

HPLC法测定硫磺熏蒸与未熏蒸北沙参中5种香豆素类成分的含量[△]

牛 韬*(山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3836-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.33

摘要 目的:建立测定硫磺熏蒸与未熏蒸北沙参中5种香豆素类成分含量的方法,考察硫磺熏蒸对北沙参中香豆素类成分的影响。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为295 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素的质量浓度分别在0.121 5~12.15、0.389~38.9、0.055~5.5、0.070 5~7.05、0.092 5~9.25 μg/L范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r \geq 0.999 7$);精密密度试验的RSD<1.0%,重复性、稳定性试验的RSD<3.0%;加样回收率为98.01%~101.97%,RSD<3.0%($n=6$)。结论:硫磺熏蒸后北沙参中香豆素类成分含量明显减少。该方法简单、准确,可用于硫磺熏蒸与未熏蒸北沙参的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;硫磺熏蒸;北沙参;香豆素;含量测定

Contents Determination of 5 Coumarins in Sulphur-fumigated and No Sulphur-fumigated *Glehnia littoralis* by HPLC

NIU Tao(Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of 5 coumarins in sulphur-fumigated and no sulphur-fumigated *Glehnia littoralis*, and investigate the effect of sulphur fumigation on the coumarins in *G. littoralis*. METHODS: HPLC was performed on the column of Hypersil ODS C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 295 nm, column temperature was 30 ℃, and the volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 0.121 5-12.15 μg/L for psoralen, 0.389-38.9 μg/L for xanthotoxin, 0.055-5.5 μg/L for bergapten, 0.070 5-7.05 μg/L for imperatorin and 0.092 5-9.25 μg/L for isoimperatorin ($r \geq 0.999 7$); RSD of precision test was lower than 1.0, RSDs of reproducibility and stability tests were lower than 3.0; recovery was 98.01%-101.97% (RSD<3.0%, $n=6$). CONCLUSIONS: The content of coumarins in *G. littoralis* was obviously decreased after sulphur fumigation. the method is simple and accurate, and can be used for the quality control of sulphur-fumigated and no sulphur-fumigated *G. littoralis*.

KEYWORDS HPLC; Sulphur fumigation; *Glehnia littoralis*; Coumarins; Content determination

北沙参为伞形科植物珊瑚菜 *Glehnia littoralis* 的干燥根,具有养阴清肺、益胃生津之功效。常用于肺热燥咳,劳嗽痰血,胃阴不足,热病津伤,咽干口渴^[1]。作为药材的一种传统养护方法,硫磺熏蒸在中药材及饮片的加工、贮藏中应用普遍。硫磺熏蒸可导致中药材中二氧化硫(SO₂)、砷、汞等重金属残留超标^[2],有效成分损失和改变^[3],药材毒性增加^[4],还直接影响了患者的用药安全和疗效。为此,国家采取各项措施限制硫磺熏蒸在中药材及饮片加工过程中的使用,并将SO₂检测方法列入2010年版《中国药典》附录中。在本研究中笔者拟用高效液相色谱(HPLC)法测定硫磺熏蒸与未熏蒸北沙参药材中补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素5种香豆素类成分的含量,探讨硫磺熏蒸对北沙参有效成分的影响。

1 材料

2996型HPLC仪,包括2996二极管检测器(美国Waters公司);AE200型电子天平(上海台衡仪器仪表有限公司);AB135-S型电子分析天平、KQ3200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

[△] 基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(No.2013-085)

* 主管中药师。研究方向:中药质量控制。E-mail:sdjn1208@163.com

补骨脂素对照品(批号:110739-201115)、欧前胡素对照品(批号:110826-201214)、异欧前胡素对照品(批号:110827-201109)均购于中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;花椒毒素对照品(批号:20130324)、佛手柑内酯对照品(批号:20121027)均购于武汉天植生物技术有限公司,纯度均>98%;甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸、甲醇为分析纯,水为纯净水。

