

HPLC 法测定感冒清口服液中柴胡皂苷 a、d 的含量

霍务贞^{1*}, 卫世杰²(1. 广东药学院中药开发研究所/国家中医药管理局中医药科研三级实验室, 广州 510006; 2. 广东药学院药科学院, 广州 510006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)08-0741-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.08.25

摘要 目的: 建立测定感冒清口服液中柴胡皂苷 a、d 含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱, 流动相为乙腈-水(35:65, V/V), 检测波长为 210 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μl。结果: 柴胡皂苷 a、d 的进样质量分别在 0.207 8~8.312 μg 和 0.244 8~9.792 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好; 平均回收率($n=6$)分别为 95.76% (RSD=1.20%) 和 95.28% (RSD=0.80%)。结论: 该方法操作简便、准确度高、专属性强, 适用于感冒清口服液中柴胡皂苷 a、d 的含量测定。

关键词 感冒清口服液; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Saikosaponin a and Saikosaponin d in Ganmaoqing Oral Liquid by HPLC

HUO Wu-zhen¹, WEI Shi-jie²(1. Research and Development Institute of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical College/Three Level Laboratory of Chinese Materia Medica Scientific Research, SATCM, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of saikosaponin a and saikosaponin d in Ganmaoqing oral liquid. METHODS: HPLC was adopted. The determination was performed on Agilent TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water(35:65, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min and detection wavelength at 210 nm. The column temperature was 25 ℃ and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear ranges were 0.207 8-8.312 μg for saikosaponin a and 0.244 8-9.792 μg for saikosaponin d, respectively. The average recoveries were 95.76% (RSD=1.20%, $n=6$) and 95.28% (RSD=0.80%, $n=6$). CONCLUSION: The method is simple, accurate and specific for the content determination of saikosaponin a and saikosaponin d in Ganmaoqing oral liquid.

KEY WORDS Ganmaoqing oral liquid; Saikosaponin a; Saikosaponin b; HPLC; Content determination

可以避免残留溶剂对流动相的影响, 使得供试品峰形、分离度均较好, 而这也与相关文献报道^[5-6]一致。

3.3 测定指标的选择

酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷为舒眠胶囊药效的主要成分, 且研究表明该胶囊中酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷的含量较高, 因此以酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷为含量测定指标, 对该品的质量控制具有重要意义。

3.4 流动相选择

在对中药进行分析时, 流动相选择不好, 常常会使峰形不佳。预试验表明, 加入一定量的扫尾剂如三乙胺, 并对流动相的 pH 值进行调整, 可显著改善峰形。流动相中缓冲液比例过高, 灵敏度降低; 增加乙腈的比例, 灵敏度增加, 但保留时间迅速缩短。因此, 流动相比例要适中。

综上所述, 采用 HPLC 法对舒眠胶囊中酸枣仁的有效成分酸枣仁皂苷 A 和合欢花、合欢皮的有效成分槲皮苷进行定量检测, 方法简便, 结果准确, 重复性及回收率均理想, 可以有效地控制该产品的质量。

* 助理研究员, 硕士。研究方向: 新药开发与质量标准研究。电话: 020-39352540。E-mail: huowzh@163.com

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: 1.
- [2] 闫艳, 杜晨晖, 李小菊, 等. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 30.
- [3] 刘婧姝, 乔卫, 郝兰芳, 等. 酸枣仁合欢方中酸枣仁皂苷 A 的薄层色谱鉴别和含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 77.
- [4] 张颖, 巩学勇, 冀海位, 等. 翻白草中槲皮素的提取工艺优化及含量测定[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2 345.
- [5] 库尔班尼沙·买提卡思木, 祖里皮亚·塔来提, 古丽娜·达吾提, 等. 地锦草抗真菌有效部位中芦丁及槲皮苷含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2 584.
- [6] 王海岭, 王清溪, 黄洪勇, 等. 合欢花中槲皮苷的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 869.

