

高效液相色谱法测定秦皮中秦皮乙素的含量

王 旭, 张 宪, 赵惠萍, 张小茜
(北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要: 目的: 制订药材秦皮含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法测定秦皮中秦皮乙素的含量。结果: 秦皮乙素在 0.1164~0.5820 μ g 范围内呈良好线性关系, 平均回收率为 98.46%, *RSD* 为 1.63%。结论: 该方法简便易行, 重现性好。

关键词: 秦皮; 秦皮乙素; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)02-0006-02

秦皮收载于历版药典, 为常用的中药, 具有清热燥湿、收涩、明目的功效, 用于热痢、泄泻、赤白带下、目赤肿痛、目生翳膜等, 其含量测定方法为薄层-比色法。该法操作烦琐, 误差大。秦皮乙素含量测定方法有薄层-比色法^[1]、薄层扫描法、高效液相色谱法^[2]、荧光测定法^[3], 本实验选用简便易行的高效液相色谱法测定。实验结果表明: 本方法操作简便、灵敏, 重现性好。

1 仪器、样品和试剂

HP1100 高效液相色谱仪。C18(4.6 \times 150mm) spherclone 5 μ 色谱柱; 乙腈: 色谱纯天津四友; 其他试剂均为分析纯。秦皮乙素对照品(中国药品生物制品检定所提供 批号 741-9404 纯度为 100%) 样品产于山东、陕西。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相 乙腈-0.5% 磷酸溶液(12:88); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 334nm; 层析柱理论塔板数按秦皮乙素峰计算不得少于 3000。

2.2 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液(0.0291mg/ml) 1.2、3、4、5ml, 分别置 5ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 20 μ l 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以秦皮乙素的微克数为横坐标, 峰面积的积分值为纵坐标, 作图得到标准曲线, 其回归方程为 $Y=3099.7X-11$, $r=0.9994$ 。

结果表明, 秦皮乙素在 0.1164~0.5820 μ g 范围内呈良好线性关系。

2.3 稳定性实验 取供试品溶液分别于配制后 0~10h 内每个小时测定一次, 结果表明, 供试品溶液在 10h 内基本稳定, *RSD*% 为 1.67%。

2.4 精密度实验 精密吸取供试品溶液, 重复进样 5 次, 求得相对标准偏差为 1.47%。

2.5 重复性实验 按样品测定方法对同一编号样品进行 5 次测定。求得相对标准偏差为 2.15%。

2.6 回收率实验 精密称取已知含量的秦皮药材粉末 0.25g, 分别精密加入秦皮乙素对照品(0.02096mg/ml) 50ml, 按样品测定方法及上述色谱条件测定, 结果见表 1。平均回收率(%) 98.46, *RSD*(%) 为 1.93。

表 1 秦皮乙素回收率试验

| 取样量 (g) | 样品中含量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 检出量 (mg) | 回收率 (%) |
|---------|------------|----------|----------|----------|---------|
| 0.2506 | 0.7561 | 1.048 | 1.7894 | 1.0333 | 98.60 |
| 0.2510 | 0.7573 | 1.048 | 1.7780 | 1.0207 | 97.40 |
| 0.2584 | 0.7796 | 1.048 | 1.8438 | 1.0642 | 101.55 |
| 0.2458 | 0.7416 | 1.048 | 1.7523 | 1.0107 | 96.44 |
| 0.2486 | 0.7500 | 1.048 | 1.7809 | 1.0309 | 98.37 |

2.7 样品测定 对照品溶液的制备 精密称取在五氧化二磷减压干燥器中干燥 24h 的秦皮乙素对照品适量, 加甲醇制成每 1ml 含 25 μ g 的溶液, 摇匀, 即得。

供试品溶液的制备 取样品粉末(过三号筛) 约 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50ml, 密塞, 称定重量, 加热回流 1h, 放冷, 密塞, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μ m) 滤过, 取续滤液, 即得。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ l, 注入液相色谱仪, 测定, 结果见表 2。

