

HPLC法测定熊果苷乳膏中熊果苷的含量

孟小斌^{1*}, 曲彩虹²(1.梅州市人民医院, 广东 梅州 514031; 2.中山大学附属第三医院 广州 510630)

中图分类号 R283.621; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2944-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.23

摘要 目的:建立测定熊果苷乳膏中熊果苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为WELCHROM C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(70:30, V/V),柱温为28℃,流速为0.8 ml/min,检测波长为280 nm。结果:熊果苷的质量浓度在0.010 1~0.201 6 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为99.53%,RSD=0.88%($n=9$)。结论:该方法简便、准确、精密度高、重复性好,可用于熊果苷乳膏的质量控制。
关键词 熊果苷乳膏;熊果苷;含量测定;高效液相色谱法

Content Determination of Arbutin in Arbutin Cream by HPLC

MENG Xiao-bin¹, QU Cai-hong²(1.Meizhou Municipal People's Hospital, Guangdong Meizhou 514031, China; 2.The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of arbutin in Arbutin cream. METHODS: HPLC method was used. The determination was performed on WELCHROM C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with methanol-water(70:30, V/V) as mobile phase at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and column temperature was 28℃. RESULTS: The linear range of arbutin was 0.010 1-0.201 6 mg/ml($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 99.53% (RSD=0.88%, $n=9$). The RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, precise and reproducible, which can be used for quality control of Arbutin cream.

KEY WORDS Arbutin cream; Arbutin; Content determination; HPLC

表4 10个市售川乌品种中总黄酮质量分数的多重比较结果(SSR法)

Tab 4 Multiple comparison of flavonoids content in 10 marketable *A. carmichaelii* (SSR)

样品编号	\bar{x}_1	$\bar{x}_2-1.68$	$\bar{x}_3-1.95$	$\bar{x}_4-2.00$	$\bar{x}_5-2.97$	$\bar{x}_6-3.12$	$\bar{x}_7-5.37$	$\bar{x}_8-5.93$	$\bar{x}_9-8.99$	$\bar{x}_{10}-11.30$
8	13.31	11.64**	11.36**	11.31**	10.34**	10.20**	7.94**	7.38**	4.32**	2.01*
5	11.30	9.63**	9.35**	9.30**	8.33**	8.19**	9.33**	5.37**	2.31**	
10	8.99	7.32**	7.04**	6.98**	6.02**	5.88**	3.62**	3.06**		
4	5.93	4.25**	3.98**	3.92**	2.96**	2.81**	0.56			
6	5.37	3.69**	3.42**	3.36**	2.40**	2.25**				
7	3.12	1.44	1.16	1.11	0.14					
2	2.97	1.30	1.02	0.97						
1	2.01	0.33	0.05							
9	1.95	0.28								
3	1.68									

注:“*”表示介于 $LSD_{0.05}$ 与 $LSD_{0.01}$ 之间者,具有显著性;“**”表示大于 $LSD_{0.01}$ 者,具有极显著性

note: When the value is between $LSD_{0.05}$ and $LSD_{0.01}$, which means the significance, the corresponding data is marked with “*”. When the values is greater than $LSD_{0.01}$, which means the most significance, the corresponding data is marked with “**”

之间,平均值为5.66%。其中,总黄酮质量分数最高的是8号川乌,高达13.31%,极显著高于10、4、6、7、2、1、9、3号,显著高于5号;3号川乌的总黄酮质量分数最低,只占1.68%,但与7、

2、1、9号川乌比较差异无统计学意义。造成这种情况的发生可能与市售川乌的基原、产地、采收时间、加工及贮藏方法不同有关。提示目前在中药材市场流通的川乌药材品种较为混乱,水溶性化学成分含量不一,导致其在药用过程中疗效不能得到确切保证,应引起临床重视。