(收稿日期: 2012-07-23 修回日期: 2012-12-27)

感冒清验方是由板蓝根、柴胡、螺旋藻等五味药组成,具有辛凉解表、疏风清热、利咽解毒等功效,用于治疗风热感冒^[1]。感冒清口服液是在该方的基础上制成的口服液体制剂。柴胡在该复方制剂中起着重要作用,其主要有效成分为柴胡皂苷。由于口服液中成分复杂且含有大量多糖,而柴胡皂苷的极性与多糖较为相近^[2-3],在含量测定时存在着相互干扰,影响测定的准确性。为更好地控制制剂的质量,笔者对样品的前处理方法进行了研究,既除去多糖又防止在除去多糖的同时造成柴胡皂苷的损失,在此基础上采用高效液相色谱(HPLC)法建立了测定感冒清口服液中柴胡皂苷a、d含量的方法,为该制剂的质量控制提供了参考依据和实验基础。

1 材料

1100型HPLC仪,含全自动进样器(美国安捷伦公司);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司);KQ3200型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率:120 W,频率:40 kHz);KDC-140HR型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);EPED-10TJ型实验室级超纯水机(南京易普易达科技发展有限公司);MTN-2800D型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

感冒清口服液(广东药学院自制,批号:20110912、20110916、20110923);柴胡皂苷a、d对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110777-200707、110778-200707);D101大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[4]

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×150 mm,5 μm)柱;流动相:乙腈-水(35:65, V/V);检测波长:210 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:25℃;检测器:Agilent 1100 Series DAD;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备^[4]

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取柴胡皂苷a对照品10.39 mg、柴胡皂苷d对照品12.24 mg,置于25 ml量瓶中,以流动相溶解并定容,滤过,即得柴胡皂苷a、d质量浓度分别为0.415 6、0.489 6 mg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取感冒清口服液5 ml,边搅拌边加入甲醇,使甲醇体积分数为80%,置冰箱冷藏放置4 h后,滤过,滤液减压旋转蒸发至干,加约2 ml超纯水溶解,转移至D101大孔吸附树脂柱上^[6],以0.25 mol/L氢氧化钠100 ml洗脱,加水洗至中性,再用甲醇100 ml洗脱。收集洗脱液,减压旋转蒸发至干,加入甲醇溶解,定容至5.0 ml,滤过,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按复方制剂处方比例制备柴胡的提取液,取相当口服液5 ml量的提取液,按“2.2.2”项下方法制备,即得阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

在“2.1”项色谱条件下,柴胡皂苷a和d与样品中其他成分均达到完全分离。理论板数按柴胡皂苷a和d计算均不低于3 000。对照品、供试品及阴性对照色谱见图1。由图1可看出,样品中其他成分对柴胡皂苷a和d的测定无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下柴胡皂苷a、d混合对照品溶液

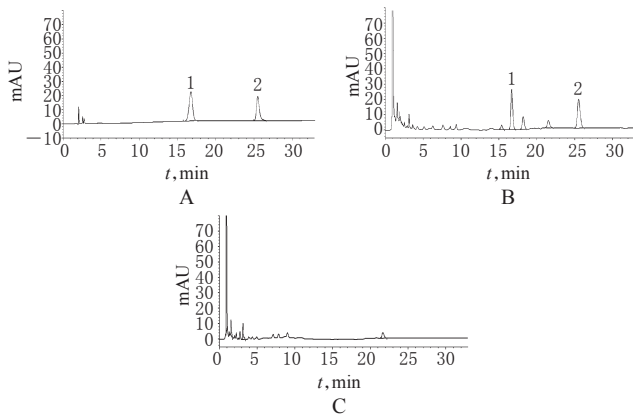


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.柴胡皂苷a;2.柴胡皂苷d

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixture control; B. test sample; C. negative control; 1. saikosaponin a; 2. saikosaponin d

