

浊点萃取 HPLC 法测定秦皮中秦皮甲素 和秦皮乙素的含量

王晓中¹, 杨庆凤^{2*}

(1. 宁夏大学 化学化工学院, 银川 750021; 2. 宁夏大学 能源化工重点实验室, 银川 750021)

[摘要] 目的:建立浊点萃取高效液相色谱法测定秦皮中秦皮甲素和秦皮乙素含量的方法。方法:选择以表面活性剂 Genapol X-080 作为萃取剂,考察了表面活性剂浓度、液固比、盐浓度、平衡温度、平衡时间等因素对萃取结果的影响。结果:获得最佳萃取条件为 Genapol X-080 的质量浓度为 $0.18 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,液固比定为 100:1,盐浓度 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,平衡温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$,平衡时间 35 min。结论:浊点萃取是一种安全、高效、简便的样品处理方法。在最佳条件下,秦皮甲素和秦皮乙素的加样回收率分别为 95.3%,96.0%,RSD 分别为 2.3%,2.1%。利用此方法成功测定了秦皮中秦皮甲素和秦皮乙素的含量。

[关键词] 浊点萃取;秦皮;高效液相色谱;含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0052-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180052

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150807.1001.020.html>

[网络出版时间] 2015-08-07 10:01

Determination of Esculin and Esculetin in Cortex Fraxini by Cloud Point Extraction Coupled with HPLC

WANG Xiao-zhong¹, YANG Qing-feng^{2*} (1. School of Chemistry & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Key Laboratory of Energy & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

[Abstract] **Objective:** A new method was developed for the determination of esculin and esculetin in Cortex Fraxini by cloud point extraction coupled with HPLC. **Method:** The surfactant Genapol X-080 was chosen as the extract solvent. Some affecting factors such as the concentration of surfactant, liquid/solid ratio, the concentration of sodium chloride, equilibration temperature and equilibration time were investigated and optimized. **Result:** The optimum conditions were achieved of $0.18 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ surfactant concentration, 100:1 liquid/solid ratio, $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium chloride concentration for 35 min under $60 \text{ }^\circ\text{C}$. **Conclusion:** This methodology offers the advantages of safety, efficiency and easiness. Under the optimum conditions, the average recoveries of esculin and esculetin were 95.3%, 96.0% and RSD were 2.3%, 2.1%. The method was successfully applied to determine esculin and esculetin in Cortex Fraxini respectively.

[Key words] cloud point extraction; Cortex Fraxini; HPLC; determination

秦皮为常用中药材,主要功能为清热、止痢、明目、养肝。秦皮甲素和秦皮乙素是秦皮中的两种主要成分,秦皮甲素具有抗炎、抗菌、镇痛等活性,秦皮乙素具有抗菌、平喘的作用。《中国药典》中更是以这两种成分的含量作为评价秦皮的依据。但秦皮中成分众多,且这两种成分不溶于水,故在提取过程中

使用了有毒有机溶剂,造成对环境和人身体的损害^[1]。浊点萃取技术(cloud point extraction, CPE)是近年来发展起来的一种新型的液-液萃取技术,它使用的不是有机溶剂,而是选择合适的表面活性剂,通过改变实验条件(如添加剂、温度等)引发相分离从而分离亲水物质与疏水物质,已广泛应用于复杂

[收稿日期] 20141113(011)

[基金项目] 宁夏自然科学基金项目(NZ12135)

[第一作者] 王晓中,硕士,讲师,从事分析新方法研究, Tel:0951-2062861, E-mail: xiaoyer8028@163.com

[通讯作者] *杨庆凤,博士,副教授,从事新材料的研究及应用, Tel:0951-2062861, E-mail: qfyang@nxu.edu.cn

样品体系中痕量金属^[2-4]、生物样品^[5-6]、中药成分^[7-8]的分离富集,并取得了很好的效果。与常规萃取方法相比,浊点萃取法具有安全、低毒、高效、简便等特点,可以减少对环境的污染。本实验采用非离子型表面活性剂 Genapol X-080 浊点萃取秦皮中的秦皮甲素和秦皮乙素,并用高效液相色谱法测定秦皮中两种物质的含量,结果令人满意。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), BS224 型电子天平(德国赛多利斯公司),秦皮甲素(批号 110740-200104),秦皮乙素(批号 110741-200506)对照品购自中国食品药品检定研究院;表面活性剂 Genapol X-080 (C₁₃E₈) (美国西格玛公司),甲醇、乙腈(色谱纯,美国西格玛公司),磷酸等其他试剂均为分析纯,水为二蒸去离子水。