北沙参采自山东烟台莱阳胡城村、河北安国明官店乡霍庄村、山东烟台海阳小纪镇、山东威海文登昆嵛镇,经山东中医药大学药学院李峰教授鉴定为真品,部分不熏蒸,部分由笔者自行熏蒸;硫磺熏蒸北沙参饮片购自安徽亳州中药材市场(批号:131001)、河北安国中药材市场(批号:131017)、山东海阳中药材市场(批号:130619)、山东烟台三联中药材市场(批号:130611)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~18 min, 24%→50% A; 18~25 min, 50%→64% A; 25~33 min, 64%→72% A; 33~40 min, 72% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:295 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取补骨脂素对照品 2.43 mg、花椒毒素对照品 7.78 mg、佛手柑内酯对照品 1.10 mg、欧前胡素对照品 1.41 mg、异欧前胡素对照品 1.85 mg,置于同一 100 ml 量瓶中,加入 75% 乙醇溶解并定容,制得补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素质量浓度分别为 24.3、77.8、11.0、14.1、18.5 $\mu\text{g/L}$ 的混合对照品贮备液;精密量取上述贮备液适量,加入 75% 乙醇溶解,制得补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素质量浓度分别为 12.2、38.9、5.5、7.1、9.3 $\mu\text{g/L}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 分别取硫磺熏蒸与未熏蒸北沙参粉末(过 4 号筛)各约 2 g,分别置于 50 ml 量瓶中,加入 75% 甲醇 20 ml,超声(功率:500 W,频率:40 kHz)提取 30 min,放冷,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。结果表明,各成分分离效果良好,理论板数以补骨脂素峰面积计均大于 3 000。

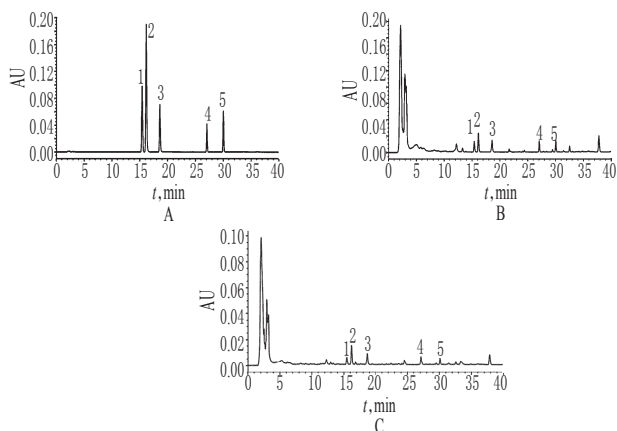


图 1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.硫磺未熏蒸北沙参供试品;C.硫磺熏蒸北沙参供试品;1.补骨脂素;2.花椒毒素;3.佛手柑内酯;4.欧前胡素;5.异欧前胡素

Fig 1 HPLC Chromatograms

A.mixed reference;B.test samples of *G. littoralis* with no sulphur fumigation; C.test samples of *G. littoralis* with sulphur fumigation; 1.psalen; 2.xanthotoxin; 3.bergapten; 4.imperatorin; 5.isoimperatorin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,采用逐级稀释法依次制得稀释倍数为 1、2、4、10、20、40、100 的系列质量浓度混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度($x, \mu\text{g/L}$)为横坐标、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素的回归方程分别为 $y=99\ 911x-8\ 180.1$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=59\ 343x-147\ 36$ ($r=0.999\ 9$)、 $y=150\ 000x-4\ 441.9$ ($r=0.999\ 7$)、 $y=54\ 709x-2\ 222.2$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=65\ 659x-3\ 567.2$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素的质量浓度分别在 0.121 5~12.15、0.389~38.9、0.055~5.5、0.070 5~7.05、0.092 5~9.25 $\mu\text{g/L}$ 范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果,补骨脂素、花椒毒

