

微波协助提取在中药饮片含量测定中的应用(3) ——微波法与药典法测定土茯苓中落新妇苷含量比较

方婧¹, 付梅红^{1*}, 杨洪军¹, 张贝贝¹, 王祝举¹, 杨岚¹, 杨雪燕², 张梦阳², 张康丁³, 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土茯苓中有效成分落新妇苷含量测定方法, 比较微波协助提取法与药典法提取落新妇苷优势。方法: 采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液(39:61), 检测波长 291 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 微波提取时间 10 min, 提取温度 60 °C, 提取溶剂 60% 乙醇。落新妇苷在 0.04 ~ 0.8 μg 呈良好线性关系($r=0.9999$)。平均回收率 99.80% ($n=6$)。结论: 微波提取法较药典法提取落新妇苷更简便快速、结果准确, 为一种符合环保绿色理念的含量测定方法, 可用于检测土茯苓饮片中有有效成分落新妇苷含量。

[关键词] 微波提取; 土茯苓; 落新妇苷; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0043-03

Determination of Microwave-assisted Extraction of Chinese Cut Crude Drugs (3) Comparison of Determination of Astilbin from *Smilax glabra* between Microwave-assisted Extraction and Chinese Pharmacopeia Method

FANG Jing¹, FU Mei-hong^{1*}, YANG Hong-jun¹, ZHANG Bei-bei¹, WANG Zhu-ju¹,
YANG Lan¹, YANG Xue-yan², ZHANG Meng-yang², ZHANG Kang-ding³, 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 astilbin from *Smilax glabra*. Comparison of the determination of astilbin from *Smilax glabra* 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 of methanol-0.1% acetic acid-water (39:61). The temperature of column was 30 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was at 291 nm. **Result:** Microwave extractive time was 10 min, the temperature was 60 °C, the extraction solvent was 60% ethanol. The calibration curve was in good linearity with in the range from 0.04 to 0.8 μg ($r=0.9999$). The average recovery was 99.80% ($n=6$). **Conclusion:** The method is simple, rapid, as well as precise and reliable, and can be used for the determination of astilbin from *Smilax glabra*.

[Key words] microwave-assisted extraction; *Smilax glabra*; astilbin; determination

[收稿日期] 20110510(009)

[基金项目] “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

土茯苓为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根茎。其功能主治为解毒、除湿、通利关节,用于梅毒及汞中毒所致的肢体拘挛,筋骨疼痛、湿热淋浊、带下、痈肿、瘰疬、疥癣^[1]。落新妇苷具有利尿、镇痛作用^[2],落新妇苷干预能减轻小鼠肝脏热缺血再灌注损伤后的炎症反应,有效改善肝功能和肝脏病理损害^[3]。由于微波协助萃取可以对体系中的一种或几种组分进行选择性的加热,故可以使目标组分直接从基体分离,与传统的萃取方法相比具有选择性好、萃取速度快、产品质量好、过程简洁的特点^[4]。目前尚无微波用于土茯苓有效成分含量测定的文献报道。我们在完成土茯苓饮片中有有效成分落新妇苷微波提取方法学基础上,建立了落新妇苷微波提取含量测定法,并对产地广东、太原、内蒙、重庆、江苏 5 个不同产地土茯苓饮片的微波提取法与药典法提取落新妇苷的含量进行了比较。

1 仪器与试剂

MDS-6 型微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司),LC-20A 型岛津高效液相色谱仪,落新妇苷购自南京泽朗医药科技有限公司(纯度 $\geq 99.8\%$),甲醇为色谱纯(Fisher),乙腈为色谱纯(Fisher),水为重蒸馏水。

土茯苓饮片购自广东、太原、内蒙、重庆、江苏,采购日期 2010 年 9 月~12 月,经本所何希荣鉴定为百合科植物光叶菝葜 *S. glabra* 的干燥根茎。

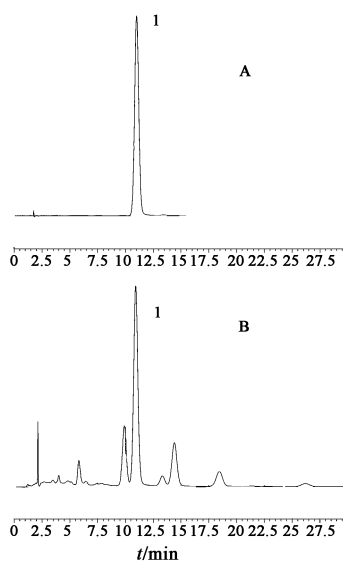
2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取土茯苓饮片样品,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 60% 乙醇 20 mL,称定质量,微波协助萃取 60 °C,保温 10 min,取出,冷却至室温,再称定质量,用 60% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液的制备 取落新妇苷对照品适量,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 \times 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 冰醋酸水溶液(39:61),检测波长 291 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL \cdot 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 倍信噪比计算落新妇苷的检测限为 8.8 ng,按 10 倍信噪比计算落



