

对照提取物法测定女贞子饮片中4种成分的含量^Δ

陶 益*,张 畅,李伟东,陆兔林,蔡宝昌[#](南京中医药大学中药炮制重点实验室,南京 210046)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4685-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.27

摘要 目的:建立对照提取物法测定女贞子饮片中4种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为XBridge C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:新女贞苷、毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷检测质量浓度线性范围分别为0.037~0.598、0.006~0.101、0.189~3.023、0.314~5.027 mg(r 均 \geq 0.999 0);精密度、重复性、稳定性试验的RSD \leq 3.80%;加样回收率分别为98.46%~104.83%(RSD=2.43)、95.55%~104.57%(RSD=3.63)、100.09%~104.39%(RSD=1.45)、98.84%~104.97%(RSD=2.02), n 均为6。对照提取物法与单一对照品测定法所得结果差异无统计学意义($P>$ 0.05)。结论:该方法操作简便、重复性好,可用于女贞子饮片中4种成分含量的测定。

关键词 女贞子;对照提取物法;高效液相色谱法

Content Determination of 4 Ingredients in *Ligustrum lucidum* Decoration Piece by Reference Extract Method

TAO Yi, ZHANG Chang, LI Wei-dong, LU Tu-lin, CAI Bao-chang (Key Laboratory Traditional Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of 4 ingredients in *Ligustrum lucidum* decoration piece by reference extract method. METHODS: HPLC was performed on the column of XBridge C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 30 ℃ and volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.037-0.598 mg for neoneuzhenide, 0.006-0.101 mg for acetoside, 0.189-3.023 mg for neuzhenide and 0.314-5.027 mg for specneuzhenide ($r \geq 0.999 0$); RSDs of precision, reproducibility and stability tests were no more than 3.8%; recoveries were 98.46%-104.83% (RSD=2.43, $n=6$), 95.55%-104.57% (RSD=3.63, $n=6$), 100.09%-104.39% (RSD=1.45, $n=6$) and 98.84%-104.97% (RSD=2.02, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, good reproducibility, and can be used for the contents determination of 4 ingredients in *L. lucidum* decoration piece.

KEYWORDS *Ligustrum lucidum*; Reference extract method; HPLC

张咯血的疗效分析[J].实用心脑血管病杂志,2012,20(8):1311.

[37] 李战炜.垂体后叶素联合酚妥拉明治疗支气管扩张咯血36例疗效观察[J].中国医学创新,2012,9(3):108.

[38] 李强,徐晓飞,范洪峰.酚妥拉明联合垂体后叶素治疗支气管扩张咯血的疗效观察[J].中华全科医学,2012,10(5):721.

[39] 李珏,郭毅,郑勇,等.62例支气管扩张合并大咯血的治疗探讨[J].医药前沿,2012,25:188.

[40] 张虹.60例酚妥拉明联合垂体后叶素治疗支气管扩张咯血的临床研究[J].中国医药指南,2011,9(22):277.

[41] 马国珍,韦利菊,陈济明,等.支气管扩张大咯血病人应用不同止血药效果观察及护理对策[J].中外健康文摘,2011,8(10):326.

[42] 王同福.支气管扩张大咯血的疗效观察[J].中国现代药物应用,2010,4(6):66.

[43] 田礼义,鲍造清,赫为.垂体后叶素联合酚妥拉明治疗支气管扩张咯血疗效观察[J].职业与健康,2008,24(21):2351.

[44] 林强.垂体后叶素与酚妥拉明联合治疗支气管扩张咯血30例临床观察[J].中国实用医药,2009,36(3):169.

[45] 江红,蒋艳秋.垂体后叶素联合酚妥拉明治疗支气管扩张咯血疗效观察[J].中国基层医药,2008,15(7):1210.

[46] 陈济明,李志莹,刘红光,等.垂体后叶素联合酚妥拉明治疗支气管扩张大咯血[J].长春中医药大学学报,2008,24(5):545.

[47] 李文国.垂体后叶素联合酚妥拉明治疗支气管扩张咯血疗效观察[J].广西医科大学学报,2007,24(1):131.

[48] 李光虎,马丕勇.垂体后叶素持续静滴联合酚妥拉明治疗支气管扩张咯血[J].中国社区医师,2003,19(11):42.

[49] 张会敏.酚妥拉明联合小剂量垂体后叶素治疗支气管扩张咯血21例[J].右江医学,2002,30(4):340.