参考文献

- [1] 唐瑜之,李永波.川乌新义[J].中华实用中西医杂志, 2005, 19(18):1 220.
- [2] Vitalini S, Braca A, Passarella D, et al. New flavonol glycosides from *Aconitum burnatii* Gáy- er and *Aconitum variegatum* L. [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7):940.
- [3] Braca A, Fico G, Morelli I, et al. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavones glycosides from different *Aconitum species*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 86(63):63.
- [4] 何晓川,周宁娜,林青,等.滇黄芩总黄酮抗心律失常作用的实验研究[J].中国中药杂志, 2010, 35(4):508.
- [5] 程秋月,郭菁,张成义.黄酮类化合物药理作用的研究[J].北华大学学报, 2011, 12(2):180.
- [6] 朱芸,白晓光,李鹏,等.正交试验优选锁阳总黄酮超声提取工艺[J].中国药房, 2011, 22(15):1 376.
- [7] 唐小荷,陈震翼.山楂籽黄酮提取物抗实验性心律失常作用的研究[J].齐鲁药事, 2012, 31(6):321.

(收稿日期:2013-01-16 修回日期:2013-05-16)

* 副主任药师。研究方向:临床药学。电话:0753-2131137。
E-mail:xbmeng@163.com

熊果苷(Arbutin)是一种源于熊果属植物叶子细胞里的皮肤脱色成分,能有效地抑制皮肤中的酪氨酸酶活性,阻断黑色素的形成,从而减少皮肤色素沉积,祛除色斑和雀斑^[1-2];而且,它还具有一定的抗氧化、抗炎作用^[3-4]。鉴于此,为验证其在临床上治疗紫外线诱导的黑色素斑的功效,梅州市人民医院制剂室将其制备成了乳膏。为了控制该制剂的质量,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定熊果苷乳膏中熊果苷的含量。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪(美国Agilent公司);92SM-201A型电子分析天平(瑞士PRECISA公司, $d=0.01$ mg);AS3120型超声波发生器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

熊果苷乳膏[含熊果苷0.5% (g/g),批号:120814、120820、120903、120913、120927]及不含熊果苷的阴性乳膏样品由梅州市人民医院制剂室制备;熊果苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:YY90140,纯度 $\geq 98\%$);所用其他原料包括硬脂酸、羊毛脂、白凡士林、三乙醇胺、甘油、羟苯乙酯均为药用规格,试剂均为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品贮备液的制备 精密称取熊果苷对照品10.08 mg,置50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为0.2016 mg/ml的熊果苷对照品贮备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取熊果苷乳膏1 g(约相当于含熊果苷5 mg),置100 ml锥形瓶中,加甲醇适量,超声(功率:120 W,频率:40 kHz)提取15 min,置冰箱冷藏室内1 h,取出,先用滤纸滤过,再用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,合并续滤液,放至室温,用甲醇定容至50 ml,即得供试品溶液。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 取阴性乳膏样品适量,按“2.1.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱:WELCHROM C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(70:30, V/V);柱温:28 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.8 ml/min;检测波长:280 nm;进样量:10 μl 。在此色谱条件下,熊果苷的保留时间为2.68 min,其他杂质对其含量测定无干扰。色谱见图1。

2.3 线性关系考察

精密量取对照品溶液0.5、1、2、4、6、8、10 ml,分别置10 ml量瓶中,加甲醇定容,分别按上述色谱条件进样10 μl ,记录峰面积。以对照品质量浓度(c)为横坐标,峰面积积分值(A)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $A=4.0899c+0.0061$ ($r=0.9999$, $n=7$)。结果表明,熊果苷的质量浓度在0.0101~0.2016 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密量取质量浓度为0.0403 mg/ml的对照品溶液10 μl ,按上述色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果,RSD=0.66% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取同一(批号:120814)供试品溶液适量,按上述色谱条件于制备后0、2、4、8、16、24 h进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.88% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批(批号:120814)熊果苷乳膏1 g,共6份,

