HPLC 测定匙羹藤花中牛弥菜醇 A 的含量

丘琴,甄汉深*,黄培倩,李文秀
(广西中医药大学,南宁 530001)

[摘要] **目的**:对匙羹藤花中的有效成分牛弥菜醇 A 的含量测定进行研究,为科学评价其质量提供科学依据。**方法**:采用正交实验优选匙羹藤花样品溶液的制备方法,同时采用高效液相色谱法(HPLC)测定牛弥菜醇 A 的含量,以氨基柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)为色谱柱,乙腈-水(90:10)为流动相,流速 1.0 mL·min^{-1},检测波长 207 nm,柱温:30 ℃。**结果**:匙羹藤花样品溶液的最佳制备方法为 150 倍 50% 甲醇超声提取 50 min,牛弥菜醇 A 在 0.400 4 ~ 20.02 μg 与峰面积成良好的线性关系(r=0.999 7),平均回收率为 98.98%,RSD 1.15%(n=6)。**结论**:采用 HPLC 建立的方法准确、快速、灵敏度高、重复性好,可作为匙羹藤花的质量控制方法。

[关键词] 匙羹藤;牛弥菜醇 A;高效液相色谱法;含量测定
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)06-0155-04

Determination of Conduriol A in the Flower of *Gymnema sylvestre*

*QIU Qin, ZHEN Han-shen**, *HUANG Pei-qian, LI Wen-xiu*
(*Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning* 530001, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the determination of conduritol A in the flower of *Gymnema sylvestre*. **Method**: The best extraction technology for conduritol A was studied through orthogonal experiment; HPLC was adopted to determine the content of conduritol A. The separation was performed on a Thermo NH_2 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm); acetonitrile: water (90:10) was used as mobile phase; the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}; the detection wave was set at 207 nm and the column temperature was kept at 30 ℃. **Result**: The best extraction technology of conduritol A was ultrasonic extraction in 50% methanol of 150 times for 50 min. The liner range of conduritol A was 0.400 4-20.02 μg (r=0.999 7); the average recovery rate was 98.98%, RSD was 1.15% (n=6). **Conclusion**: The method was accurate, quick, sensitive with good reproducibility, it could be used as the quality control method of the flower of *Gymnema sylvestre*.

[**Key words**] *Gymnema sylvestre*; conduritol A; HPLC; content determination

匙羹藤来源于萝藦科匙羹藤属植物 *Gymnema sylvestre*(Retz.) schult,又名羊角藤、金刚藤、武靴藤[1-3],为广西常用的传统民间用药,在我国广西分布广泛,其他南方省区、亚洲热带地区以及南非亦有分布[4]。匙羹藤,其性平,味苦,全株均可药用,具有消肿解毒、清热凉血、止痛、生肌等功效,常用于治疗脓肿、乳腺炎、痈疮肿毒、枪弹伤、杀虱等疾病[1]。牛弥菜醇 A 为匙羹藤降血糖的有效成分[5],研究发现匙羹藤不同药用部分中牛弥菜醇 A 的含量相差较大[6-8],目前对匙羹藤花的研究未见有报道。为进一步研究匙羹藤花中牛弥菜醇 A 的含量,比较匙羹藤不同药用部位有效成分牛弥菜醇 A 的含量,本实验采用正交实验优选匙羹藤花中牛弥菜醇 A 的提取工艺,同时采用 HPLC 对匙羹藤花中的牛弥菜醇 A 进行含量测定,为建立匙羹藤花质量控制方法

[收稿日期] 20121101(588)
[基金项目] 广西研究生教育创新计划项目(2008106001007M09);广西教育厅科研项目(桂教科 2001);广西中医学院重点科研项目(ZD2004010);广西自然科学基金项目(桂科自 0229044)
[第一作者] 丘琴,博士,从事药学和中药学的教学和科研,Tel:0771-3124407,E-mail:12031983@163.com
[通讯作者] *甄汉深,教授,博士生导师,从事药学和中药学的教学和科研,Tel:0771-2918239,E-mail:8zhen@163.com

提供实验数据,为扩大匙羹藤的药用部位提供科学依据。

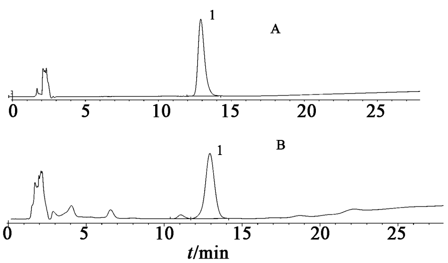
1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦),在线真空脱气机(G-1322A),标准自动进样器(G-1313A),高压四元梯度泵(G-1131A),可变波长检测器(G-1314A),智能化柱温箱(G-1316A),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯),KQ-200VDB 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Millipore Simlicity-185 型超纯水器(美国密里博公司)。