0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、10.0、20.0 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以柴胡皂苷a、d对照品进样质量为横坐标(x),柴胡皂苷a、d峰面积为纵坐标(y),进行线性回归,得到柴胡皂苷a和d回归方程分别为 $y=490.81x+9.712 2(r=0.999 9)$ 、 $y=398.69x-18.551(r=0.999 6)$ 。结果表明,柴胡皂苷a、d进样质量分别在0.207 8~8.312、0.244 8~9.792 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

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。结果,柴胡皂苷a、d峰面积的RSD分别为1.08%、1.13%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,室温放置,分别于0、1、4、8、12、24 h进样,记录峰面积。结果,柴胡皂苷a、d峰面积的RSD分别为1.23%和1.16%,表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

取同一批号样品适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定。结果,柴胡皂苷a、d的平均质量浓度分别为0.196 8、0.127 3 mg/ml, RSD分别为2.92%、2.82%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取同一批号已知质量浓度的样品(柴胡皂苷a、d平均质量浓度分别为0.196 8、0.127 3 mg/ml)进行加样回收率试验。精密量取上述样品2.5 ml,置于100 ml锥形瓶中,分别加入柴胡皂苷a对照品溶液(质量浓度为0.415 6 mg/ml)1.2 ml、柴胡皂苷d对照品溶液(质量浓度为0.489 6 mg/ml)0.65 ml,混匀,按“2.2.2”项下方法进行操作,制得的供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取3批样品各精密量取5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 样品前处理方法的选择

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

序号	样品含量,mg		加入量,mg		测得量,mg		加样回收率,%	
	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d
1	0.492 0	0.318 3	0.498 7	0.318 2	0.969 4	0.624 8	95.73	96.34
2	0.492 0	0.318 3	0.498 7	0.318 2	0.961 7	0.618 7	94.18	94.42
3	0.492 0	0.318 3	0.498 7	0.318 2	0.976 7	0.623 1	97.19	95.80
4	0.492 0	0.318 3	0.498 7	0.318 2	0.972 8	0.621 5	96.41	95.30
5	0.492 0	0.318 3	0.498 7	0.318 2	0.962 3	0.622 6	94.30	95.65
6	0.492 0	0.318 3	0.498 7	0.318 2	0.974 3	0.617 9	96.71	94.17
平均回收率,%							95.76	95.28
R.SD,%							1.20	0.80

表2 样品含量测定结果(mg/ml, n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(mg/ml, n=3)

样品批号	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d
20110912	0.206 2	0.124 7
20110916	0.198 6	0.128 4
20110923	0.198 0	0.116 2

由于感冒清口服液含有大量多糖,在含量测定时存在较大干扰^[7],笔者分别采用醇沉法、液液萃取法、C₁₈小柱萃取法、大孔树脂净化法、醇沉后大孔树脂柱处理法进行前处理,以混合对照品色谱作为对照,比较几种前处理方法的优劣。经5种前处理方法处理的样品的色谱见图2。

