

RP-HPLC法测定郁李仁中苦杏仁苷含量

霍琳, 陈晓辉, 王鹏, 毕开顺*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 法测定不同产地、不同种属郁李仁中苦杏仁苷含量。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 柱 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 以乙腈-水 (12: 88 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 210 nm; 柱温 35 °C。结果: 苦杏仁苷的线性范围为 5.040~80.6 μg·mL⁻¹ (r= 0.9999; 平均回收率 (n= 9 为 99.8%)。结论: 本法简便, 结果准确, 重复性好, 可作为测定不同种属郁李仁药材中苦杏仁苷含量的方法。

关键词: 郁李仁; 苦杏仁苷; RP-HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009-12-2055-03

RP-HPLC determination of amygdalin in Semen Pruni

HUO Lin, CHEN Xiao-hui, WANG Peng, BIKai-shun*

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for the determination of amygdalin in Semen Pruni of different species and different areas **Methods** The chromatographic method was carried out on Kromasil C₁₈ column (5 μm, 250 mm × 4.6 mm) using acetonitrile-water (12: 88 as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was set at 210 nm, and the column temperature was 35 °C. **Results** The linear range of amygdalin was 5.040-80.6 μg·mL⁻¹ (r= 0.9999, and the average recovery (n= 9 was 99.8%. **Conclusion** The method is simple, accurate with good reproducibility. It can be applied in quantitative of determination of amygdalin in Semen Pruni

Key words Semen Pruni; amygdalin; RP-HPLC

郁李仁 (Semen Pruni) 为蔷薇科植物欧李 *Prunus humilis* Bge、郁李 *Prunus japonica* Thunb. 或长柄扁桃 *Prunus pedunculata* Maxim. 的干燥成熟种子。前 2 种习称“小李仁”, 后 1 种习称“大李仁”。作为常用中药, 收载于中国药典 2005 年版一部中, 具有润燥滑肠、下气、利水的作用, 用于津枯肠燥、食积气滞、腹胀便秘、水肿、脚气、小便不利^[1]。主要分布于东北、内蒙古、河北、山东和宁夏等地区。药理研究证明苦杏仁苷为郁李仁的有效成分之一, 也是郁李仁的主要成分^[2]。本研究收集了河北、吉林、辽宁、内蒙古、河南和宁夏等地不同种的郁李仁样品 11 批, 对其中的苦杏仁苷进行了 HPLC 含量测定和比较, 为郁李仁药材的质量评价提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, G1315BDAD

检测器 (美国 Agilent 公司)。BP210S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); 苦杏仁苷对照品 (批号 110820-200403, 纯度 > 98%, 中国药品生物制品检定所); 郁李仁药材收集于不同地区, 经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定。乙腈、甲醇为色谱纯, 水为自制重蒸水。

2 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相: 乙腈-水 (12: 88); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 210 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。在上述色谱条件下取供试品溶液进样分析, 理论塔板数按苦杏仁苷计算不低于 4000。

3 溶液制备

3.1 供试品溶液 将郁李仁药材粉碎过 20 目筛, 经 80 °C 干燥 2 h, 精密称取样品粉末约 0.2 g 置

* 通讯作者 Tel: (024) 23986016 E-mail: bikaishun@yahoo.com

100 mL具塞锥形瓶中,精密加甲醇 20 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称重,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1.0 mL置 10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

3.2 对照品溶液 精密称取苦杏仁苷对照品适量,置 100 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成浓度为 $0.2016 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。精密量取上述储备液 1.0 mL,置 10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含苦杏仁苷 $20.16 \mu\text{g}$)。

4 方法学考察

4.1 线性范围的考察 精密量取苦杏仁苷对照品储备液 0.25 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 mL,分别置 10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液。在上述色谱条件下分别注入液相色谱仪,记录色谱图。以对照品峰面积 Y 为纵坐标,以溶液浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,绘制标准曲线,得苦杏仁苷回归方程为:

$$Y = 8.18 \times 10^3 + 4.06 \quad r = 0.9999$$

结果表明:苦杏仁苷进样浓度在 $5.040 \sim 80.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