1.2 试药 匙羹藤花分别采于广西南宁安吉郊区、隆安、扶妥、邕宁、武鸣、钦州,经广西一心药业副主任药师马利飞鉴定为萝藦科匙羹藤属植物匙羹藤 *Gymnema sylvestre*(Retz.)Schult 的花;牛弥菜醇 A 对照品(自制,纯度 >98%);甲醇、乙腈(天津市四友生物医学技术有限公司,色谱纯),水为高纯水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为氨基柱(汉邦公司,4.6 mm ×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(90∶10),流速 1.0 mL·min^{-1},检测波长 207 nm,进样量 10 μL,柱温 30 ℃。在此色谱条件下,样品在与对照品相应的保留时间出现相同的色谱峰,且分离度良好,见图 1。



1. 牛弥菜醇 A

图 1 牛弥菜醇 A 对照品(A),匙羹藤花供试品(B)HPLC

2.2 供试品溶液制备方法的考察

2.2.1 提取溶剂的选择 取匙羹藤花 0.5 g,精密称定,分别加入 50 mL 甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇,超声提取 50 min,按照 **2.1** 项下的色谱条件测定,结果显示乙醇提取的含量较低,甲醇、50% 甲醇和 50% 乙醇提取的含量较高,但 50% 乙醇提取的样品黏度大,较难过滤,色谱峰的对称性较差,不如甲醇和 50% 甲醇作为溶剂提取的效率高,鉴于甲醇较 50% 甲醇成本高,毒性也较大,因此,选择 50% 甲醇作为提取溶剂。

2.2.2 提取方法的选择 取匙羹藤花 0.5 g,精密称定,用 50% 甲醇作为提取溶剂,分别考察索氏提取法、回流提取法、超声提取法,按照 **2.1** 项下的色谱条件测定,结果显示:超声提取法提取牛弥菜醇 A 的含量较高,且提取时间短,操作简便,故选超声提取法作为牛弥菜醇 A 的提取方法。

2.2.3 正交实验优选牛弥菜醇 A 提取工艺 根据单因素考察的结果,采用正交实验考察甲醇的浓度(*A*)、超声时间(*B*)、溶剂用量(*C*)3 个因素对牛弥菜醇 A 含量的影响,直观分析表明:各因素对牛弥菜醇 A 含量的影响的主次顺序依次为 $A>B>C$,方差分析结果表明因素 *A*,*B*,*C* 对牛弥菜醇 A 含量的影响均有显著性差异。其中 $A_2B_2C_3$(150 倍 50% 甲醇超声提取 50 min)提取工艺提取的牛弥菜醇 A 含量最高,综合考虑,选择 $A_2B_2C_3$(150 倍 50% 甲醇超声提取 50 min)为匙羹藤花中牛弥菜醇 A 的最佳提取工艺。正交实验设计与结果,见表 1 ~3。

表 1 因素水平表

水平	*A* 甲醇浓度/%	*B* 超声时间/min	*C* 溶剂用量/倍
1	40	40	50
2	50	50	100
3	60	60	150

表 2 正交实验设计与结果

实验号	*A* 甲醇浓度/%	*B* 超声时间/min	*C* 溶剂用量/倍	*D* 空白	牛弥菜醇 A /mg·g^{-1}
1	1	1	1	1	46.09
2	1	2	2	2	48.96
3	1	3	3	3	53.35
4	2	1	2	3	54.93
5	2	2	3	1	58.87
6	2	3	1	2	57.05
7	3	1	3	2	50.18
8	3	2	1	3	49.89
9	3	3	2	1	52.17
均值 1	49.470	50.4	51.008	52.375	
均值 2	56.9497	52.577	52.027	52.067	
均值 3	50.746 7	54.188	54.130	52.723	
极差	7.479	3.788	3.122	0.656	

2.2.4 正交实验验证 按优选出的提取工艺进行重复性实验 3 次,结果表明该提取工艺稳定可行,结果样品平均含量 58.61 mg·g^{-1},RSD 0.57%。