本实验所用秦皮采自陕西省西安市,经宁夏大学化学化工学院尤卫副教授鉴定为尖叶白蜡树 *Fraxinus szaboana* 的树皮。

2 方法与结果

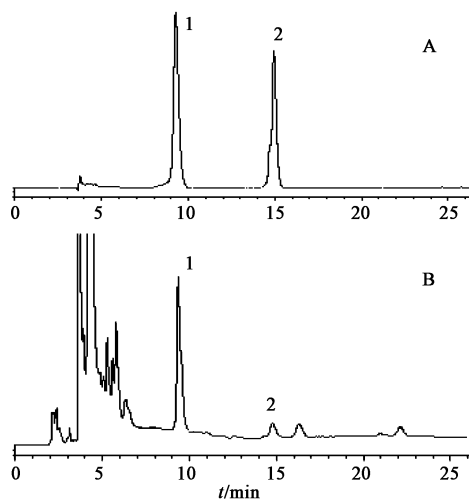
2.1 浊点萃取 秦皮用粉碎机粉碎,过 60 目筛备用。准确称取秦皮粉末 0.2 g,置于 25 mL 离心管中,加入 0.18 g·mL⁻¹ 的 Genapol X-080 水溶液 20 mL,超声提取 30 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,加入适量 NaCl 溶液,置 60 °C 恒温水浴中 35 min 至溶液分层,再 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃去下层水相,上层黏稠表面活性剂相用甲醇 1 mL 稀释,过 0.45 μm 滤膜,备用。

2.2 对照品储备溶液 精密称取秦皮甲素和秦皮乙素各 2.0 mg 置 10 mL 量瓶中加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。于冰箱 4 °C 以下保存。

2.3 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(10:90),柱温 30 °C,检测波长 334 nm,流速 1 mL·min⁻¹。见图 1。

2.4 液-固萃取阶段影响因素考察

2.4.1 表面活性剂的选择 在浊点萃取方法的研究中,常用的表面活性剂主要有 Triton X-114^[5], Triton X-100^[9], PONPE-7.5^[10] 等。但这些表面活性剂结构均有苯环,在 330 nm 处有一定吸收,而 Genapol X-080 疏水基为十三烷基,在 210 nm 以上无吸收。同时 Genapol X-080 的浊点(42 °C)较低,浊点出现比较容易,目前已有学者成功利用 Genapol X-080 浊点萃取测定了蛇床子中的蛇床子素和欧前胡素^[7],故选择 Genapol X-080 作为萃取表面活性剂。



1. 秦皮甲素;2. 秦皮乙素;A. 对照品;B. 供试品

图1 秦皮的 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of Cortex Fraxini

2.4.2 Genapol X-080 浓度对萃取结果的影响 表面活性剂的质量浓度会影响到富集效率,实验考察了加入萃取剂 20 mL,置 60 °C 恒温水浴中 35 min 时,Genapol X-080 浓度对萃取秦皮甲素和秦皮乙素的影响见图 2,当表面活性剂的质量浓度达到 0.18 g·mL⁻¹ 时,萃取的两种物质的含量已基本达到最高,后面随着表面活性剂浓度的增加,对萃取结果没有很大影响,但会导致分层后的表面活性剂相过于黏稠,不利操作。故 Genapol X-080 的质量浓度选为 0.18 g·mL⁻¹。

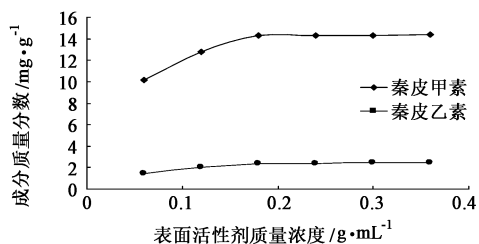


图2 Genapol X-080 浓度对萃取结果的影响

Fig.2 Effect of concentration of Genapol X-080 on extraction efficiency

2.4.3 液固比对萃取结果的影响 表面活性剂用量与被萃取物秦皮的液固比(V/m)会影响萃取结果,实验考察了加入不同体积 0.18 g·mL⁻¹ 的 Genapol X-080 水溶液,置 60 °C 恒温水浴中 35 min 时,萃取结果,见图 3。当液固比在 100:1 附近时萃取效果已基本达到最好,后面随着液固比增加,对萃取结果影响不大,考虑到实际成本,所以液固比定为 100:1。

