

渝售秦皮饮片质量评价研究

张小梅^{1,2}, 冉崇勇³, 励娜², 秦伟瀚², 梁旭明^{2*}, 姚媛媛²

¹成都中医药大学, 成都 611137; ²重庆市中药研究院重庆市中药资源重点实验室, 重庆 400065; ³重庆市忠县第二人民医院, 重庆 404322

摘要:对渝市售秦皮进行质量评价研究。采购市售秦皮药材 12 批, 采用 UPLC 法测定秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素的含量, 采用紫外分光光度法测定秦皮中总香豆素的含量。结果表明, 秦皮饮片中香豆素的含量相差较大, 并有少数市售饮片不符合药典标准。提示应严格控制秦皮采收期、储存条件等, 以保证秦皮质量, 确保疗效。

关键词:秦皮; UPLC; 香豆素; 质量评价

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.024

Evaluating the Quality of Fraxini Codex Sold in Chongqing Market

ZHANG Xiao-mei^{1,2}, RAN Cong-yong³, LI Na², QIN Wei-han², LIANG Xu-ming^{2*}, YAO Yuan-yuan²

¹Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; ²Chongqing academy of Chinese Traditional Materia Medica, Key Laboratory of Chongqing TCM resources, Chongqing 400065, China; ³Zhongxian second people's hospital 404302 Chongqing

Abstract: To evaluate the quality of Fraxini Codex in Chongqing. UPLC was used to determine components of aesculin, aesculetin, fraxin and fraxetin in 12 batches of Fraxini codex. Meanwhile, UV was applied to determine total coumarins. The content of coumarins in various batches is remarkably different. The results showed that there are also a few batches do not meet the standard of pharmacopoeia. It prompted that in order to ensure the quality of Fraxini cortex and curative effect, rigid management of harvest time and storage condition is urgently required.

Key words: Fraxini codex; UPLC; Coumarins; Quality evaluation

秦皮为木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance、白蜡树 *Fraxinus chinensis* Roxb.、尖叶白蜡树 *Fraxinus szaboana* Lingelsh. 或宿柱白蜡树 *Fraxinus stylosa* Lingelsh. 的干燥枝皮或干皮。苦、涩、寒。归肝、胆、大肠经。清热燥湿, 收涩止痢, 止带, 明目。用于湿热泻痢, 赤白带下, 目赤肿痛, 目生翳膜。秦皮中主要含香豆素类成分, 本文前期研究发现秦皮饮片质量差异较大, 因此决定对渝售秦皮进行调研, 以整体评价渝售秦皮饮片的质量, 为临床用药提供一定的参考依据。本文采用 UPLC 法同时测定秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素的含量, 同时采用紫外分光光度法测定秦皮中的总香豆素, 对重庆市售秦皮的质量进行评价, 通过实验研

究, 结果表明该方法可行, 运行时间大大缩短, 并同时能够准确评价秦皮的质量, 为临床秦皮的购买选择提供一定的借鉴。

1 仪器与试剂

岛津 UHPLC LC-30A 超高效液相色谱仪; AEG-45SM 电子天平 (十万分之一, 日本岛津公司), BP121S (万分之一) (北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

秦皮甲素 (批号 110704-200104), 秦皮乙素 (批号 110741-200506), 秦皮素 (批号 111731-200501), 均由中国药品生物制品检定所提供; 秦皮苷 (纯度 >98%, 购自南京泽朗医药科技有限公司)。甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其它试剂均为分析纯 (重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂)。秦皮饮片购自重庆市药材市场及各大药店, 经重庆市中药研究院中药生药研究所秦松云研究员鉴定为苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance。

收稿日期: 2014-11-04 接受日期: 2015-01-06

基金项目: 重庆市南岸区科技攻关项目; 中药新产品开发研究能力提升建设 (cstc2012pt-kyys10004); 重庆市 GLP 中心能力提升建设 (cstc2012pt-kyys10001); 国家科技重大专项重庆创新药物孵化基地 (2010ZX09401-306-15)

* 通讯作者 Tel: 86-23-89029010; E-mail: 609832205@qq.com

2 方法与结果

2.1 总香豆素的测定

2.1.1 测定波长的选择

取秦皮供试品溶液及秦皮甲素对照品溶液,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010版一部附录V A),在200~400 nm波长范围进行光谱扫描,考察其最大吸收波长。结果显示供试品溶液、对照品溶液在339 nm均有最大吸收,故确定339 nm为测定波长。

2.1.2 标准曲线的制备

精密称取秦皮甲素对照品7.18 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得每1 mL含秦皮甲素0.2872 mg的对照品溶液。精密吸取对照品溶液0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL,分别置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法,在339 nm波长处测定吸收度,以吸收度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $A = 36.91C + 0.020$ ($r = 0.9995$)。结果表明,秦皮甲素浓度在8.616~22.976 $\mu\text{g/L}$ 范围内的线性关系良好。

