

快速溶剂萃取-HPLC法测定骨碎补中柚皮苷的含量

黄北雄*,戴柏桢(广西梧州食品药品检验所,广西梧州 543002)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3875-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.44

摘要 目的:为骨碎补中柚皮苷的提取及测定开辟新的途径。方法:采用ASE350型快速溶剂萃取系统提取骨碎补中的柚皮苷;以高效液相色谱法测定骨碎补中柚皮苷的含量。色谱柱为Kinetex XB-C₁₈,流动相为甲醇-5%乙酸(25:75, V/V),流速为0.8 ml/min,检测波长为283 nm,柱温为40℃,进样量为10 μl。结果:柚皮苷的进样量线性范围为0.073 0~0.730 0 μg($r=0.999\ 9$);定量限为0.73 μg,检测限为0.022 μg;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为98.92%~100.85%(RSD=0.72%, $n=6$)。结论:该方法简便、准确、专属性强,可用于测定骨碎补中柚皮苷的含量。

关键词 高效液相色谱法;骨碎补;柚皮苷;快速溶剂萃取

Determination of Naringin in *Davallia mariesii* by Accelerated Solvent Extraction-HPLC

HUANG Beixiong, DAI Baian (Guangxi Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Guangxi Wuzhou 543002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a new way for the extraction and determination of naringin in *Davallia mariesii*. METHODS: Naringin in *D. mariesii* was extracted by ASE350 accelerated solvent extraction system; HPLC was performed for the content determination of naringin in *D. mariesii*, the column was Kinetex XB-C₁₈ with mobile phase of methanol-5% acetic acid (25:75, V/V) at a flow rate of 0.8 ml/min, detection wavelength was 283 nm, column temperature was 40℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of naringin was 0.073 0-0.730 0 μg ($r=0.999\ 9$); the limit of quantitation was 0.73 μg, the limit of detection was 0.022 μg; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 98.92%-100.85% (RSD=0.72%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific, and can be used for the content determination of naringin in *D. Mariesii*.

KEYWORDS HPLC; *Davallia mariesii*; Naringin; Accelerated solvent extraction

骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎,气微、味淡、微涩,有疗伤止痛、补肾强骨、外用消风祛斑的功效,可用于跌扑闪挫、筋骨折伤、肾虚腰痛、筋骨痠软、耳鸣耳聋、牙齿松动、外治斑秃、白癜风等的治疗^[1]。现代药理研究也表明骨碎补具有降血脂、降低胺基糖苷类抗生素的毒性和促进骨吸收等作用^[2]。柚皮苷是骨碎补的主要有效成分之一,2015年版《中国药典》(一部)以柚皮苷作为其质量评价的指标。目前,骨碎补中柚皮苷的提取主要有煎煮法、加热回流法、索氏提取法^[3-4]、超声萃取法、微波辅助萃取法^[5-9],测定方法有高效液相色谱法(HPLC)^[9-11]和薄层-紫外分光光度法^[12-13],但是上述方法提取时间长、测定步骤烦琐。因此,笔者利用美国Dionex公司的快速溶剂萃取系统对样品进行提取,缩短提取时间、提高效率,并采用HPLC法测定骨碎补中柚皮苷的含量,以期对骨碎补中柚皮苷的提取及测定开辟新的途径。

1 材料

1.1 仪器

ASE350型快速溶剂萃取仪(美国Dionex公司);Ultimate 3000 DGLC型HPLC仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);XA205DU型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 试剂

柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:200001,纯度:94.7%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析

* 副主任药师。研究方向:食品药品检验。电话:0774-3886969。E-mail:392271494@qq.com

纯,水为超纯水。

1.3 药材

骨碎补(玉林市康华中药饮片有限公司,批号:131206;广西玉林市祥生中药饮片有限责任公司,批号:140601;玉林市华济中药饮片有限公司;批号:14070301)经广西梧州食品药品检验所叶小强药师鉴定为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kinetex XB-C₁₈(100 mm×4.6 mm, 2.6 mm);流动相:甲醇-5%乙酸(25:75, V/V);流速:0.8 ml/min;检测波长:283 nm;柱温:40℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取柚皮苷对照品适量,置于25 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含柚皮苷36.5 μg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粗粉0.1 g,按1:1的比例加入硅藻土后混匀,装于10 ml萃取池中,再用硅藻土填满萃取池,在ASE350型快速溶剂萃取仪控制面板编程进行萃取试验(萃取压力为1 700 psi,溶剂为甲醇,萃取温度为120℃,循环次数为2次,萃取时间为5 min,冲洗体积为100%)。萃取结束后,将萃取液转移至50 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可

知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以柚皮苷峰计为5 000;保留时间为5.73 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