Δ 基金项目:国家科技重大专项(No.2012ZX09304005);江苏省自然科学基金青年项目(No.BK20140963)
* 助理研究员。研究方向:中药质量控制。E-mail: taoyi1985812@126.com
[#] 通信作者:教授。研究方向:中药炮制学。E-mail: bccai@126.com

对照提取物是一类非单体成分对照品,其主成分比例及含量相对固定,特别适用于单体成分不稳定和组分明确但单体对照品不易获得成分的测定。虽然2010年版《中国药典》中已经提出了对照提取物的概念,并收录了16个对照提取物^[1],但是其标准和规范尚不清楚。近年来,对照提取物在中药含量测定与质量控制中的规范化应用报道逐渐增加,如薛翠娟等^[2]探讨了葛根对照提取物法作为质量控制参照物的可行性。范永春等^[3]采用对照品外标法测定了女贞子中木犀草素和芹菜素的含量;李元圆等^[4]使用多个对照品外标法测定了红景天苷和女贞子苷在台湾市售女贞子中的含量。

女贞子为扶正固本的常用中药,为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,主产于湖南、四川、江苏和浙江等地。本课题组首次自制了女贞子对照提取物,并标定了女贞子4个成分的含量,将其应用于12批女贞子饮片的含量测定中。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪,包括紫外-可见光二级管阵列检测器(美国Agilent公司);BT25S型电子天平(德国Sartorius公司);As3120型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

女贞子对照提取物为本课题组自制,经对照品线性回归法^[5]测得新女贞苷、毛蕊花糖苷、特女贞苷、女贞苷的质量分数分别为5.98%、1.01%、50.27%、30.23%,合计87.49%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 药材

12批女贞子饮片来自不同产地(见表1),经南京中医药大学中药炮制重点实验室蔡宝昌教授鉴定为真品。

表1 12批女贞子饮片来源

Tab 1 Source of *L. lucidum* decoration piece

No.	品种	产地	批次
1	酒女贞子	四川成都	140106
2	酒女贞子	福建漳州	140401
3	酒女贞子	江苏南通	140102
4	酒女贞子	安徽肥西	140306
5	酒女贞子	四川内江	131223
6	酒女贞子	浙江长兴	140728
7	酒女贞子	四川成都	141019
8	女贞子	江苏宿迁	140312
9	女贞子	浙江金华	130501
10	女贞子	安徽亳州	141001
11	女贞子	四川内江	141206
12	女贞子	安徽亳州	141002

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Xbridge C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱(0~10 min, 10% A; 10~15 min, 20% A; 15~30 min, 20% A; 30 min, 45% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。在上述色谱条件下, 理论板数均不少于4 000, 分离度均大于1.5, 各成分基线分离良好, 详见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照提取物溶液 取女贞子对照提取物约10 mg, 精密称定, 加水1 ml, 超声(功率: 500 W, 频率: 40 kHz, 下同)处理

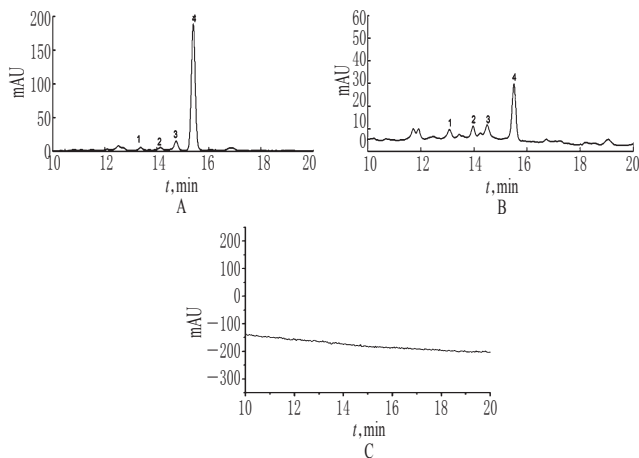


图1 高效液相色谱图

A.对照提取物; B.供试品; C.阴性对照; 1.新女贞苷; 2.毛蕊花糖苷; 3.女贞苷; 4.特女贞苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference extract; B. test sample; C. negative control; 1. neoneuzhenide; 2. acteoside; 3. nuezhenide; 4. specnuezhenide

15 min, 取上清液, 即得质量浓度为9.65 g/L的女贞子对照提取物溶液, 其中新女贞苷、毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷质量浓度分别为598、101、3 023、5 027 mg/L。

2.2.2 供试品溶液 取女贞子饮片5 g, 精密称定, 加水150 ml, 回流提取2 h, 滤过, 取滤液置蒸发皿中挥干溶剂, 精密称取干燥物粉末10 mg, 加水1 ml使溶解, 超声处理10 min, 以半径为5.94 cm、14 000 r/min离心15 min, 取上清液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 以水作为阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密称取女贞子对照提取物10 mg, 加水1 ml, 超声处理15 min, 冷却, 以半径为5.94 cm、14 000 r/min离心15 min, 取上清液, 分别稀释2、4、8、16倍, 制成系列对照提取物溶液。精密吸取上述系列对照提取物溶液各10 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/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得新女贞苷、毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷的回归方程分别为 $y = 1\ 265.1x - 10.146$ ($r = 0.999\ 6$)、 $y = 10\ 389x - 17.708$ ($r = 0.999\ 8$)、 $y = 953.99x - 0.541\ 7$ ($r = 0.999\ 7$)、 $y = 5\ 046.8x + 843.43$ ($r = 0.999\ 0$), n 均为6。结果表明, 新女贞苷、毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷检测进样量线性范围分别为0.037~0.598、0.006~0.101、0.189~3.023、0.314~5.027 mg。