2.1.3 精密度试验

取同一对照品溶液,重复测定吸收度6次,计算,得RSD为0.17%,表明该仪器精密度良好。

2.1.4 稳定性试验

取供试品溶液及对照品溶液适量,分别于0、2、4、8、12、24 h在339 nm波长处测定吸收度。结果表明,对照品溶液及供试品溶液在12小时内稳定,其RSD分别为0.59%和0.41%。

2.1.5 重复性试验

精密称取同一样品6份,按2.2.3项下制备供试品溶液,在339 nm波长处测定吸收度,计算平均含量为4.22%,RSD为0.83%。结果表明,供试品重复性良好。

2.1.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的秦皮粉末,按2.2.3项下制备供试品溶液,加入秦皮甲素对照品适量(3种不同水平,各3份),在339 nm波长处测定吸收度,计算得平均回收率为100.8%,RSD为1.35%。

2.2 秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素的测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:shim-pack XR-ODS III(2.0 m mid \times 7.5 mm,1.6 μm);流动相:甲醇-0.4%冰醋酸水溶液(9

:91);检测波长:340 nm;柱温:80 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.3 mL/min。

2.2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取秦皮甲素,秦皮乙素,秦皮苷及秦皮素对照品1.81、1.51、2.07、1.55 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇配成混合对照品溶液,备用。用HPLC用微量进样器(1000 μL)分别精密吸取上述混合溶液0.05、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mL分别置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备

取秦皮粉末(过三号筛)约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定重量,加热回流1 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 标准曲线的制备

精密吸取上述对照品混合溶液0.1 μL ,注入液相色谱仪,测定峰面积。分别以秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素的进样量(μg)为横坐标(X)、峰面积积分为纵坐标(Y),进行回归,回归方程为 $Y = 4 \text{ E} + 06 \text{ X} - 47.766$ ($r = 0.99995$)、 $Y = 5 \text{ E} + 06 \text{ X} - 79.913$ ($r = 0.99995$)、 $Y = 3 \text{ E} + 06 \text{ X} + 4.1553$ ($r = 0.99999$)、 $Y = 4 \text{ E} + 06 \text{ X} + 27.978$ ($r = 0.99995$)。结果表明,秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素分别在0.0000905~0.00724 μg 、0.0000755~0.00604 μg 、0.0001035~0.00828 μg 、0.0000775~0.0062 μg 范围内峰面积与含量线性关系良好。

2.2.5 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液0.1 μL ,连续进样6次,测定峰面积,计算RSD值。结果,秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素的RSD依次为0.22%、1.12%、0.91%、1.01%,表明仪器具有较好的精密度。

2.2.6 重现性试验

取同一批号样品(第2批)6份,每份约0.2 g,精密称定,精密称定,按拟定的含量测定方法制备,依法测定峰面积,计算含量。结果,供试品溶液中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素的RSD分别为0.80%、1.01%、0.69%、1.08%,表明本法具有较好的重现性。

2.2.7 稳定性试验

精密吸取上述混合对照品溶液和重复性考察项下的样品溶液各0.1 μL ,分别于0、2、4、8、12、24 h进样,测定峰面积,结果表明,对照品溶液及供试品

溶液均在 24 h 内稳定,对照品中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素 RSD 分别为 0.45%、1.04%、0.68%、1.14%,供试品溶液中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素的 RSD 分别为 0.98%、1.13%、0.88%、1.26%。

2.2.8 加样回收率试验

精密称定已知含量的秦皮饮片粉末 6 份(第 2 批),每份约 0.1 g,分别加入一定浓度的对照品溶

液 25 mL(秦皮甲素,秦皮乙素,秦皮苷,秦皮素的质量浓度分别为 0.06164、0.0102、0.02792、0.00404 mg/L,按样品制备方法及拟定的色谱条件测定峰面积,计算各成分的加样回收率以及 RSD。结果秦皮中上述 4 种香豆素类成分的回收率在 95%~105% 之间,RSD 依次为 1.10%、1.94%、1.13%、2.00%,表明本法具有较好的回收率。