2.5 液-液萃取阶段影响因素考察

2.5.1 盐浓度对萃取率的影响 添加适量惰性盐

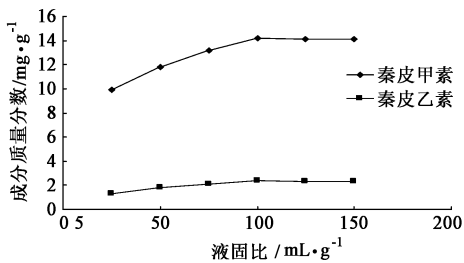


图 3 液固比对萃取结果的影响

Fig. 3 Effect of liquid/solid ratio on extraction efficiency

可以加快表面活性剂相与水相分离的速度,缩短分离时间,而且可以降低萃取物在水相中的溶解度,提高萃取率^[11]。实验考察了加入 $0.15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Genapol X-080 水溶液 20 mL,置 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中 35 min,不同 NaCl 浓度对萃取率的影响。结果表明,当 NaCl 浓度达到 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,萃取率最高。

2.5.2 平衡温度和平衡时间对萃取率的影响 只有当平衡温度高于表面活性剂的浊点温度,溶液才会分为两相。通常理论最佳平衡温度为高于表面活性剂的浊点温度 $15 \sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[12],Genapol X-080 的浊点温度为 $42 \text{ }^\circ\text{C}$,实验考察了加入 $0.18 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Genapol X-080 水溶液 20 mL,置 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中 35 min,NaCl 浓度达到 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,平衡温度在 $55 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ 萃取率最高,与理论值相符,故选择平衡温度为 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 。固定平衡温度为 $60 \text{ }^\circ\text{C}$,盐浓度为 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,根据不同平衡时间测定秦皮甲素和秦皮乙素的萃取率,结果表明,当平衡时间在 $30 \sim 40 \text{ min}$ 萃取率最高,故选择平衡时间 35 min。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系 精密移取秦皮甲素和秦皮乙素的混合对照品溶液适量,以甲醇定容于 10 mL 量瓶中,配制成质量浓度分别为 $0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。分别取上述溶液各 $20 \text{ } \mu\text{L}$,平行进样 3 次,取平均值。结果表明,在 $0.2 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,秦皮甲素和秦皮乙素的浓度 ($X, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与峰面积 (Y) 呈现良好的线性关系。回归方程分别为 $Y = 38.945X + 18.044 (r = 0.999 2)$, $Y = 64.555X - 14.816 (r = 0.999 3)$ 。

2.6.2 精密度试验 按最优条件制备同一批样品的供试品溶液,连续进样 6 次,每次进样 $20 \text{ } \mu\text{L}$,测定秦皮甲素和秦皮乙素的峰面积。计算秦皮甲素和秦皮乙素峰面积的 RSD 分别为 2.5% , 1.9% 。

2.6.3 稳定性试验 供试品溶液在 $0 \sim 12 \text{ h}$ 内每隔 2 h 进样 $20 \text{ } \mu\text{L}$,测定峰面积,计算样品中秦皮甲素和秦皮乙素峰面积的 RSD 分别为 2.5% , 2.8% 。

结果表明在 12 h 内供试品溶液稳定。

2.6.4 重复性试验 取同一批样品 6 份按最优条件制得 6 份供试品溶液,分别取上述溶液各 $20 \text{ } \mu\text{L}$,进高效液相色谱仪测定秦皮甲素和秦皮乙素的峰面积。计算秦皮甲素和秦皮乙素峰面积的 RSD 分别为 2.2% , 2.6% 。

2.6.5 加样回收率试验 取已知含量(其中秦皮甲素 $14.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,秦皮乙素 $2.46 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的秦皮粉末 3 份 ($n = 2$),每份 0.2 g ,加入秦皮甲素和秦皮乙素对照品适量,按 2.1 项所述的方法操作,制得 3 份供试品溶液,每次进样 $20 \text{ } \mu\text{L}$,测定峰面积,计算秦皮甲素和秦皮乙素的加样回收率。结果见表 1。