表 3 牛弥菜醇 *A* 提取工艺正交方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	$F_{0.05(2,2)}$临界值	显著性
A	96.031	2	148.655	19	<0.05
B	21.689	2	33.574	19	<0.05
C	15.209	2	23.543	19	<0.05
D	0.646	2	1.000	19	
误差	0.65	2			

2.3 供试品溶液的制备 取匙羹藤花粗粉 0.5 g,精密称定,加 50% 甲醇 75 mL,称定质量,超声提取 50 min,放冷,用 50% 甲醇补足损失质量,滤过,取续滤液,过微孔滤膜(0.45 μm)作为供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备 取牛弥菜醇 A 对照品适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成浓度为 1.001 $g\cdot L^{-1}$ 的牛弥菜醇 A 对照品溶液。

2.5 线性关系的考察 分别精密吸取 **2.4** 项下牛弥菜醇 A 对照品溶液 0.1,0.5,1,2.5,5 mL 置 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得 1~5 号对照品溶液。分别取上述 5 个不同浓度的对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,按 **2.1** 项下的色谱条件测定峰面积。以对照品溶液进样量(Y)为纵坐标,峰面积(X)为横坐标,绘制标准工作曲线,牛弥菜醇 A 回归方程式为 $Y=0.002\,8X-0.090\,5$($r=0.999\,7$),结果表明牛弥菜醇 A 在进样量为 0.400 4~20.02 μg 成良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取 0.200 2 $g\cdot L^{-1}$ 的对照品溶液 20 μL,按 **2.1** 项下的色谱条件测定,重复进样 5 次,记录峰面积,RSD 0.30%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,12,24 h 进样分析,记录峰面积,RSD 0.58%,表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.8 重复性试验 取同一样品 6 份,分别按 **2.3** 项下供试品溶液的制备方法制备,按 **2.1** 项下的色谱条件测定,计算牛弥菜醇 A 含量,牛弥菜醇 A 的平均含量为 59.52 $mg\cdot g^{-1}$,RSD 1.7%,表明方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的匙羹藤花粗粉 0.25 g,精密称定,分别精密加入一定量的牛弥菜醇 A,按 **2.3** 项下供试品溶液的制备方法处理,按 **2.1** 项下的色谱条件测定,计算回收率,平均回收率为 98.98%,RSD 1.15%($n=6$),结果见表 4。

表 4 加样回收率试验($n=6$)

编号	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	14.83	15.15	29.76	98.55	98.98	1.15
2	14.50	14.39	28.61	98.02		
3	14.29	14.39	28.40	98.03		
4	14.41	15.15	29.65	100.60		
5	13.37	13.64	27.03	100.23		
6	13.01	14.39	27.18	98.47		

2.10 样品含量测定 采集不同地点(安吉郊区、隆安、扶妥、邕宁、武鸣、钦州)的匙羹藤花,分别取匙羹藤花粗粉 6 份,按 **2.3** 项下供试品溶液制备方法制备,按 **2.1** 项下的色谱条件测定,结果见表 5。

表 5 匙羹藤花含量测定结果($n=3$)

产地				含量/$mg\cdot g^{-1}$
安吉郊区	59.67	59.93	59.15	59.58±0.397 2
隆安	58.11	58.02	58.19	58.11±0.085
扶绥	56.09	56.18	56.13	56.13±0.045 1
邕宁	52.17	52.08	52.16	52.14±0.049 3
武鸣	56.27	56.31	56.21	56.26±0.050 3
钦州	48.09	48.05	48.11	48.08±0.030 6

3 讨论

通过全波长扫描得到牛弥菜醇 A 在 207 nm 有最大吸收,故选择 207 nm 为测定波长;曾采用乙腈-水和甲醇-水流动相系统,结果表明甲醇-水作为流动相,甲醇在 207 nm 有末端吸收,干扰牛弥菜醇 A 的含量测定,以乙腈-水(90∶10)作为流动相,无溶剂干扰,分离效果好,适于牛弥菜醇 A 的含量测定。

通过测定不同产地匙羹藤花中牛弥菜醇 A 的含量,发现不同产地的匙羹藤花中牛弥菜醇 A 的含量相差不大,含量较高的为安吉郊区和隆安产的匙羹藤花,含量较低的为钦州产的匙羹藤花;与前期对匙羹藤和匙羹藤叶中牛弥菜醇 A 含量测定的研究对比,匙羹藤中牛弥菜醇 A 平均含量为 21 $mg\cdot g^{-1}$[7],叶中牛弥菜醇 A 平均含量为 43 $mg\cdot g^{-1}$[6],表明匙羹藤花中牛弥菜醇 A 含量较匙羹藤和匙羹藤叶中牛弥菜醇 A 的含量高。本实验所建立的方法准确、快速、灵敏度高、重复性好,为匙羹藤花中牛弥菜醇 A 的含量测定提供了可靠的检测手段,为扩大匙羹藤的药用部位提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海人民出版社,1977:2461.