素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的 RSD 分别为 0.12%、0.08%、0.65%、0.70%、0.38% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取硫磺熏蒸北沙参(批号:131001)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的 RSD 分别为 0.69%、2.61%、0.96%、2.78%、2.15% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取硫磺熏蒸北沙参(批号:131001)适量,共 6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、异欧前胡素峰面积的 RSD 分别为 0.91%、0.96%、1.08%、2.82%、2.73% ($n=6$),表明本方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精密称定已知含量的硫磺熏蒸北沙参(批号:131001)粉末(过 4 号筛)6 份,每份 1 g,分别加入一定量的混合对照品溶液,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,计算加样回收率。结果,补骨脂素加样回收率为 98.55%~99.54%,RSD 为 0.71% ($n=6$);花椒毒素加样回收率为 98.44%~101.29%,RSD 为 1.72% ($n=6$);佛手柑内酯加样回收率为 98.01%~100.06%,RSD 为 1.34% ($n=6$);欧前胡素加样回收率为 100.05%~101.77%,RSD 为 2.32% ($n=6$);异欧前胡素加样回收率为 100.32%~101.97%,RSD 为 0.89% ($n=6$)。

2.9 样品含量测定

分别称取不同产地硫磺未熏蒸、自行熏蒸北沙参与硫磺熏蒸饮片各适量,粉碎,过 4 号筛,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,以外标法计算香豆素类成分的含量,详见表 1[编号 1~4 分别为山东烟台莱阳胡城村、河北安国明官店乡霍庄村、山东烟台海阳小纪镇、山东威海文登昆崮镇采摘的药材;编号 5~8 分别为上述产地药材自行熏蒸所得供试品;编号 9~12 分别为安徽亳州中药材市场(批号:131001)、河北安国中药材市场(批号:131017)、山东海阳中药材市场(批号:130619)、山东烟台三联中药材市场(批号:130611)所购饮片]。

表 1 样品含量测定结果($n=3, \mu\text{g/g}$)

Tab 1 Results of the contents determination of samples ($n=3, \mu\text{g/g}$)

编号	补骨脂素	花椒毒素	佛手柑内酯	欧前胡素	异欧前胡素
1	40.66	73.85	30.56	36.41	32.80
2	24.01	67.01	26.71	40.40	33.44
3	11.06	43.68	13.45	21.10	16.76
4	13.55	39.19	14.84	20.81	16.26
5	9.91	38.61	9.87	18.02	17.37
6	7.72	24.44	6.55	12.12	9.90
7	6.55	29.52	6.61	12.58	6.77
8	5.45	22.48	5.46	9.81	7.13
9	5.26	31.97	5.98	10.92	4.00
10	6.45	21.55	3.12	8.28	5.86
11	1.69	5.17	2.10	4.51	4.27
12	3.61	9.84	1.29	2.00	1.68

RP-HPLC法同时测定石韦中4种氨基酸的含量^Δ

龙毅*,杨武德#,袁吉虎(贵阳中医学院药学院化学教研室,贵阳 550002)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3838-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.34

摘要 目的:建立同时测定石韦中4种氨基酸含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Welchrom C₁₈,流动相A为0.1 mol/L的醋酸钠缓冲液(以醋酸钠调节pH至6.5)-乙腈(93:7, V/V),流动相B为乙腈-水(4:1, V/V),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5 μl。结果:谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸的质量浓度分别在4.92~49.2、3.168~31.68、2.6~26、2.88~28.8 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 1$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 4$ 、 $0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均 $\leq 2.2\%$;平均加样回收率分别为98.4%、99.6%、98.3%、100.1%,RSD分别为2.2%、2.5%、2.2%、2.3% ($n=9$)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于石韦中4种氨基酸的含量测定。