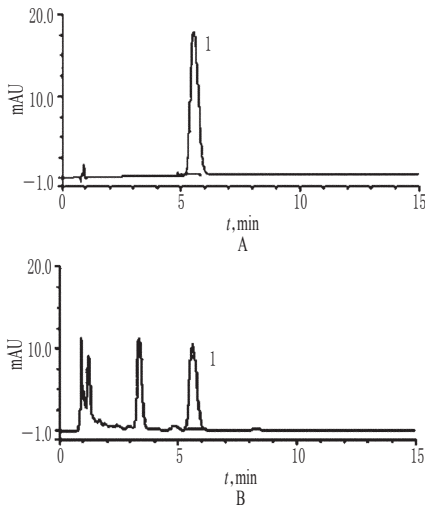


图1 高效液相色谱图

A.对对照品;B.供试品;1.柚皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

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

2.4 快速萃取条件的确定

2.4.1 静态萃取温度 平行取样品粗粉适量,共5份,按1:1的比例加入硅藻土后混匀,装于10 ml萃取池中,用硅藻土填满萃取池,参考2015年版《中国药典》(一部)“骨碎补含量测定项下”水浴的温度,分别设定提取温度为80、100、120、140、160℃进行提取,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算柚皮苷的含量。结果,120℃时柚皮苷的提取量最高,超过120℃以后柚皮苷的提取量呈递减趋势,同时色谱图中未知杂质成分增多。因此,本试验选择120℃为提取温度。

2.4.2 循环次数 平行取样品粗粉适量,共3份,按1:1的比例加入硅藻土后混匀,装于10 ml萃取池中,用硅藻土填满萃取池,分别设定循环次数为1、2、3次进行提取,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算柚皮苷的含量。结果,循环次数为2次和3次时柚皮苷的提取量最高。为节约提取时间,故本试验的循环次数选择2次。

2.4.3 静态萃取时间 平行取样品粗粉适量,共4份,按1:1的比例加入硅藻土后混匀,装于10 ml萃取池中,用硅藻土填满萃取池,分别设定静态萃取时间为3、5、7、9 min进行提取,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算柚皮苷的含量。结果,提取时间为5、7、9 min时,柚皮苷的含量最高。为节约试验时间,故本试验选择静态萃取时间为5 min。

2.4.4 冲洗体积 平行取样品粗粉适量,共6份,按1:1的比例加入硅藻土后混匀,装于10 ml萃取池中,用硅藻土填满萃取池,分别设定冲洗体积为0、40%、80%、100%、120%、150%进行提取,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算柚皮苷的含量。结果,冲洗体积为100%、120%、150%时柚皮苷的含量最高。为节约试验成本,故本试验冲洗体积选择为100%。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液0、2、5、10、15、20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得柚皮苷的回归方程为 $y=1\ 888.8x+8.980\ 5$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,柚皮苷的进样量线性范围为0.073 0~0.730 0 μg。

2.6 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得柚皮苷的定量限为0.73 μg;当信噪比为3:1时,得柚皮苷的检测限为0.022 μg。

2.7 精密度的试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,柚皮苷峰面积的RSD=0.04%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,柚皮苷峰面积的RSD=0.99%($n=7$),表明供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品(批号:131206)粗粉适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,柚皮苷峰面积的RSD=1.47%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:131206)粗粉适量,共6份,每份0.05 g,精密称定,分别精密加入一定质量的柚皮苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果详见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

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/%
0.050 1	0.282 6	0.280 1	0.560 8	99.32		
0.049 8	0.280 4	0.271 5	0.553 1	100.44		
0.049 6	0.279 2	0.290 1	0.568 6	99.76	99.81	0.72
0.049 5	0.278 6	0.279 0	0.554 6	98.92		
0.050 3	0.283 2	0.289 1	0.571 0	99.55		
0.050 7	0.285 4	0.270 6	0.558 3	100.85		

2.11 样品含量测定

取3批样品粗粉适量,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,记录峰面积并计算柚皮苷的含量,结果详见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

样品批号	平均峰面积, mAU/s	柚皮苷含量, mg/g
131206	216.0	5.63
140601	223.4	5.82
14070301	230.5	6.01

3 讨论

本试验比较了甲醇-乙酸-水(35:4:65, V/V/V)、甲醇-5%乙酸(25:75, V/V)两种不同比例的流动相,通过预试验表明,甲醇-5%乙酸(25:75, V/V)为流动相时,柚皮苷峰与相邻色谱峰的分​​离效果较好、峰型较好。故本试验选择甲醇-5%乙酸(25:75, V/V)为流动相。

综上所述,本方法简便、准确、专属性强,可用于测定骨碎补中柚皮苷的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:256.
- [2] 刘振丽, 吕爱平, 张秋海, 等. 骨碎补脂溶性成分研究[J].