表 1 加样回收率

Table 1 Recovery rate

成分 Compound	称样量 Sample weight (g)	样品中含量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Detected amount (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
秦皮甲素 Aesculin	0.1009	1.5108	1.541	3.0265	98.36	99.82	1.10
	0.1005	1.5048		3.0229	98.52		
	0.1001	1.4988		3.0378	99.87		
	0.1013	1.5168		3.0753	101.14		
	0.1017	1.5227		3.0632	99.96		
	0.1006	1.5063		3.0642	101.10		
秦皮乙素 Aesculetin	0.1009	0.2505	0.255	0.5103	101.87	99.88	1.94
	0.1005	0.2495		0.5009	98.57		
	0.1001	0.2486		0.5114	103.08		
	0.1013	0.2515		0.5028	98.54		
	0.1017	0.2525		0.5064	99.56		
	0.1006	0.2498		0.4989	97.69		
秦皮苷 Fraxin	0.1009	0.7114	0.698	1.4086	99.88	101.08	1.13
	0.1005	0.7086		1.4186	101.72		
	0.1001	0.7058		1.4202	102.35		
	0.1013	0.7142		1.4295	102.47		
	0.1017	0.7171		1.4174	100.34		
	0.1006	0.7093		1.4054	99.73		
秦皮素 Fraxetin	0.1009	0.0356	0.101	0.1385	101.84	100.29	2.00
	0.1005	0.0355		0.1331	96.63		
	0.1001	0.0354		0.1378	101.42		
	0.1013	0.0358		0.1354	98.63		
	0.1017	0.0359		0.1392	102.25		
	0.1006	0.0355		0.1375	100.95		

2.3 样品含量测定

按拟定的含量测定条件,精密吸取供试品及混合对照品溶液各 0.1 μ L 注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷和秦皮素

的含量;同时采用紫外分光光度法测定总香豆素的含量,结果见表 2。混合对照品及样品色谱图见图 1。12 个样品的色谱重叠图,见图 2。

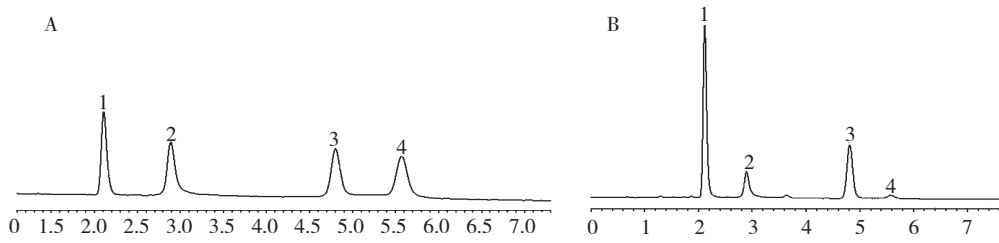


图1 香豆素对照品(A)和秦皮供试品(B)的UPLC图谱

Fig.1 UPLC chromatograms of mixed standards (A) and sample (B)

1. 秦皮甲素 Aesculin; 2. 秦皮乙素 Aesculetin; 3. 秦皮苷 Fraxin; 4. 秦皮素 Fraxetin

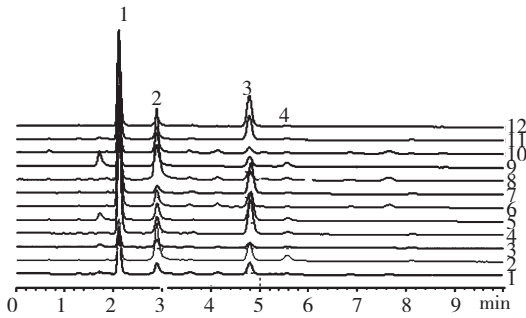


图2 12个样品色谱重叠图

Fig.2 Overlaid UPLC chromatograms of 12 samples

1. 秦皮甲素 Aesculin; 2. 秦皮乙素 Aesculetin; 3. 秦皮苷 Fraxin;
4. 秦皮素 Fraxetin

3 讨论

秦皮中香豆素类成分为其主要有效成份,具有抗炎、利尿和促尿酸排泄的作用。香豆素的含量高低是评价秦皮品质的依据,本文通过对重庆市售秦皮进行调研,对香豆素含量进行测定,发现不同来源的秦皮质量差异较大,超高效液相色谱中,12批饮片的含量在 0.36 ~ 2.84% 之间, RSD% 高达 46.2%, 2010 版《中国药典》规定秦皮中秦皮甲素和乙素的总含量不得少于 1.0%, 有 3 批不符合 2010 版《中国药典》标准, 即有 25% 的秦皮饮片不符合药典规定。秦皮甲素和乙素含量之和分别占 4 个香豆

表2 不同来源药材含量表($n=3$)

Table 2 Content determination results of samples from difference resources ($n=3$)

编号 No.	秦皮甲素 Aesculin (%)	秦皮乙素 Aesculetin (%)	秦皮苷 Fraxin (%)	秦皮素 Fraxetin (%)	甲素和乙素 Sum of aesculin and aesculetin (%)	总香豆素 Sum of fraxin and fraxetin (%)
1	1.44	0.19	0.91	0.02	1.63	4.91
2	1.48	0.25	0.71	0.04	1.73	4.21
3	0.70	0.35	0.15	0.02	1.05	3.76
4	0.34	0.41	0.29	0.10	0.75	3.30
5	1.08	1.27	0.25	0.06	2.35	5.76
6	1.58	0.14	0.89	0.03	1.72	3.96
7	2.52	0.31	0.40	0.01	2.84	6.00
8	1.31	0.32	0.85	0.07	1.63	4.96
9	1.57	0.31	0.95	0.05	1.88	5.46
10	0.23	0.13	0.13	0.03	0.36	1.73
11	0.57	0.64	0.46	0.14	1.20	4.11
12	0.69	0.21	0.35	0.02	0.90	3.44

注:12批药材的含量均以干燥品计。

Note: the contents were calculated depending on the dried weight of sample.