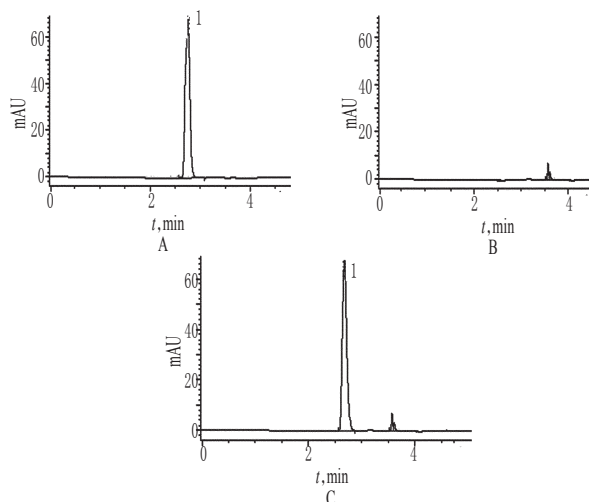


图1 高效液相色谱图

A.熊果苷对照品;B.阴性对照;C.供试品;1.熊果苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.arbutin control; B. negative control; C. test sample; 1. arbutin 分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,样品中熊果苷的平均含量为标示量的99.86%,RSD=1.25% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知熊果苷含量(4.9930 mg/g)的熊果苷乳膏1 g,共9份,分别精密加入低(0.0403 mg/ml)、中(0.1210 mg/ml)、高(0.2016 mg/ml)质量浓度的熊果苷对照品溶液20 ml,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=9$)

序号	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.9986	0.1613	1.1586	99.19	99.53	0.88
2	0.9986	0.1613	1.1587	99.26		
3	0.9986	0.1613	1.1617	101.12		
4	0.9986	0.4838	1.4775	98.99		
5	0.9986	0.4838	1.4798	99.46		
6	0.9986	0.4838	1.4785	98.68		
7	0.9986	0.8064	1.7869	97.76		
8	0.9986	0.8064	1.8095	100.56		
9	0.9986	0.8064	1.8117	100.83		

2.8 样品含量测定

取5批不同时间制备的熊果苷乳膏,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。同时取供试品溶液和熊果苷对照品溶液各适量,按上述色谱条件分别进样测定,记录峰面积,以峰面积计算熊果苷的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=5$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=5$)

样品批号	熊果苷占标示量的百分含量, %	\bar{x} , %	RSD, %
120814	99.86	99.76	1.74
120820	98.53		
120903	101.67		
120913	97.55		
120927	101.19		

3 讨论

蒲桃茎超临界CO₂萃取物的GC-MS分析

林大都^{1,2*}, 刘嘉炜^{1#}, 李武国¹, 成金乐², 陈蔚文¹(1.广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心/岭南中药资源教育部重点实验室, 广州 510006; 2.中山市中智药业集团有限公司, 广东中山 528437)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2946-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.24

摘要 目的:分析蒲桃茎的挥发性成分。方法:采用超临界CO₂萃取技术萃取蒲桃茎,用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对萃取物进行分析:色谱柱为TG WAXMS石英毛细管(30 m×0.25 mm×0.25 μm),程序升温,进样口温度为230℃,载气为高纯氦气(99.99%),载气流速为1 ml/min,分流比为30:1,离子源温度为200℃,接口温度为230℃,电离方式为电子轰击源,电子能量为70 eV,质量扫描范围为35~659 amu。结果:共分离出36个化学组分峰,鉴定了其中22个化合物,质量分数较高的成分有棕榈酸、亚油酸、正丁烯基苯酚等。结论:该方法能有效分离和鉴定蒲桃茎超临界CO₂萃取物的挥发性成分,为其药效物质基础研究提供参考数据。

关键词 蒲桃;茎;挥发性成分;超临界CO₂萃取技术;气相色谱-质谱联用技术

Analysis of Supercritical CO₂ Fluid Extraction from the Stem of *Syzygium jambos* by GC-MS