A. 对照品; B. 供试品; 1. 落新妇苷
图 1 土茯苓饮片 HPLC

新妇苷的定量限为 29.3 ng。

2.5 线性关系考察 精密称取落新妇苷对照品适量,分别配成 0.04, 0.08, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 g \cdot L⁻¹ 的对照品溶液,按 2.3 色谱条件进行测定,得回归方程 $Y = 2867626.582X - 11670.982$ ($r = 0.9999$),表明落新妇苷在 0.04 ~ 0.8 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,测得落新妇苷峰面积 RSD 为 0.18% ($n = 6$),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, 12, 24 h,在 2.3 色谱条件下进行测定,测得落新妇苷峰面积 RSD 为 0.34%,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落新妇苷含量, RSD 为 1.62% ($n = 6$),表明此法重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的土茯苓饮片粉末约 0.08 g,精密称定 6 份,分别精密加入约 0.6 mg 的落新妇苷对照品,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,测得平均回收率为 99.80% ($n = 6$), RSD 2.83%,结果见表 1。

表1 土茯苓中落新妇苷加样回收率试验

称样量	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
/g	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
0.080 4	0.598 8	0.59	1.173 8	97.47		
0.081 5	0.607 5	0.60	1.226 9	103.24		
0.077 0	0.573 8	0.58	1.151 1	99.53	99.80	2.83
0.080 0	0.595 9	0.61	1.226 6	103.39		
0.080 1	0.596 4	0.60	1.182 3	97.64		
0.080 0	0.595 9	0.60	1.181 2	97.55		

2.10 样品测定 取购自广东、太原、内蒙、重庆、江苏的土茯苓样品,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,计算落新妇苷的含量,见表2。

表2 药典法与微波法提取土茯苓中落新妇苷的比较 %

样品来源	落新妇苷(n=2)	
	药典法	微波法
广东	0.624	0.745
太原	0.330	0.372
内蒙	0.343	0.367
重庆	0.015	0.019
江苏	1.019	1.036

3 微波提取法与药典法测定土茯苓中落新妇苷含量的比较

分别取购自广东、太原、内蒙、重庆、江苏的土茯苓样品,按《中国药典》(2010年版一部)土茯苓项下供试品溶液制备,按2.3色谱条件进行测定,计算落新妇苷的含量,结果见表2。

从测定结果可知,微波提取法比药典中提取法大幅度缩短了提取时间,由加热回流1 h缩短为微

波提取10 min,微波法比药典法时间缩短了83.3%。

4 讨论

考察了以30%甲醇、60%甲醇、90%甲醇、60%乙醇、90%乙醇为提取溶剂提取土茯苓饮片,测定落新妇苷含量,测得60%乙醇提取率最高,因此选定提取溶剂为60%乙醇。

考察了60,80,100,120℃的不同微波提取温度提取土茯苓饮片,测定落新妇苷含量,测得在提取温度为60℃时已提取完全,因此选定微波提取温度为60℃。

考察了加热至60℃后分别保温0,5,10,15,20 min的不同保温时间,测定落新妇苷含量,测得在保温10 min后已提取完全,因此选定保温时间为10 min。

在测定中,我们收集了5个不同产地土茯苓饮片,含量测定结果显示,只有2个产地的样品中落新妇苷符合药典不得低于0.45%含量要求。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:17
- [2] 张英,俞卓裕,吴晓琴.中草药和天然植物有效成分提取新技术——微波协助萃取[J].中国中药杂志,2004,29(2):104.
- [3] 张白嘉,刘亚欧,刘榴,等.土茯苓及落新妇苷抗炎、镇痛、利尿作用研究[J].中药药理与临床,2004,20(1):11.
- [4] 慕宁,王海梁,傅宏,等.落新妇苷通过促进IL-10表达保护小鼠缺血再灌注损伤肝脏[J].第二军医大学学报,2008,29(12):1429.

[责任编辑 蔡仲德]