关键词 石韦;氨基酸;反相高效液相色谱法;含量测定

Contents Determination of 4 Amino Acids in *Pyrrosia lingua* by RP-HPLC

LONG Yi, YANG Wu-de, YUAN Ji-hu (Dept. of Chemistry, School of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of 4 amino acids in *Pyrrosia lingua*. METHODS: The samples were analyzed by RP-HPLC. It was performed on a column of Welchrom C₁₈ with the mobile phase A of 0.1 mol/L Sodium acetate buffer (pH6.5)- acetonitrile(93:7, V/V) and mobile phase B of acetonitrile-water(4:1, V/V) (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 30 ℃ and the sample size was 5 μl. RESULTS: The linear range was 4.92-49.2 μg/ml for glutamate($r=0.999\ 1$), 3.168-31.68 μg/ml for glycine($r=0.999\ 9$), 2.6-26 μg/ml for alanine($r=0.999\ 4$) and 2.88-28.8 μg/ml for leucine ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.2%; average recoveries were 98.4% (RSD=2.2%, $n=9$), 99.6% (RSD=2.5%, $n=9$), 98.3% (RSD=2.2%, $n=9$) and 100.1% (RSD=2.3%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the contents determination of 4 amino acids in *P. lingua*.

KEYWORDS *Pyrrosia lingua*; Amino acid; RP-HPLC; Content determination

3 讨论

本研究结果表明,硫磺熏蒸北沙参中5种香豆素类成分含量均低于未熏蒸北沙参。为进一步证实北沙参中5种香豆素类成分的减少与硫磺熏蒸有关,笔者对收集的4批未熏蒸北沙参进行硫磺熏蒸处理后,分别对其进行含量测定,经与未熏蒸北沙参比较,发现5种香豆素类成分的含量明显减少,说明硫磺熏蒸可导致北沙参中补骨脂素、花椒毒素、佛手苷内酯、欧前胡素、异欧前胡素含量减少,但具体机制尚不明确,需进一步研究。

目前,虽有学者对硫磺熏蒸药材的鉴别进行了相关的研究工作^[6],但尚不成熟。为防止中药材粗加工过程中滥用或过度使用硫磺熏蒸的问题,保证中药的质量和用药安全,2010年版《中国药典第二增补本》中收录了中药材及饮片的SO₂残留量标准,除山药、牛膝、粉葛、天冬、天麻、天花粉、白及、白芍、白术、党参10种中药材及饮片中亚硫酸盐残留量(以SO₂计)不得超过400 mg/kg外,其余中药材及饮片中亚硫酸盐残留量

均不得超过150 mg/kg^[6]。为保证中药材及饮片低硫或无硫,必须规范药材产地加工方法,研究先进的饮片贮藏保管技术,加强监管力度,以确保中药饮片的用药安全和疗效。

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, 2010:205.
- [2] 刘晓, 马晓青, 蔡皓, 等. ICP-AES法检测硫磺熏蒸前后金银花中金属元素及微量元素[J]. 中成药, 2012, 34(2): 293.
- [3] Wang XH, Xie PS, Lam Chris WK, et al. Study of the destructive effect to inherent quality of Angelicae dahuricae radix (BaiZhi) by sulfur-fumigated process using chromatographic fingerprinting analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(5): 1 221.
- [4] 黄山君, 王瑞, 石燕红, 等. 硫磺熏制白芍的安全性评价初步研究[J]. 药学学报, 2012, 47(4): 486.
- [5] 钟越, 雷钧涛, 曹渊. 枸杞子和硫熏枸杞子的鉴别[J]. 中国药房, 2008, 19(27): 2 138.
- [6] 国家药典委员会. 中国药典:第二增补本[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2013:206.

(收稿日期:2014-12-29 修回日期:2015-07-25)

(编辑:张静)

^Δ 基金项目:贵州省科技计划课题[No.黔科合中药字(2010) LKZ7030号]; 贵阳中医学院科研项目[No.贵中医博(2012)05号]

* 副教授, 博士。研究方向:化学生物学。电话:0851-85283051

通信作者:教授。研究方向:中药质量标准及化学成分。

E-mail: ywd_680708@sina.com