4.2 精密度的试验 精密吸取同一浓度对照品溶液 ($20.16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),在上述色谱条件下连续进样 6 次,测得苦杏仁苷峰面积的 RSD 为 0.7%。

4.3 重复性试验 取同一批样品(内蒙古 II),按“3.1”项下方法操作,平行制备 6 份溶液,按上述色谱条件测定,计算苦杏仁苷含量的平均值 ($n = 6$ 为 1.88%, RSD 为 1.7%。

4.4 稳定性试验 取内蒙古 II 样品的供试品溶液分别放置 0 2 4 8 12 24 h 后,在上述色谱条件下测定。计算苦杏仁苷色谱峰面积的 RSD 为 1.9%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

4.5 加样回收率试验 称取已知含量的郁李仁样品(内蒙古 II 9 份,每份 0.1 g 精密称定,按低、中、高浓度分别精密加入苦杏仁苷对照品储备液 4.7 9.4 14.1 mL,每一浓度 3 份,按“3.1”项下方法操作,在上述色谱条件下进行分析,结果低、中、高浓度的回收率 ($n = 3$ 分别为 97.2% (RSD = 2.8% , 98.1% (RSD = 1.4% , 102.0% (RSD = 2.1% ; 平均回收率 ($n = 9$ 为 99.8%。

5 样品测定

取所收集的郁李仁药材粉末,按“3.1”项下方法操作,在上述色谱条件下测定,采用外标一点法计

算样品中苦杏仁苷的含量。结果见表 1,代表性色谱图见图 1。

表 1 郁李仁样品中苦杏仁苷的含量 ($n = 2$)
Tab 1 Content of amygdalin in Semen Pruni sample

种属 (species samples	样品编号 (sample Lot No	来源 (origins	含量 (content %
欧李 (<i>Prunus humilis</i> Bge.	1	黑龙江 (Heilongjiang)	4.47
	2	辽宁 (Liaoning)	4.25
	3	内蒙古 (Neimonggol)	4.10
	4	河南 (Henan)	3.28
	5	吉林 (Jilin)	3.57
	6	吉林 II (Jilin II)	4.82
郁李 (<i>Prunus japonica</i> Thunb.	7	宁夏 (Ningxia)	3.50
	8	河北 (Hebei)	2.94
	9	深圳 (Shenzhen)	2.48
长柄扁桃 (<i>Prunus pedunculata</i> Maxim.	10	内蒙古 II (Neimonggol II)	1.88
	11	河北 II (Hebei II)	3.27

6 讨论

6.1 关于郁李仁中苦杏仁苷的含量测定方法文献报道多采用银量法^[1]和薄层扫描法^[3],而专属性强、灵敏度高的 HPLC 法文献报道较少。本研究用 DAD 检测器在 200~400 nm 全波长扫描,选取其最大吸收波长 210 nm 为检测波长。研究过程中尝试了不同比例甲醇-水、乙腈-水体系的分离,用甲醇-水流动相系统色谱峰拖尾,而采用乙腈-水系统色谱峰峰形较好,故最终选取洗脱能力强、分离度好的乙腈-水体系作为流动相。

6.2 本研究以苦杏仁苷含量为考察指标,对提取溶剂、提取方法、提取时间和提取次数分别进行了考察,采用超声提取法考察了水、乙醇和不同比例甲醇的提取效率,结果表明甲醇提取效率最高;以甲醇作为提取溶剂比较了冷浸提取、回流提取与超声提取 3 种提取方法,发现回流提取效率最高。在此基础上,考察了回流提取的时间和次数对实验结果的影响,结果表明回流提取 1 h 提取 1 次即可将药材中待测成分提取完全。