表 1 秦皮甲素和秦皮乙素加样回收率试验 ($n = 2$)

Table 1 Results of recovery test of Cortex Fraxini ($n = 2$)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
秦皮甲素	2.96	2.80	5.61	94.6	95.3	2.3
	2.94	2.80	5.68	97.8		
	2.97	2.80	5.59	93.6		
秦皮乙素	0.48	0.50	0.95	94.0	96.0	2.1
	0.48	0.50	0.97	98.0		
	0.49	0.50	0.97	96.0		

2.7 样品测定 按最优实验条件制备秦皮供试品溶液及按文献报道的传统方法^[13]制备供试品溶液,与对照品溶液分别进高效液相检测,外标法计算秦皮中秦皮甲素和秦皮乙素的含量。结果见表 2。

表 2 秦皮中秦皮甲素和秦皮乙素的含量测定

Table 2 Results of quantitative determination of Cortex Fraxini

成分	浊点萃取法 /mg·g ⁻¹	RSD /%	传统方法 /mg·g ⁻¹	RSD /%
秦皮甲素	14.46	2.6	14.82	1.8
秦皮乙素	2.39	2.2	2.46	2.4

3 讨论

浊点萃取是一种新型的双水相萃取方法,大致可以分为两步。第一步是将分析物溶解于水相中,第二步是利用表面活性剂特有的浊点现象实现富集和分离。因其在处理样品过程中很少使用有机溶剂,与传统方法相比较具有低成本、易处理、高效率等优点,越来越受到人们的重视。本文利用非离子型表面活性剂 Genapol X-080 浊点萃取秦皮中的秦皮甲素和秦皮乙素并利用 HPLC 测定含量,取得了

满意结果。与常规提取方法相比较,可以减少有机溶剂的使用,具有安全、方便、环保的特点,同时可以为应用浊点萃取法富集分离其他复杂性痕量成分提供参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:254.

[2] 朱霞石, 朱小红, 封克, 等. 浊点萃取-石墨炉原子吸收光谱法测定环境样品中的痕量镉[J]. 分析化学, 2006, 34(7):951-954.

[3] 李静, 梁沛, 施踏青. 浊点萃取预富集火焰原子吸收光谱法测定水样中痕量钴[J]. 分析科学学报, 2005, 21(2):164-166.

[4] Chen J R, Xiao S M, Wu X H, et al. Determination of lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after cloud point extraction[J]. Talanta, 2005, 67(5):992-996.

[5] Zhou J, Chen J, Cheng Y, et al. Determination of prometryne in water and soil by HPLC-UV using cloud-point extraction[J]. Talanta, 2009, 9(2):189.

[6] Kukusamude C, Santalad A, Boonchiangma S, et al. Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography [J]. Talanta, 2010, 81(1/2):486-492.

[7] Zhou J, Sun X L, Si W W. Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and

imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2008, 1200(2):93-99.

[8] Shi Z H, He J T, Chang W B. Micelle-mediated extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge* with analysis by high performance liquid chromatography [J]. Talanta, 2004, 64(2):401-407.

[9] Revia R L, Makharadze G A. Cloud-point preconcentration of fulvic and humic acids [J]. Talanta, 1999, 48(2):409-413.

[10] Casero I, Sicilia D, Rubio S, Perez-Bendito D. An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds[J]. Anal Chem, 1999, 71(20):4519-4526.

[11] Mahugo Santana C, Sosa Ferrera Z, Santana Rodriguez J J. Use of non-ionic surfactant solutions for the extraction and preconcentration of phenolic compounds in water prior to their HPLC-UV detection [J]. Analyst, 2002, 127(8):1031-1037.

[12] Raymond P Frankewich, Willie L Hinze. Evaluation and optimization of the factors affecting nonionic surfactant-mediated phase separations [J]. Anal Chem, 1994, 66(7):944-954.

[13] 刘丽梅, 李曼玲, 冯伟红, 等. HPLC法测定秦皮中香豆素类成分的含量[J]. 中草药, 2004, 35(7):819-822.

[责任编辑 顾雪竹]