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下对照提取物溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 新女贞苷、毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷峰面积的RSD分别为1.68%、1.36%、0.96%、1.21% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(No.1)适量, 分别于放置0、2、4、8、12、24 h时进样测定, 记录峰面积。结果, 新女贞苷、毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷峰面积的RSD分别为1.20%、1.36%、0.97%、1.47% ($n = 6$), 表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(No.1)适量, 按“2.2.2”项下方法制

备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,新女贞苷、毛蕊花糖苷、女贞苷、特女贞苷峰面积的RSD分别为1.00%、0.69%、0.64%、3.80%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取样品(No.1)适量,共6份,分别加一定量的对照提取物,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,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果
Tab 2 Results of recovery tests

待测成分	称样量,mg	样品含量,mg	对照提取物加入量,mg	折算对照品加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	加样回收率平均值,%	RSD,%
新女贞苷	9.78	0.041 85	0.60	0.036	0.079 59	104.83	99.97	2.43
	10.48	0.044 78	0.61	0.036	0.080 33	98.75		
	10.72	0.044 86	0.60	0.036	0.080 66	99.44		
	10.13	0.042 38	0.62	0.037	0.078 81	98.46		
	10.60	0.044 17	0.61	0.036	0.079 69	98.67		
	10.37	0.043 35	0.63	0.038	0.081 22	99.66		
毛蕊花糖苷	9.78	0.007 781	0.60	0.006	0.013 800	100.33	99.37	3.63
	10.48	0.007 825	0.61	0.006	0.013 620	96.57		
	10.72	0.007 894	0.60	0.006	0.013 630	95.55		
	10.13	0.007 797	0.62	0.006	0.013 940	102.38		
	10.60	0.007 850	0.61	0.006	0.013 660	96.83		
	10.37	0.007 816	0.63	0.006	0.014 090	104.57		
特女贞苷	9.78	0.219 0	0.60	0.302	0.524 8	101.26	101.86	1.45
	10.48	0.246 1	0.61	0.307	0.557 4	101.40		
	10.72	0.256 4	0.60	0.302	0.565 7	102.42		
	10.13	0.233 4	0.62	0.312	0.559 1	104.39		
	10.60	0.251 1	0.61	0.307	0.563 1	101.63		
	10.37	0.242 6	0.63	0.317	0.559 9	100.09		
女贞苷	9.78	0.196 2	0.60	0.181	0.378 1	100.50	101.60	2.02
	10.48	0.210 7	0.61	0.184	0.397 7	101.63		
	10.72	0.215 6	0.60	0.181	0.405 6	104.97		
	10.13	0.203 4	0.62	0.187	0.394 3	102.09		
	10.60	0.213 6	0.61	0.184	0.400 5	101.58		
	10.37	0.208 7	0.63	0.190	0.396 5	98.84		

2.8 样品含量测定

取12批样品各适量,分别按“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,计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$,mg/L)

Tab 3 Results of contents determination of samples($n=3$,mg/L)

No.	新女贞苷	毛蕊花糖苷	特女贞苷	女贞苷
1	1.25	0.05	0.14	2.91
2	0.70	0.08	0.42	1.19
3	0.65	0.07	0.55	1.39
4	0.68	0.07	1.17	3.10
5	0.68	0.14	4.27	2.80
6	0.41	0.08	2.46	1.72
7	0.60	0.11	3.86	2.41
8	0.85	0.09	0.24	5.03
9	0.42	0.08	2.23	2.01
10	0.63	0.11	2.00	1.40
11	0.50	0.13	6.42	1.86
12	0.79	0.06	2.96	1.64

3 讨论

笔者所测女贞子饮片中的4个成分中,新女贞苷和毛蕊花糖苷的对照品供应极少且售价很高,采用女贞子对照提取物可解决对照品不易获得的问题,同时简化了试验操作步骤。从研究结果可看出,对照提取物法优势明显:对照提取物属于

混合标准品,成分间比例与药材实际含量比例接近;不稳定单体成分在混合物中稳定性得以提高,减少了单一对照品的使用;价格低廉,便于大量制备,能够节约研究成本^[5]。

本研究结果证明该方法操作简便、重复性好,可用于女贞子饮片中4种成分含量的测定。并在一定程度上说明对照提取物法适用于中药的含量测定与质量控制,在以多成分质量控制为趋势的大环境下,对照提取物法有更大的发展空间。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:363.
- [2] 薛翠娟,章军,荆文光,等.对照提取物法测定葛根饮片中5种成分含量[J].中国中药杂志,2012,37(16):2388.
- [3] 范永春,徐小燕,杨元勋.HPLC法同时测定女贞子中木犀草素和芹菜素的含量[J].中国药房,2013,24(39):3702.
- [4] 李元圆,何玉铃,张永勋.HPLC法同时测定台湾市售女贞子中红景天苷、女贞子苷的含量[J].药物分析杂志,2013,33(2):230.
- [5] 戚志华,王四旺,王剑波.高效液相色谱法测定陕西境内不同产地、不同生长期女贞子中2组分的含量[J].中国药房,2007,18(6):455.

(收稿日期:2015-05-15 修回日期:2015-07-18)

(编辑:张 静)