素总含量的 63.7 ~ 88.3%, 说明秦皮甲素和乙素为秦皮香豆素中的主要成分, 其含量高低对其药效的

影响起着重要作用。同时紫外分光光度法测定总香豆素中, 香豆素的含量也是随着秦皮甲素和乙素的

含量高低而随之增减,进一步说明秦皮甲素和乙素含量高低的重要性。

本文首次采用 UPLC 以甲醇-0.4% 冰醋酸水溶液等度运行,同时测定秦皮中的 4 个主要香豆素成分,且运行时间较短,在 6 min 内能有效地对 4 个成分进行分离,大大地节约了运行时间;流速在 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,减少了溶剂的使用量,在提高了效率的同时节省了成本。试验证明了该方法简便、准确、重现性好,能有效地评价秦皮的质量,同时证明在《中国药典》中增加秦皮苷和秦皮素的含量对秦皮进行质量控制也是可行的。

本文对渝售秦皮的质量进行了研究,结果表明其质量存在较大差异,提示在临床应用中应加强对拟用秦皮药材的选择,确保合格优质药材在临床中的运用,以保证临床疗效。

秦皮是常用的传统药材,其质量好坏对临床的疗效影响较大,影响其质量的因素多种,与其生长环境,生长年限,贮存方式及时间有一定的关系。其中因生长年限不够提前剥皮是导致质量降低的一个重

要因素。有些药材为了增加重量,加上了少量木质部,这也是影响秦皮质量的一个因素。饮片在洗净、润透的过程中香豆素成分会随水而损失致含量降低影响质量。前期研究发现秦皮香豆素的含量与其储藏时间和环境有较大关系,下一步将继续对其储存时间和贮存方式与香豆素的含量相关性进行研究。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Chinese Pharmacopoeia, Vol I (中国药典,一部). Beijing: China Medical Science Press, 2010, 254.
- 2 Feng WH (冯伟红), Wang ZM (王智民), Zhang QW (张启伟), et al. Quantitative method for simultaneous assay of four coumarins with one marker in Fraxini Cortex. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 16: 1782-1789.
- 3 Pu XF (蒲旭峰), Ling XQ (凌学青), Zhuang XH (庄小洪). Quality evaluation of Cortex Fraxini (Qinpi). *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2001, 17(2): 4-6.

(上接第 108 页)

- 10 Peng M (彭敏). Distribution regularity and protection strategy of several main wild medicinal plant resources in Qinghai province (青海主要药用野生植物资源分布规律及保护利用对策). Xining: Qinghai People's Publishing House, 2007, 23.
- 11 Tang XJ (汤学军), Guan JH (管竞环). The relationship between Chinese herb taste of Xin, Gan, and Ku and the rare earth elements. *Stud Trace Elem Health Res* (微量元素与健康研究), 1994, 11(4): 24-26.
- 12 Liu WJ (刘文菊), Zhao FJ (赵方杰). A brief review of arsenic uptake and metabolism in plants. *Environ Chem* (环境化学), 2011, 30: 56-62.
- 13 Wang J (王健), Jia RY (贾仁勇), Li XM (黎晓敏), et al. Studies on the relationship between the effect of Chinese herb medicines and the content of mineral elements in them.

Stud Trace Elem Health Res (微量元素与健康研究), 1996, 13(4): 29-31.

- 14 Haq F, Ullah R. Comparative determination of trace elements from *Allium sativum*, *Rheum australe* and *Terminalia chebula* by atomic absorption spectroscopy. *I J B*, 2011, 1(5): 77-82.
- 15 Wu MJ (吴茂江). Manganese and the human health. *Stud Trace Elem Health Res* (微量元素与健康研究), 2007, 24(6): 69-70.
- 16 Zhang JY, Yuan TJ, Wang YZ, et al. Determination of mineral elements in *Gentiana rigescens* from different zones of Yunnan, China. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 147: 329-333.
- 17 Du Y (杜友), Sheng JH (盛晋华), Cui XS (崔旭盛), et al. Determination of the content of mineral elements in *Cistanche Tubulosa* from different areas. *Spectrosc Spect Anal* (光谱学与光谱分析), 2012, 32: 2824-2827.