

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

方婧¹, 杨洪军¹, 付梅红^{1*}, 张贝贝¹, 张梦阳², 杨雪燕²,
张康丁³, 王祝举¹, 杨岚¹, 张东¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016;
3. 邢台医学高等专科学校, 河北 邢台 054000)

[摘要] 目的: 建立微波协助提取法提取骨碎补中有效成分柚皮苷含量测定方法, 比较微波协助提取法与药典法提取柚皮苷优势。方法: 采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-醋酸-水(35:4:65), 检测波长 283 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 微波提取时间 5 min, 提取温度 120 °C, 提取溶剂 50% 甲醇。柚皮苷在 0.04 ~ 0.6 μg 呈良好线性关系, $r = 0.9999$ 。平均回收率 99.51% ($n = 6$)。结论: 微波提取法较药典法提取柚皮苷更简便快速、结果准确, 为一种符合环保绿色理念的含量测定方法, 可用于检测骨碎补饮片中有有效成分柚皮苷含量。

[关键词] 微波提取; 骨碎补; 柚皮苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)06-0075-03

Determination of Microwave-assisted Extraction of Chinese Cut Crude Drugs (4) Comparison of Determination of Naringin from *Drynaria fortunei* between Microwave-assisted Extraction and Chinese Pharmacopeia Method

FANG Jing¹, YANG Hong-jun¹, FU Mei-hong^{1*}, ZHANG Bei-bei¹, ZHANG Meng-yang²,
YANG Xue-yan², ZHANG Kang-ding³, WANG Zhu-ju¹, YANG Lan¹, ZHANG Dong¹
(1. Institute of Chinses Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine,
Beijing 100700, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
3. Xingtai Medical College, Xingtai 054000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a microwave-assisted extraction method for the extraction of the naringin from *Drynaria fortunei*. and compare of the determination of naringin from *D. fortunei* between microwave-assisted extraction and Chinese pharmacopeia method. **Method:** Dikma Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol-acetic acid-water (35:4:65). The temperature of column was mainted at 30 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was at 283 nm. **Result:** Microwave extractive time was 5 min, the temperature was 120 °C, the extraction solvent was 50% methanol. The calibration curve was in good linearity with in the range from 0.04 to 0.6 μg ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.51% ($n = 6$). **Conclusion:** The method is simple, rapid, as well as precise and

[收稿日期] 20110510(010)

[基金项目] 中药生产技术及过程控制技术标准平台项目;“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09308-003);国家科技支撑计划子课题(2006BAI09B07-02)

[第一作者] 方婧, 技师, 从事中药化学成分与质量评价研究, Tel: 010-64062692

[通讯作者] * 付梅红, 研究员, 从事中药化学与质量评价研究, Tel: 010-64062692

reliable, and can be used for the determination of naringin from *D. fortunei*.

[Key words] microwave-assisted extraction; *Drynaria fortunei*; naringin; determination

骨碎补为水龙骨科植物槲蕨的干燥根茎。其功能主治为疗伤止痛、补肾强骨,外用消风祛斑,用于跌扑闪挫、筋骨折伤、肾虚腰痛、筋骨痿软、耳鸣耳聋、牙齿松动,外治斑秃、白癜风^[1]。《中国药典》(2010 年版一部)骨碎补项下,供试品溶液的制备方法为取骨碎补粉末,加甲醇加热回流 3 h。微波辅助提取中药成分是一项新技术,在中药活性成分多糖、黄酮、挥发油、生物碱、苷类物质以及醇类物质的提取中均有应用^[2]。柚皮苷具有提高成骨细胞株 MC3T3-E1 增值能力^[3],提高人牙周韧带细胞的增殖能力及成骨分化的潜能^[4],可抑制高糖诱导的血管炎症^[5]。我们在完成骨碎补饮片中有效成分柚皮苷微波提取方法学基础上,建立了柚皮苷微波提取含量测定法,并对购自同仁堂、湖北骨碎补饮片的微波提取法与药典法提取柚皮苷的含量进行了比较。

