

HPLC 测定清热卡森颗粒中秦皮乙素

依力哈木·买买提¹, 凯赛尔·阿不拉^{2*}

(1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 乌鲁木齐 830049)

(2. 新疆维吾尔自治区食品药品检验所, 乌鲁木齐 830004)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定清热卡森颗粒中秦皮乙素含量的方法。方法: 反相高效液相色谱法。色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸 (10:90) 流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 40 °C, 检测波长为 346 nm, 进样量 10 μL。结果: 秦皮乙素的线性范围为 0.010 1 ~ 0.253 2 μg (r = 0.999 9)。平均加样回收率 99.1%, RSD 1.14%。结论: 方法操作简单, 灵敏, 准确, 重复性好, 可用于清热卡森颗粒的质量控制。

[关键词] 清热卡森颗粒; 秦皮乙素; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0080-03

Determination of Aesculetin in Qingre Kasen Keli

YI Li-ham·MAI MAI-TI¹, KAI Sai-er·A BU-LA^{2*}

(1. Uighur Medicine Hospital of Xinjiang Uighur Autonomous Region, Urumqi 830049 China;

2. Xinjiang Institute for Food and Drug Control, Urumqi 830004 China)

[Abstract] **Objective:** To establish a RP-HPLC method to determine the content of aesculetin in Qingre Kasen Keli. **Method:** The RP-HPLC method was used. The analytical column was Kromasil^M C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid (10:90). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detector wavelength was at 346 nm; injection volume was 10 μL. **Result:** The linear range was within 0.010 1 – 0.253 2 μg (r = 0.999 9). The average recovery was 99.1% (RSD 1.14%). **Conclusion:** The method is simple, accurate and sensitive, and can be used for quality control of Qingre Kasen Keli.

[Key words] Qingre Kasen Keli; aesculetin; RP-HPLC

清热卡森颗粒是由菊苣经水煎煮加工制成的单味制剂, 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准-维吾尔药分册》(1998 年)^[1], 具有清肝利胆, 健胃消食, 利尿消肿等功效, 用于湿热黄疸, 胃痛食少, 水中尿少。现代药理试验证明清热卡森颗粒可使高脂动物血中胆固醇, 甘油三酯和 β-脂蛋白下降, 对实验性

脂肪肝和肝功能损坏有明显对抗作用, 具有保肝、降、压降血脂、抗血小板作用^[2]。秦皮乙素在临床上对治疗细菌性痢疾和气管炎有良好的效果, 国内外还有人发现秦皮乙素对肿瘤有一定的抑制作用和免疫调节作用^[3]。最新研究显示菊苣中所含秦皮乙素(马栗树皮素)可对抗扑热息痛(640 mg·kg⁻¹)所致的大鼠肝损伤, 同样可以对抗 CCl₄ (1.5 mL·kg⁻¹, 口服)所致的肝损伤, 降低其血清酶改变, 证实了秦皮乙素具有保肝作用^[4]。这与本制剂功能主治一致。为保证清热卡森颗粒质量的可控性, 采用 HPLC 对其所含成分秦皮乙素进行了测定, 该方法简单易行, 重复性好, 可用于清热卡森颗粒的质量控制。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 高效液相色谱仪, 包括 SPD-

[收稿日期] 20101210(007)

[基金项目] 国家药典会国家药品(维药)标准提高项目子项目(780)

[第一作者] 依力哈木·买买提, 副主任药师, 研究方向: 维吾尔药研发, Tel: 0991-2562672

[通讯作者] * 凯赛尔·阿不拉, 副主任中药师, 研究方向: 中药民族药检验及质量标准研究, Tel: 13999980643, 0991-2305956, E-mail: ceacer@gmail.com

M10A 二极管阵列检测器、SIL-20A 自动进样器、CTO-10AS 柱温箱、LC Solution 色谱工作站;KLZ-UP 超纯水仪(台湾艾柯成都康宁实验专用纯水设备厂)。KUDOS SK7210LHC 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药 秦皮乙素购于中国食品药品检定(批号 110741-200506,供含量测定用)。甲醇为色谱纯(Fisher 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。清热卡森颗粒 5 批(批号 0908052,1002161,1002162,1004011,1004012)由新疆维吾尔药业有限责任公司提供;另 5 批(批号 100501,100502,100503,100504,100505)由新疆华康药业有限责任公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.1% 磷酸(10:90)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,检测波长 346 nm,进样量 10 μL 。在以上色谱条件下供试品中秦皮乙素与其他组分分离度大于 1.5。理论板数按补骨脂素峰计算为 11 142。缺菊苣的阴性对照溶液无干扰。见图 1。