由图2可见,醇沉法、液液萃取法对柴胡皂苷 a、d 的分离效

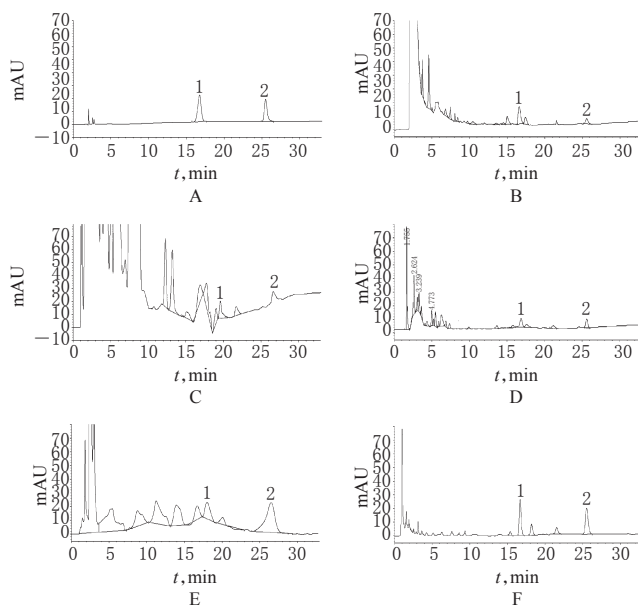


图2 前处理样品的高效液相色谱图

A.混合对照品;B.醇沉法前处理样品;C.液液萃取法前处理样品;D. C₁₈小柱萃取法前处理样品;E.大孔树脂净化法前处理样品;F.醇沉后大孔树脂柱处理法前处理样品;1.柴胡皂苷 a;2.柴胡皂苷 d

Fig 2 HPLC chromatograms of pre-treatment sample

A. mixture control; B. sample untreated with alcohol precipitation; C. sample untreated with liquid-liquid extraction method; D. sample untreated with C₁₈ column extraction; E. sample untreated with macroporous resin purification; F. sample untreated with macroporous resin column after alcohol precipitation; 1. saikosaponin a; 2. saikosaponin d

果差。C₁₈小柱萃取法对感冒清口服液的样品前处理效果较好,能较好地分离纯化柴胡皂苷 a、d,但分离度仍不理想,峰面积也较醇沉后大孔树脂柱处理法的峰面积稍低,且由于C₁₈小柱成本高,笔者没有进一步考察。经大孔树脂净化法前处理后,柴胡皂苷 a、d 与前后峰分离效果好,但峰面积也较C₁₈小柱萃取法的峰面积小很多。经进一步方法改良,采用醇沉后大孔树脂柱处理法对样品进行前处理,分离效果非常好,且加样回收率为95.76%和95.28%,方法准确度较高。故最终选择此法用于感冒清口服液样品前处理。

3.2 测定波长选择

在试验中,分别对柴胡皂苷 a、d 色谱峰进行吸收光谱扫描,结果发现柴胡皂苷 a、d 在210 nm检测波长处有最大吸收,与2010年版《中国药典》(一部)中柴胡测定波长一致。因此,选择210 nm作为柴胡皂苷 a、d 检测波长^[8]。

3.3 流动相选择

柴胡皂苷分子结构中缺乏共轭双键系统,只在末端吸收处有较强的紫外吸收,因此选择乙腈作为有机相。由于样品成分复杂,在预处理过程中样品极性相似的成分易构成干扰,故在预试验中对流动相进行了一系列选择。结果,综合出峰时间和分离效果选择乙腈-水(35:65, V/V)作为流动相。

参考文献

- [1] 卫世杰,霍务贞.感冒清口服液澄清工艺的研究[J].药学与临床研究,2012,20(3):267.
- [2] 马林,宋万志,何丽一,等.柴胡属植物中柴胡皂甙的资源利用[J].天然产物研究与开发,1992,4(4):86.
- [3] 马涵涛,谢秀娟.小柴胡汤口服液絮凝澄清工艺的研究[J].中医药学刊,2003,21(5):820.
- [4] 刘永胜,陈华,金伟华,等.HPLC法测定抗病毒口服液中苦参碱的含量[J].中国药房,2012,23(4):371.
- [5] 魏立明,宋霞,宋三孔,等.HPLC双波长法同时测定复方维A酸软膏中2主药的含量[J].中国药房,2012,23(8):737.
- [6] 王晓飞,葛海生,于玲,等.柴辛鼻敏康颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2011,22(19):1800.
- [7] 蔡林,吴雪,石珊平.HPLC法同时测定柴葛清热颗粒中柴胡皂苷 a、d 和葛根素的含量[J].中国药房,2012,23(31):2949.
- [8] 郇科芳,倪力军,张立国.不同提取工艺对柴胡中柴胡皂苷 a 含量的影响[J].中成药,2006,28(8):1230.

(收稿日期:2012-10-30 修回日期:2012-12-24)