探索用离子色谱测法定玄明粉中硫酸钠的含量

甘盛[1], 韩婷[2], 施晓光[1*], 吴超权[1]
(1. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021;
2. 河北联合大学基础医学院药理教研室, 河北 唐山 053009)

[**摘要**] **目的:**探索玄明粉中硫酸钠含量离子色谱法的测定条件并与《中国药典》一部所载含量测定法比较。**方法:**采用 DIONEX ICS-3000 离子色谱仪、IonPac® ASII-HC 分离柱和 35 mmol·L^{-1} NaOH 作为淋洗液, 流速 1.0 mL·min^{-1}, 进样量 40 μL, 选用 DIONEX ASRS® 300 4-mm 抑制器、电导检测器测定玄明粉样品中硫酸钠含量。**结果:**在 1.053 ~ 105.300 mg·L^{-1}, 硫酸钠浓度呈良好的线性(R^2 = 0.999 7), 平均回收率为 98.39%, RSD 0.26%。**结论:**方法灵敏准确、可操作性强, 比药典记载的玄明粉含量测定法简便、稳定, 为药用玄明粉的质量控制提供了另一种迅速实用的检测方法。

[**关键词**] 玄明粉; 硫酸钠; 中药材; 离子色谱; 含量测定; 方法比较
[**中图分类号**] R284.1 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1005-9903(2013)06-0158-03

Study on Determination of Sodium Sulfate Content in Natrii Sulfas Exsiccatus by Ion Chromatography

GAN Sheng[1], *HAN Ting*[2], *SHI Xiao-guang*[1*], *WU Chao-quan*[1]
(1. *Guangxi Institute for Food and Drug Control*, *Nanning* 530021, *China*;
2. *Ditactic and Research Room*, *Basic Medical College*, *Hebei United University*, *Tangshan* 053009, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the condition of determination of sodium sulfate content in Natrii Sulfas Exsiccatus samples by ion chromatography and make a comparison with the assay method described in Ch. P, volume I. **Method**: The DIONEX ICS-3000 ion chromatograph was adapted and equipped with IonPacRRASII-HC analytical column, eluted by 35 mmol·L^{-1} of NaOH solution at a flux of 1.0 mL·min^{-1}. Each injection volume was 40 μL, using DIONEX ASRS® 300 4-mm suppressor, connected to the conductive detector to assay the content of sodium sulfate in Natrii Sulfas Exsiccatus samples. **Result**: In the interval between 1.053 and 105.300 mg·L^{-1}, the concentration of sodium sulfate was in good linearity at R^2 of 0.999 7. The mean recovery was

[**收稿日期**] 20111230(005)
[**第一作者**] 甘盛, 博士, 主管药师, 从事食品药品检验及质量安全研究, Tel: 15994436944, E-mail: gansheng@hotmail.com
[**通讯作者**] * 施晓光, 硕士, 主管药师, 从事食品药品检验及质量安全研究, Tel: 13517681047, E-mail: shixiaoguang2007@126.com

[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 573.
[3] 广西壮族自治区中医药研究所. 广西药用植物名录[M]. 南宁: 广西人民出版社, 1986: 376.
[4] 黄泰康, 丁志遵, 等. 现代本草纲目(上卷)[M]. 北京: 中国医药出版社, 2001: 1437.
[5] 韦建华, 甄汉深, 丘琴, 等. 匙羹藤有效成分牛弥菜醇 A 降血糖作用研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(24): 2961.
[6] 丘琴, 甄汉深, 黄小秋, 等. HPLC 测定广西产匙羹藤叶中牛弥菜醇 A 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 136.
[7] 丘琴, 甄汉深, 肖聪, 等. 薄层扫描法测定广西匙羹藤中牛弥菜醇 A 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 54.
[8] 卢汝梅, 曹敏, 韦建华, 等. 匙羹藤中牛弥菜醇 A 提取工艺研究[J]. 中药材, 2009, 32(5): 807.

[责任编辑 顾雪竹]