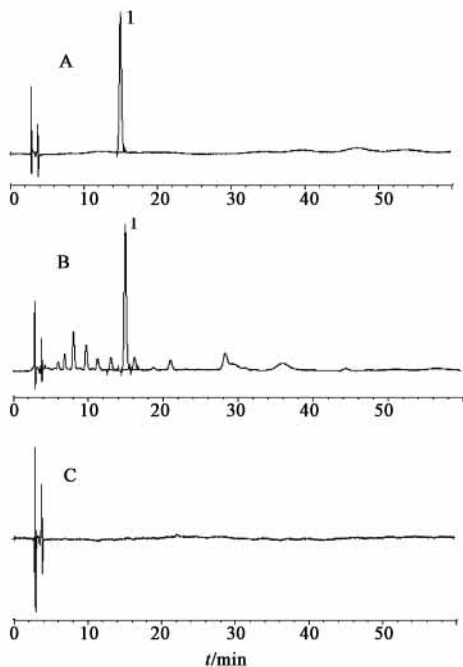


图 1 清热卡森颗粒 HPLC

A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性;1. 秦皮乙素

2.2 对照品溶液制备 精密称取秦皮乙素对照品 10.13 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇适量溶解并定容

至刻度,摇匀,制成含秦皮乙素 1.013 g·L⁻¹ 储备液,再精密吸取此储备液 1.2 mL 置 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成秦皮乙素 12.156 mg·L⁻¹ 溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取装量差异项下的本品内容物,混匀,取适量,研细,取 5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 350 W,频率 59 kHz)30 min,放冷,用甲醇补充减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4 标准曲线及线性关系考察 精密称取秦皮乙素对照品 10.13 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇适量溶解并定容至刻度,摇匀,制成秦皮乙素 1.013 g·L⁻¹ 的储备液,再精密吸取此储备液 0.1,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 置 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成秦皮乙素 1.013,5.065,10.130,15.195,20.260,25.325 mg·L⁻¹ 的系列浓度对照品溶液,分别进 10 μL ,以进样量(X μg)为横坐标,峰面积的积分值 Y 为纵坐标进行线性回归,秦皮乙素标准曲线方程为 $Y = 3\,502\,854.6 X + 990.9$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明秦皮乙素在 0.010 1 ~ 0.253 2 μg 有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取供试品(批号 1002162)溶液,重复进样 6 次,每次 10 μL ,测定秦皮乙素的峰面积值,结果秦皮乙素的 RSD 1.0%,显示精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号样品(批号 1002162)适量,按 2.3 方法分别制备供试品溶液 6 份,照含量测定法进行测定,结果秦皮乙素的平均质量分数为 0.060 76 mg·g⁻¹,RSD 2.29%,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一批号供试品溶液(批号 1002162)0,3,6,9,12,15 h,依法测定秦皮乙素的峰面积值,秦皮乙素的 RSD 0.40%。结果表明,供试品溶液室温下 15 h 内稳定。

2.8 回收率试验 采用加样回收法,精密称取供试品(批号 1002162) 2.5 g,共 6 份,按样品含量测定浓度的 100%,精密加入秦皮乙素 0.015 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液 10.0 mL,按供试品制备方法制备,按上述色谱条件下测定,计算回收率,结果秦皮乙素平均回收率为 99.08% ($n = 6$),RSD 1.14%。见表 1。

表 1 秦皮乙素加样回收试验

No.	称样量/mg	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD /%
1	2.503 1	0.152 1	0.151 95	0.301 5	98.32		
2	2.504 0	0.152 1	0.151 95	0.302 9	99.24		
3	2.504 5	0.152 2	0.151 95	0.303 2	99.37		
4	2.504 2	0.152 2	0.151 95	0.300 1	97.33	99.08	1.14
5	2.505 0	0.152 2	0.151 95	0.303 5	99.57		
6	2.503 8	0.152 1	0.151 95	0.305 0	100.63		