1 仪器与试剂

微波消解仪购自上海新仪微波化学科技有限公司(型号 MDS-6),岛津高效液相色谱仪(LC-20A),柚皮苷购自中国药品生物制品检定所(批号 110722-200610),甲醇为色谱纯(Fisher),乙腈为色谱纯(Fisher),水为重蒸馏水。

骨碎补饮片购自同仁堂、湖北,采购日期 2010 年 9 月—12 月,经本所何希荣鉴定为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei*(Kunze)J. Sm. 的干燥根茎。

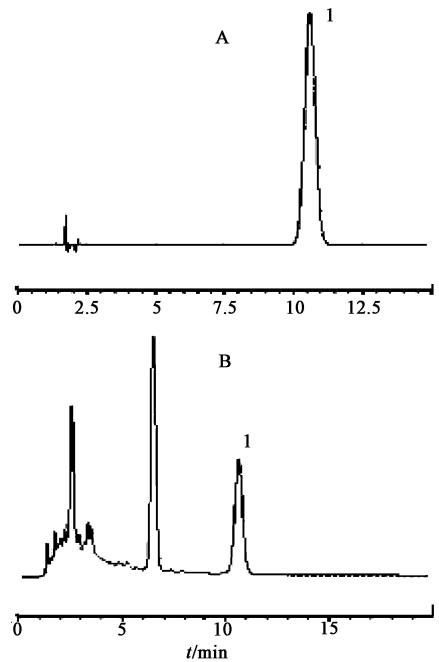
2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取骨碎补饮片样品,粉碎(过 40 目筛),精密称定约 0.16 g,置微波提取罐中,精密加入 50% 甲醇 20 mL,称定质量,微波协助提取 120 ℃,保温 5 min,取出,冷却至室温,再称定质量,用 50% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液的制备 取柚皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 40 μg 的溶液,摇匀,即得。

2.3 色谱条件 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-醋酸-水(35:4:65),检测波长 283 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL · min⁻¹,见图 1。

2.4 检测限及定量限 取对照品储备液逐级稀释后,按 2.3 色谱条件进行测定。按 3 倍信噪比计算



A. 对照品; B. 供试品; 1. 柚皮苷

图 1 骨碎补饮片 HPLC

(S/N = 3)柚皮苷的检测限为 4.5 ng,按 10 倍信噪比计算(S/N = 10)柚皮苷的定量限为 15.1 ng。

2.5 线性关系考察 精密称取柚皮苷对照品适量,分别配成质量浓度为 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.4, 0.6 g · L⁻¹ 的对照品溶液,按 2.3 色谱条件进行测定,得回归方程为 $Y = 1\ 764\ 982.653X - 248.874\ 7$ ($r = 0.999\ 9$),表明柚皮苷在 0.04 ~ 0.6 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度考察 精密吸取同一对照品溶液 10 μL,在 2.3 色谱条件下进行测定,测得柚皮苷峰面积 RSD 0.17% ($n = 6$),表明精密度良好。

2.7 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,分别间隔 0, 2, 4, 6, 8, 24 h,在 2.3 色谱条件下进行测定,测得柚皮苷峰面积 RSD 0.32%,表明在 24 h 内样品稳定性良好。

2.8 重复性考察 取同一批次本品粉末(过 60 目筛)6 份,精密称定,分别按 2.1 供试品溶液的制备项下制备,分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按 2.3 色谱条件进行测定并计算柚皮苷含量, RSD 3.34% ($n = 6$),表明此法重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的骨碎补饮片粉末约 0.08 g,精密称定 6 份,分别精密

加入约 0.16 mg 的柚皮苷对照品,再按 2.1 供试品溶液的制备项下制备,按 2.3 色谱条件进行测定,测得平均回收率 99.51% ($n=6$),RSD 2.67%,结果见表 1。