6.3 用本法和《中国药典》2005 年版一部郁李仁 [含量测定] 项下方法,对 11 批郁李仁样品进行测定。结果表明, HPLC 法测得的苦杏仁苷含量高于药典法。其中 HPLC 法测得辽宁郁李仁样品中苦杏仁苷的平均含量为 4.25%, 药典法测得的平均含量为 3.38%。药典法是通过银量法滴定苦杏仁苷的酶解产物氢氰酸,间接测定苦杏仁苷的含量,操作烦琐,

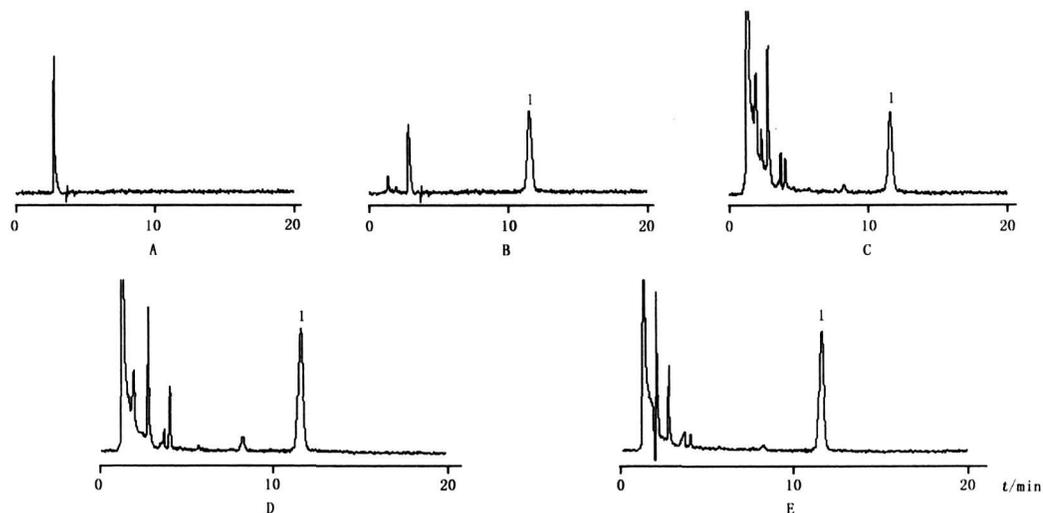


图 1 空白溶剂 (A)、对照品 (B)、内蒙古 II 样品 (C)、吉林 I 样品 (D)、河北 II 样品 (E) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank solvent (A), reference substance (B), sample of Neimenggull (*Prunus japonica* Thunb. (C), sample of Jilin I (*Prunus humilis* Bge. (D), sample of Hebei II (*Prunus pedunculata* Maxim. (E)

1 苦杏仁苷 (amygdalin)

耗时较长。银量法测得苦杏仁苷结果偏低的主要原因是苦杏仁苷酶解不完全和氢氰酸随水蒸气馏出,挥发损失。

6.4 本研究对 11 批郁李仁中苦杏仁苷含量进行了测定,结果表明不同产地、不同种郁李仁中苦杏仁苷含量差异不大。本法快速、简便,结果准确,重复性好,可作为测定不同种郁李仁药材中苦杏仁苷含量的方法。

参考文献

- 1 ChP(中国药典 . 2005. Vol I (一部) : 144
- 2 JI Yu-bin (季宇彬) . Pharmacology and Application of Effective Components in Traditional Chinese Medicine (中药有效成分药理与应用) . Harbin (哈尔滨) : Heilongjiang Science and Technology Press (黑龙江科学技术出版社) , 1995. 13
- 3 YANG Guo-qin (杨国勤) , XU Guo-jun (徐国钧) , JIN Rong-lan (金蓉鸾) , et al Study on the analysis of Yuliren by TLC and electrophoresis (10 种郁李仁有效成分的分析鉴定研究) . J China Pharm Univ (中国药科大学学报) , 1992 23(2) : 77

(本文于 2009 年 4 月 29 日修改回