2.9 样品含量测定 取 10 批清热卡森颗粒,按 2.3 项下的样品处理方法及 2.1 项下的色谱条件进行测定,每批样品平行制备 3 份,结果见表 2。

表 2 清热森颗粒中秦皮乙素测定 (n=3)

样品批号	秦皮乙素/mg	RSD/%
1002162	0.745	0.58
1002161	0.735	0.61
0908052	0.227	0.70
1004011	0.481	0.75
1004012	0.482	0.81
100501	0.493	0.65
100502	0.548	0.78
100503	0.529	0.83
100504	0.512	0.85
100505	0.511	0.91

3 讨论

文献报道菊苣主要含秦皮乙素、秦皮甲素、绿原酸、菊苣酸、山莴苣苦素、羽扇豆醇等化学成分^[3-6]。山莴苣苦素、羽扇豆醇无对照品,秦皮甲素和绿原酸在薄层色谱预试验中未检出。根据文献^[6-13]对菊苣酸进行了 HPLC 试验,因本制剂中菊苣酸含量极少,响应值低,未做含测指标。

流动相选择试验中根据《中国药典》2010 年版一部秦皮含量测定项下的流动相乙腈-0.1% 磷酸(8:92)进行预试验,样品分离度小于 1.5,通过调整比例(9:91,10:90,11:89,12:88,13:87),结果流动相为乙腈-0.1% 磷酸(10:90),柱温 40 ℃ 的条件下,分离度较理想。

分别取样品机秦皮乙素对照品,用 SPD-M10A 二极管阵列检测器从 190~370 nm 扫描,秦皮乙素在 346 nm 处有最大吸收,故采用 346 nm 微检测波长。

取供试品适量分别采用了甲醇、50% 甲醇、50% 乙醇、甲醇-0.5% 磷酸(4:1)、水为提取溶剂进行超

声处理,结果表明用甲醇为提取溶剂,秦皮乙素提取率最高。以甲醇作提取溶剂,并按 10,20,30,40,50 min 不同时间超声处理,结果表明超声处理 30 min 能提取完全。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国. 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准-维吾尔药分册[S]. 1998:189.

[2] 买买提·哈斯木, 艾尔肯·米吉提. 维药清热卡森颗粒治疗脂肪肝 41 例观察[J]. 中国民族医药杂志, 2000,6(3):11.

[3] 汪宝琪, 庞志功, 张汉利. 秦皮甲素、乙素在兔体内的药代动力学研究[J]. 沈阳药科大学学报, 1998, 15(1):3.

[4] 王佳珍, 崔健. 中草药菊苣天然产物的药效药理及开发前景[J]. 亚太传统医药, 2009, 11(5):32.

[5] 郑汉臣摘, 苏中武校. 秦皮乙素的原料: 菊苣[J]. 国外医学·药学分册, 1974, 1(3):171.

[6] 徐健梅, 袁其朋. 植物菊苣中菊苣酸含量研究[J]. 天然药物研究与开发, 2008, 20:88, 91.

[7] 杨雁芳, 王弘, 鲁晓. 蕾松果菊咽喉片的质量标准研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(6):30.

[8] 罗旭彪, 陈波, 朱小兰. 紫锥菊及复方制剂中菊苣酸 HPLC 测定[J]. 中草药, 2002, 33(10):890.

[9] 中国药典. 一部[S]. 2010:254.

[10] 罗娜, 方鲁延, 王建芬. HPLC 测定菊苣药材中的有效成分[J]. 华西药杂志, 2007, 22(6):671.

[11] 再娜甫·吐合达洪, 仲婕, 信学雷. 毛菊苣药材不同部位主要活性成分含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8):1018.

[12] 吴涛, 仲婕, 信学雷. 毛菊苣种子质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3):705.

[13] 邓晓鸿, 董林. HPLC 测定二丁颗粒中秦皮乙素的含量[J]. 华西药杂志, 2003, 18(6):452.

[责任编辑 蔡仲德]