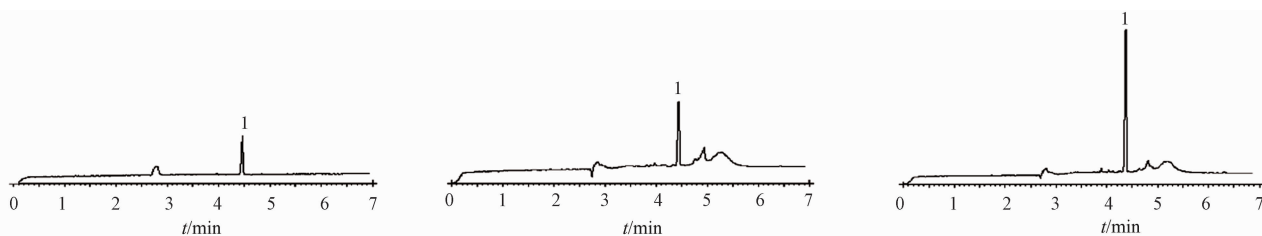


图 1 侧柏叶电泳图

A. 槲皮苷对照品; B. 侧柏叶样品; C. 侧柏叶样品 + 槲皮苷对照品; 1. 槲皮苷

3.2 方法学考察

3.2.1 线性 取对照品储备液用纯水分别稀释至 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 mg·L⁻¹ 标准溶液, 依次进样电泳, 积分计算峰面积。以峰面积 X 为横坐标, 浓度 Y (mg·L⁻¹) 为纵坐标进行线性回归, 线性方程为 $Y = 1.15 \times 10^{-3} X - 0.879834$, $r = 0.9993$ 。表明在 1 ~ 200 mg·L⁻¹ 槲皮苷浓度与峰面积呈良好的线性关系。

3.2.2 精密度 取同一供试样品溶液, 于 1 d 内连续电泳 6 次, 结果峰面积的标准偏差 (s) 66.679 6, RSD 为 1.134 6%, 表明重复性良好。连续 3 d 每天电泳 1 次, 结果峰面积 s 201.298 3, RSD 2.98%, 表明中间精密度良好。

3.2.3 稳定性 取同一供试样品溶液于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 电泳, 结果峰面积 s 156.789 9, RSD 2.60%, 表明所制样品在 24 h 内稳定。

3.2.4 回收率试验 精密称取侧柏叶粉一式 6 份, 每份加入 500 mg·L⁻¹ 对照品溶液 1 mL, 按 2.3 项下方法制备供试样品溶液, 分别进样电泳, 计算回收率。结果见表 1, 平均回收率为 95.81%, RSD 2.33%, 表明该法具有较好准确度, 可应用于侧柏叶中槲皮苷的测定。

3.3 含量测定 3 个批次侧柏叶粉按 2.3 项下方法制备供试样品溶液, 平行测定 3 次, 取其峰面积平均值, 用标准曲线确定浓度, 计算含量。结果 070522-1, 070522-2, 070522-3 3 个批次侧柏叶中槲皮苷含量

表 1 侧柏叶中槲皮苷加样回收率

样品中 量/ μg	加入量 / μg	测定量 / μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
604.001 7	500	1 099.656 8	99.131 0	95.814 3	2.331 5
592.441 9	500	1 076.584 4	96.828 5		
577.992 1	500	1 048.920 4	94.185 7		
586.661 9	500	1 071.418 9	96.951 4		
583.772 0	500	1 060.169 7	95.279 5		
577.992 1	500	1 040.540 9	92.509 8		

分别为 2.551 3, 2.546 7, 2.478 0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

4 讨论

毛细管电泳在 2005 年版《中国药典》中已被收载为法定检测方法,具有快速、高效、简便、环保等优点^[6],非常适合分离中药复杂成分,具有广泛的应用前景。槲皮苷分子富含羟基($-\text{OH}$)^[1],非常适合于用碱性缓冲液进行 CZE 分离,试验发现用硼砂缓冲液比磷酸缓冲体系峰型更好,且重复性强,因此我们选用硼砂-硼酸为电泳缓冲液。由于缓冲液离子浓度、分离电压、分离温度、进样量影响毛细管电泳的分离效果,因此我们从这 4 个关键因素入手,综合考虑分离度、柱效、峰型和出峰时间等,确定了槲皮苷的毛细管电泳分离条件。由于槲皮苷的水溶性差,一般分析试验中常用甲醇作为溶剂,而在毛细管电泳中由于甲醇的挥发性易造成槲皮苷浓度变化,增加检测误差,我们在试验中选用电泳缓冲液来稀释进样试液,既减少了溶剂挥发,又因缓冲液的碱性促

进了槲皮苷的溶解,提高结果的准确性。经方法学考察,此法在 $1\sim 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 槲皮苷浓度与峰面积线性关系良好,精密度、稳定性、准确度都较佳,已成功应用于侧柏叶中槲皮苷含量的检测,为此类药物的质量控制提供了一种简便、准确、快速的检测方法。

[参考文献]

- [1] 金光洙,王映清,莫风奎. 黄酮类化合物-槲皮苷的分子结构研究[J]. 沈阳药学院学报,1994,11(2):91.
- [2] 俞建平,张文婷,祝明. 高效液相色谱法测定鱼腥草中槲皮苷的含量[J]. 医药导报,2008,27(3):331.
- [3] 刘丽,侯立强,满堂. 槲皮苷对扑热息痛诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用研究[J]. 中国现代医生,2007,45(10):98.
- [4] 袁炜,吕建德,傅小芸. 槟榔中槟榔碱和槟榔次碱的毛细管电泳分析[J]. 分析化学,2000,28(6):749.
- [5] 邢旺兴,程荣珍,林培英,等. 中药通光藤中通光藤苷 J 的高效毛细管电泳分析[J]. 第二军医大学学报,2003,24(12):1338.
- [6] 李霞,罗晶,柳小秦,等. 区带毛细管电泳法分离测定莨菪浸膏片中莨菪烷类生物碱[J]. 药物分析杂志,2008,28(1):121.
- [7] 黄宝美,姚程炜,边清泉,等. 喜树果中喜树碱含量的高效毛细管电泳法测定[J]. 分析测试学报,2008,27(3):319.
- [8] 中国药典[S]. 一部. 2005:附录 114.

[责任编辑 顾雪竹]