LIN Da-du^{1,2}, LIU Jia-wei¹, LI Wu-guo¹, CHENG Jin-le², CHEN Wei-wen¹(1.Research Centre of Medicinal Plant Resource Science and Engineering, Guangzhou University of TCM/Key Lab of Lingnan TCM Resource, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 2. Zhongzhi Pharmaceutical Company Group of Zhongshan City, Guangdong Zhongshan 528437, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze the volatile oil from the stem of *Syzygium jambos*. METHODS: Supercritical CO₂ fluid extraction (SFE-CO₂) was used to extract volatile oil from the stem of *S. jambos*. The volatile oil was separated and determined by GC-MS method. The detection condition was as follows: TG WAXMS quartz capillary (30 m×0.25 mm×0.25 μm) column, by temperature programming, injector temperature of 230℃, high-purity helium (99.99%) as carrier gas, flow rate of 1 ml/min, split ratio of 30:1, ion source temperature of 200℃, interface temperature of 230℃, ionization mode: EI, electron energy of 70 eV, mass scan range of 35-659 amu. RESULTS: 36 subfractions were separated and 22 compounds were identified from the stem of *S. jambos*. The main constituents were hexadecanoic acid, linoleic acid and n-butylidenephthalide. CONCLUSIONS: The volatile oil of SFE-CO₂ fluid extraction is separated and identified effectively from the stem of *S. jambos* by GC-MS method. The results have provided reference for the study of effective components of this plant.

KEY WORDS *Syzygium jambos*; Stem; Volatile oil; SFE-CO₂; GC-MS

因熊果苷在化学结构上属于苷类化合物,极性较大,易溶于水,本试验曾选取甲醇-水(40:60, V/V)作为流动相,但出峰太快,因此选取甲醇-水(70:30, V/V)作为流动相,同时降低流速为0.8 ml/min,即可满足试验要求。

目前,文献报道的熊果苷含量测定方法有HPLC法^[5-6]、HPLC-串联质谱(MS/MS)法^[7-8]、毛细管电泳法安培法^[9],但后两种方法由于受到仪器条件的限制并不常用。本试验选用HPLC法测定熊果苷乳膏中熊果苷的含量,方法简便、准确、精密度高、重复性好。本方法的建立可为熊果苷乳膏的下一步临床药效研究提供质量保证,同时可为熊果苷制剂新剂型的研发提供一定的理论依据和实践经验。

参考文献

[1] 吴品茹,徐慧,陈向东,等.熊果苷和甘草黄酮对B16黑色素瘤细胞株黑素合成的影响[J].组织工程与重建外科杂志,2008,4(5):279.

- [2] 雷铁池,朱文元,夏明玉.甘草酸、熊果苷及氢醌对小鼠黑色素瘤细胞黑素生成影响的比较研究[J].临床皮肤科杂志,2000,29(2):69.
- [3] 王佩,赖瑛,吴锡铭.熊果苷抗炎作用的研究[J].中华中医药学刊,2008,26(9):1933.
- [4] 董钦,张春晶,周宏博,等.熊果苷拮抗H2O损伤的研究[J].哈尔滨医科大学学报,2005,8(2):241.
- [5] 林彩,刘松青,贺红军,等.复方维生素E霜中熊果苷和维生素E的含量测定[J].中国药业,2010,19(9):29.
- [6] 刘敏,王晓军,刘力,等.厚叶岩白菜组织培养再生苗中熊果苷测定[J].中成药,2013,35(4):800.
- [7] 任艳平,曹亮,常路,等.液相色谱-质谱联用法同时测定岩白菜中熊果苷等9种成分的含量[J].中国药学杂志,2013,48(6):477.
- [8] 孔祥虹,何强,乐爱山,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定浓缩苹果汁中的熊果苷[J].色谱,2010,28(6):632.
- [9] 陈赞光,张孔,莫金垣,等.毛细管电泳法安培法测定鸡矢藤中熊果苷的含量[J].分析化学,2002,30(7):866.

(收稿日期:2013-01-26 修回日期:2013-06-07)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学。电话:020-39358547。
E-mail:342139823@qq.com

通信作者:副研究员。研究方向:生物有机化学和天然药物化学。电话:020-39358547。E-mail:jiawei.liu@ymail.com