

HPLC法同时测定舒眠胶囊中酸枣仁皂苷A和槲皮苷的含量^Δ

王海岭^{1*}, 张艳萍¹, 王传升^{1#}, 师天元²(1.新乡医学院第二附属医院, 河南新乡 453002; 2.河南省生物精神病学重点实验室, 河南新乡 453002)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)08-0739-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.08.24

摘要 目的:建立同时测定舒眠胶囊中酸枣仁皂苷A和槲皮苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈反相柱,柱温为30℃,流动相为甲醇-乙腈-缓冲液(20:30:50, V/V/V),流速为1.5 ml/min,检测波长为256 nm,进样量为20 μl。结果:酸枣仁皂苷A、槲皮苷检测质量浓度分别在10.168~101.68 mg/L($r=0.999\ 8$)、9.285~92.85 mg/L($r=0.999\ 9$)范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系;平均加样回收率分别为99.7%、99.5%,RSD分别为1.98%、2.21%($n=6$)。结论:该方法简便,结果准确,重复性及回收率均理想,可用于舒眠胶囊的质量控制。

关键词 舒眠胶囊;酸枣仁皂苷A;槲皮苷;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of Berberine Jujuboside A and Quercitroside in Shumian Capsules by HPLC

WANG Hai-ling¹, ZHANG Yan-ping¹, WANG Chuan-sheng¹, SHI Tian-yuan²(1.The Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Henan Xinxiang 453002, China; 2.Henan Provincial Key Laboratory of Biological Psychiatry, Henan Xinxiang 453002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of berberine jujuboside A and quercitroside in Shumian capsules. METHODS: HPLC method was adopted. A Diamonsil C₁₈ reversed-phase column was used with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-buffer solution (20:30:50, V/V/V) at the flow rate of 1.5 ml/min. The detection wavelength was set at 256 nm and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear ranges of jujuboside A and quercitroside were 10.168-101.68 mg/L ($r=0.999\ 8$) and 9.285-92.85 mg/L ($r=0.999\ 9$) respectively. The average recoveries were 99.7% (RSD=1.98%, $n=6$) and 99.5% (RSD=2.21%, $n=6$). CONCLUSION: The method is simple and accurate with sound reproducibility and recovery, which can be applied for the quality control of Shumian capsule.

KEY WORDS Shumian capsule; Jujuboside A; Quercitroside; HPLC; Content determination

舒眠胶囊由酸枣仁(炒)、合欢花、合欢皮、柴胡(酒炒)、白芍(炒)等多味药组成,用于治疗失眠多梦、精神抑郁、急躁易怒、胸胁苦满、口苦目眩等病症。酸枣仁皂苷A为舒眠胶囊中含量较高的有效成分,具有疏肝解郁、宁心安神、气血双调的功效;槲皮苷为合欢花、合欢皮专属性成分,具有养血柔肝、解郁安神,助酸枣仁养肝阴、补肝体的作用。

目前,酸枣仁皂苷A和槲皮苷的含量测定在《中国药典》2010年版^[1]和文献^[2]中均采用梯度洗脱的方法。梯度洗脱在一定程度上可以缩短分析周期,但常常会引起基线漂移,峰面积计算的准确性、重复性受外界因素干扰较大。为了提高标准的专属性、准确性和重复性,本试验建立了一种简单、快速的高效液相色谱(HPLC)法,可同时测定舒眠胶囊中酸枣仁皂苷A和槲皮苷含量,可用于舒眠胶囊的质量控制。

1 材料

1100型HPLC仪(美国Agilent公司);UV-265FW型紫外可见分光光度计(日本Shimadzu公司);BP211D型电子天平

Δ 基金项目:河南省卫生厅卫生科技创新型人才工程专项(No.3052)

* 主管药师,本科。研究方向:中药有效成分的提取分离及含量测定。电话:0371-3373971。E-mail:wanghailing123789@163.com

通信作者:硕士研究生导师,博士。研究方向:精神药理学。E-mail:wcsoffice@126.com

(德国Sartorius公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XK96-A型快速旋涡混合器(苏州奇乐电子科技有限公司)。

酸枣仁皂苷A、槲皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110734-200509、111538-200302);舒眠胶囊(贵州大隆药业有限责任公司,批号:20110110、20110304、20110806、20110906、20111216、20120306,规格:每粒0.4 g);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈反相柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温:30℃;流动相:甲醇-乙腈-缓冲液(20:30:50, V/V/V),缓冲液以5 ml三乙胺加入1 000 ml水中,冰醋酸调pH值至4.0即得;流速:1.5 ml/min;检测波长:256 nm;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取酸枣仁皂苷A和槲皮苷对照品约10 mg,精密称定,加甲醇溶解,转移至100 ml量瓶中,定容至刻度,即得二者质量浓度分别为101.68 mg/L和92.85 mg/L的混合对照品贮备液,于4℃冰箱中保存,备用。临用前用流动相稀释成所需浓度的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取舒眠胶囊内容物适量,研细,取约0.4 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25

ml, 密塞, 摇匀, 超声提取 10 min, 称质量, 用 70% 的甲醇补足损失的质量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即用前用流动相稀释成所需浓度的供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按舒眠胶囊处方制备酸枣仁(炒)、合欢花、合欢皮的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别精密量取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 20 μl, 在“2.1”项色谱条件下注入 HPLC 仪, 记录色谱。结果, 供试品色谱呈现与对照品色谱保留时间相同的色谱峰, 且阴性对照无干扰。酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷保留时间分别为 6.7 min 和 12.1 min。酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷理论板数均不低于 6 000, 分离度不小于 2.0, 拖尾因子为 1.04。色谱见图 1。