表 1 柚皮苷加样回收率测定

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.080 2	0.174 8	0.16	0.329 2	96.48	99.51	2.67
0.080 5	0.175 5	0.16	0.336 8	100.82		
0.080 4	0.175 3	0.16	0.338 9	102.27		
0.080 2	0.174 8	0.16	0.338 2	102.10		
0.080 3	0.175 1	0.16	0.333 5	99.03		
0.078 0	0.170 0	0.16	0.324 2	96.35		

2.10 样品测定 取购自同仁堂、湖北的骨碎补样品,按 2.1 供试品溶液的制备项下制备,按 2.3 色谱条件进行测定,计算柚皮苷的含量,见表 2。

表 2 微波法药典法提取骨碎补中柚皮苷的含量($n=2$)

样品来源	微波法	药典法
同仁堂	0.22	0.18
湖北	0.41	0.38

2.11 微波提取法与药典法测定骨碎补中柚皮苷含量的比较 分别取购自同仁堂、湖北的骨碎补样品(粉碎过 40 目筛)0.25 g,精密称定,置锥形瓶中,加甲醇 30 mL,加热回流 3 h,放冷,滤过,滤液置 50 mL 量瓶中,用少量甲醇分数次洗涤容器,洗液滤入同一量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。按 2.3 色谱条件进行测定,计算柚皮苷的含量,结果见表 2。

从测定结果可知,微波提取法所用提取时间由药典法提取时间 3 h 缩短为 5 min,大幅度缩短了提取时间,微波法比药典法提取时间缩短了 97.2%。

3 讨论

作者考察了以 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、30% 乙醇、70% 乙醇、乙醇为提取溶剂提取骨碎补饮片,测定柚皮苷含量,测得 50% 甲醇提取率最高,因此选定提取溶剂为 50% 甲醇。

作者考察了 80,100,120 ℃ 的不同微波提取温度提取骨碎补饮片,测定柚皮苷含量,测得在提取温

度为 120 ℃ 时提取率最高,因此选定微波提取温度为 120 ℃。

考察了加热至 120 ℃ 后分别保温 0,5,10,15,20 min 的不同保温时间,测定柚皮苷含量,测得在保温 5 min 后已提取完全,因此选定保温时间为 5 min。

我们采集了来源为同仁堂、湖北、四川、广西、西安、江苏江阴、浙江磐安、广东、内蒙的 9 批饮片,经鉴定只有来源为同仁堂、湖北、成都为药典规定品种,同时对 9 批饮片进行含量测定,结果显示除了来源为同仁堂和湖北的饮片中含有柚皮苷外,其余均不含柚皮苷。

骨碎补目前市场上品种较为混乱,槲蕨全属共 16 种,有文献报道槲蕨含有柚皮苷,团叶槲蕨和栎叶槲蕨仅含少量,其余未检测出^[6]。

我们用建立的微波提取方法与药典法分别测定骨碎补饮片中柚皮苷的含量。结果显示,微波提取法较药典提取法提取柚皮苷提取率高,而微波提取所用时间只有 5 min,大幅度缩短了提取时间,结果表明微波提取可用于骨碎补饮片中柚皮苷的含量测定。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:239.
- [2] 韩宇萍,宓穗卿.微波萃取技术在中药成分提取中的应用[J].中药新药与临床药理,2003,14(6):430.
- [3] 唐琪,王维倩,王仁飞.柚皮苷对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖功能的影响[J].浙江中医药大学学报,2010,34(2):171.
- [4] 胡其勇,陈莉丽,王仁飞.骨碎补柚皮苷对人牙周韧带细胞增殖和成骨分化潜能的影响[J].浙江大学学报,2010,39(1):79.
- [5] 熊莺,王广发,张俊艳.柚皮苷抑制高糖诱导的脐静脉内皮细胞与单核细胞的粘附作用[J].南方医科大学学报,2010,30(2):321.
- [6] 杨斌,陈功锡,蒋道松,等.国产槲蕨属药用植物研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(1):1.

[责任编辑 蔡仲德]