HPLC法测定八角枫药材不同药用部位中L(-)-八角枫碱的含量

王其勇*,许亚玲[#](贵州省食品药品检验所,贵阳 550004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3877-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.45

摘要 目的:建立测定八角枫药材不同药用部位(茎、根茎、须根及支根)中L(-)-八角枫碱含量的方法,为八角枫药材的开发利用提供参考。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Thermo C₁₈,流动相为甲醇-磷酸缓冲液(22:78, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为259 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:L(-)-八角枫碱的进样量线性范围为0.020 62~0.257 80 μg($r=0.999\ 9$);定量限为1.7 ng,检测限为0.5 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为97.38%~98.86%(RSD=0.6%, $n=6$)。不同药用部位中L(-)-八角枫碱含量,须根>支根>根茎>茎。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好、专属性强,适用于测定八角枫药材不同药用部位(茎、根茎、须根及支根)中L(-)-八角枫碱的含量。

关键词 高效液相色谱法;八角枫;L(-)-八角枫碱;不同药用部位

Content Determination of L(-)-Anabesine in Different Medicinal Parts of *Alangium chinense* by HPLC

WANG Qiyong, XU Yaling(Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of L(-)-Anabesine in different medicinal parts (stem, rhizome, fibrous root, rootlet) of *Alangium chinense*, and provide reference for its development and utilization. METHODS: HPLC was performed on the column of Thermo C₁₈ with mobile phase of methanol-phosphate buffer solution (22:78, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 259 nm, column temperature was 30 ℃; the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of L(-)-Anabesine was 0.020 62-0.257 80 μg ($r=0.999\ 9$); the limit of quantitation was 1.7 ng, limit of detection was 0.5 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 97.38%-98.86% (RSD=0.6%, $n=6$). The content of L(-)-Anabesine in different medicinal parts was the fibrous root>the rootlet>the rhizome>the stem. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and specific, and suitable for the content determination of L(-)-Anabesine in different medicinal parts (stem, rhizome, fibrous root, rootlet) of *A. chinense*.

KEYWORDS HPLC; *Alangium chinense*; L(-)-Anabesine; Different medicinal parts

八角枫收载于2003年版《贵州省中药材及民族药材质量标准》,为八角枫科植物八角枫 *Alangium chinense* (Lour.) Harms 及瓜木 *Alangium platani folium* (Sieb. Et Zucc.) Harms 的干燥细须根(白龙须)或干燥支根(白金条)^[1],而2015年版《中国药典》未收载该药材。八角枫药材生于280~1 800 m 的山地或疏林中,喜温暖潮湿气候,分布于河南、陕西、甘肃、西

藏南部、云南、四川、湖南、湖北、广西、广东、江西、江苏、浙江、福建、台湾、贵州等省区,全年均可采挖^[2]。其在贵州全省均有分布,为贵州省少数民族用药,具有祛风通络、散瘀镇痛、麻醉及松弛肌肉等功效^[3-5],可用于治疗风湿疼痛、麻木瘫痪、心力衰竭、劳损腰痛、跌打损伤等证。其须根含生物碱(即八角枫碱),是松弛肌肉的主要活性成分,也是其毒性的主要来源^[6-8]。八角

中国中药杂志,1999,24(4):222.

[3] 张琳,杨中林.水提法与醇提法对骨碎补中总黄酮含量的影响比较[J].江苏药学与临床研究,2004,12(3):30.

[4] 伍奕,蒋晓煌,蒋孟良,等.骨碎补中柚皮苷含量测定方法的优化研究[J].湖南中医药大学学报,2010,30(3):48.

[5] 方婧,杨洪军,付梅红,等.微波协助提取在中药饮片含量测定中的应用(4):微波法与药典法测定骨碎补中柚皮苷含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):75.

[6] 高军,刘富春.正交试验优选枳实中柚皮苷的提取工艺[J].中国药房,2014,25(35):3 291.

[7] 李园园,石磊,张振巍,等.混合均匀设计结合响应面法优选枳壳六妙口服液中药材的提取工艺[J].中国药房,2013,24(39):3 685.

* 副主任药师。研究方向:药物分析。电话:0851-86807025。E-mail: qiyoo_king@sina.com

[#] 通信作者:主任药师。研究方向:药物分析。电话:0851-86808035。E-mail: 499929857@qq.com

[8] 高颖,房德敏,王巨存,等.苏氏接骨胶囊中骨碎补和菟丝子的质量控制[J].中国医院药学杂志,2010,30(4):333.

[9] 张红旭,郭辉.HPLC法测定骨碎补酊中柚皮苷含量[J].西北药学杂志,2006,21(2)63.

[10] 岳春华,李顺祥.从骨碎补中制备新北美圣草苷和柚皮苷对照品的研究[J].中草药,2008,39(4):529.

[11] 李遇伯,孟繁浩,潘晓峰,等.HPLC同时测定骨碎补药材中新北美圣草苷和柚皮苷的含量[J].药物分析杂志,2006(6):808.

[12] 吕勇均,邱宗荫.中药骨碎补提取物质量标准研究[J].中国药业,2007,16(23):26.

[13] 陈洁.薄层-紫外分光光度法测定骨碎补中柚皮苷的含量[J].中医正骨杂志,2007,19(3):76.

(收稿日期:2015-12-19 修回日期:2016-07-16)

(编辑:刘 柳)