表 2 不同产地不同部位秦皮乙素含量

| 编号 | 产地 | 部位 | 含量(%) |
|----|----|----|-------|
| 1 | 山东 | 干皮 | 0.30 |
| 2 | 山东 | 枝皮 | 0.00 |
| 3 | 山东 | 树皮 | 0.26 |
| 4 | 陕西 | 树皮 | 0.35 |

根据以上数据, 限度订为本品含秦皮乙素 ($C_9H_6O_4$) 不得少于 0.2%。

3 讨论

3.1 秦皮含有秦皮甲素和秦皮乙素, 由于秦皮甲素对照品纯度仅为 89%, 无法进行定量测定, 故选择测定秦皮乙素。

3.2 实验条件的选择

3.2.1 最大吸收波长的选择 取秦皮乙素对照品甲醇溶液在 400~200nm 扫描, 结果在 334nm 有最大吸收, 故选择在 334nm 处测定。

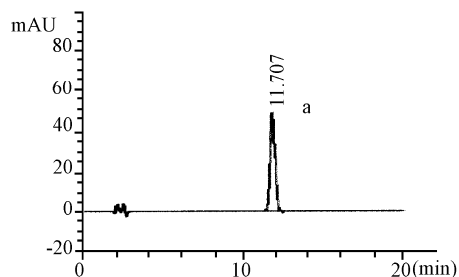


图 1 对照品高效液相色谱图

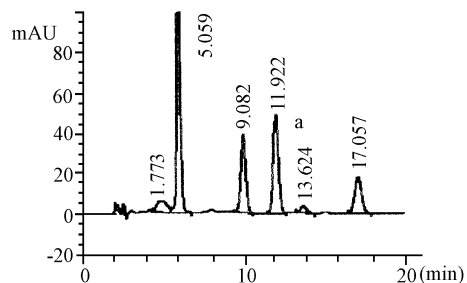


图 2 供试品高效液相色谱图

a. 秦皮乙素

3.2.2 流动相选择 曾试用甲醇-水(30:70)乙腈-水(10:88)及不同比例乙腈-0.5%磷酸为流动相测定, 结果以乙腈-0.5%磷酸溶液(12:88)为流动相, 达到较好的分离, 色谱图见图 1 2。

3.2.3 提取条件的选择

3.2.3.1 提取溶剂的选择 取样品(干皮)分别以甲醇、乙醇、水作为溶剂回流 60min, 照样品测定方法测定, 结果含量(%)分别为 0.30、0.28、0.22, 故选择以甲醇回流提取。

3.2.3.2 提取方法的选择 取样品(干皮)分别采用甲醇冷浸 12h 及回流提取 60min, 照样品测定方法测定, 结果秦皮乙素含量(%)分别为 0.29、0.30, 故以甲醇回流提取较完全。

3.2.3.3 提取时间的选择 取样品(干皮)以甲醇为溶剂, 分别以回流提取 15、30、45、60min, 照样品测定方法测定, 结果秦皮乙素含量分别为 0.29、0.31、0.31、0.31, 选择以甲醇为溶剂, 回流提取 1h。

3.2.3.4 溶剂用量的选择 取样品(干皮), 分别加入 10 倍、20 倍的溶剂回流提取, 照样品测定方法测定, 结果秦皮乙素含量基本一致, 选择以甲醇为溶剂, 溶剂量为 10 倍。

3.3 本文研究制订的 HPLC 法测定秦皮中秦皮乙素含量方法, 简便易行, 重视性好, 为下版药典秦皮质量标准的提高, 提供了可靠的依据, 具有一定的参考价值。

3.4 经测定枝皮的含量很低, 枝皮用药有待商榷。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 223.
- [2] 季申, 王柯. HPLC 测定秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素的含量[J]. 中成药, 1997, 19(10): 40.
- [3] 庞志功, 汪宝琪, 张汉利. 秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素的荧光测定[J]. 分析化学, 1996, (6): 22.