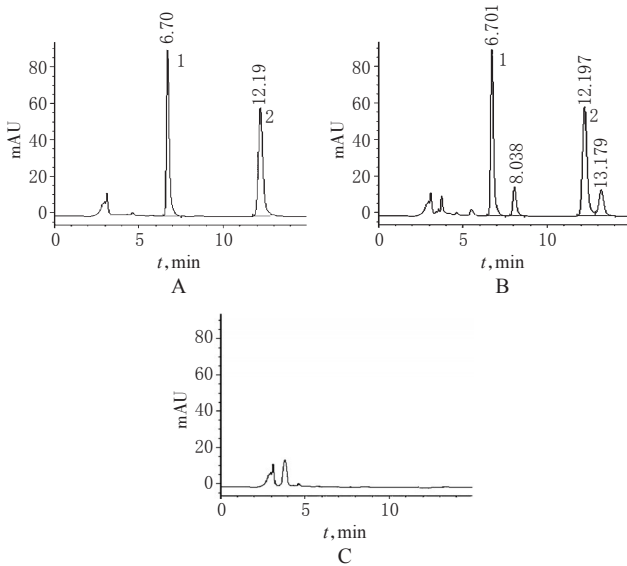


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 酸枣仁皂苷 A; 2. 槲皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. jujuboside A; 2. quercitroside

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 振摇混匀, 在“2.1”项色谱条件下分别进样。以检测质量浓度为横坐标(x , mg/L), 峰面积为纵坐标(y), 进行线性回归, 得到酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷的回归方程 $y=568.6x-4.021$ ($r=0.9998$) 和 $y=617.5x-5.137$ ($r=0.9999$)。结果表明, 酸枣仁皂苷 A、槲皮苷检测质量浓度分别在 10.168~101.68、9.285~92.85 mg/L 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 检测限及定量限的考察

经考察, 酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷的最低检测质量浓度分别为 0.12 mg/L 和 0.26 mg/L (信噪比为 3); 最低定量质量浓度分别为 0.41 mg/L 和 0.88 mg/L (信噪比为 10)。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液(酸枣仁皂苷 A 质量浓度为 40.67 mg/L, 槲皮苷质量浓度为 37.14 mg/L)适量, 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果, 酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷的 RSD 分别为 0.05% 和 0.08%, 表明本法的精密度较好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液适量, 室温下放置, 分别于第 0、2、4、6、8、10、12、14、16、20、24 h 各进样 1 次, 测定峰面积。结果, 酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷的 RSD 分别为 0.26% 和 0.87%, 表明供试品溶液放置 24 h 质量保持稳定。

2.8 重复性试验

取样品(批号: 20110806)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行试验 6 次, 测定含量。结果, 酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷的 RSD 分别为 0.82% 和 0.51%, 表明本法的重复性较好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号: 20110806)6 份, 各约 0.4 g, 精密称定, 分别精密加入适量对照品溶液, 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, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
酸枣仁皂苷 A	0.401 6	1.265 0	1.216 8	2.466 6	98.8	99.7	1.98
	0.400 8	1.262 5	1.216 8	2.494 5	101.2		
	0.398 5	1.255 3	1.216 8	2.498 5	102.1		
	0.402 8	1.268 8	1.216 8	2.476 7	99.3		
	0.402 0	1.266 3	1.216 8	2.438 8	96.5		
	0.397 9	1.253 4	1.216 8	2.474 0	100.3		
槲皮苷	0.401 6	1.415 6	1.378 6	2.826 8	102.3	99.5	2.21
	0.400 8	1.412 8	1.378 6	2.806 9	101.1		
	0.398 5	1.404 7	1.378 6	2.738 3	96.8		
	0.402 8	1.419 9	1.378 6	2.805 6	100.5		
	0.402 0	1.417 1	1.378 6	2.757 4	97.3		
	0.397 9	1.402 6	1.378 6	2.763 0	98.7		

2.10 样品含量测定

取已知含量的样品适量, 测定 6 批样品中酸枣仁皂苷 A、槲皮苷的含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	含酸枣仁皂苷 A 的量, mg/g	RSD, %	含槲皮苷的量, mg/g	RSD, %
20110110	3.46	0.98	3.61	1.26
20110304	3.03	1.04	3.19	0.95
20110806	3.15	0.72	3.53	1.18
20110906	2.90	0.55	3.44	0.85
20111216	3.28	1.36	3.75	0.79
20120306	2.86	0.82	3.33	0.69

3 讨论

3.1 检测波长的选择

分别取酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷对照品适量, 在 200~700 nm 检测波长范围内扫描, 结果发现酸枣仁皂苷 A 在 203、632 nm, 槲皮苷在 256、355、505 nm 检测波长处均有较大吸收。综合考虑选择 256 nm 作为检测波长。

3.2 提取方法的选择

本试验参考相关文献^[1-4]对样品中酸枣仁皂苷 A 和槲皮苷进行提取时发现, 以甲醇为溶剂的超声方法提取效率要高于乙醇加热回流方法。这是由于超声波产生的强烈震动、高加速度、强烈空化效应和搅拌作用, 都可以加速有效成分溶入溶剂, 并且减少了高温对提取成分的影响; 此外, 以甲醇为溶剂,

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)