

树脂吸附-薄层扫描法测定 抗病毒口服液菝葜皂甙元含量

苏子仁 周莉玲(广州中医药大学 510407)

摘要 利用抗病毒口服液中知母皂甙被大孔树脂吸附,除去糖等杂质干扰;再用 75%乙醇洗脱皂甙。加酸水解生成皂甙元,经有机溶媒富集后,按薄层扫描法测定菝葜皂甙元含量。该法专一性强,灵敏度高,线性关系好,回收率为 97.2%,RSD 为 3.28%。

关键词 抗病毒口服液 菝葜皂甙元 大孔树脂 薄层扫描法 含量测定

Determination of Sarsasapogenin in an Anti-virus Oral Liquid with a Resin-absorptive and TLCS Method

Su Ziren, Zhou Liling (Guangzhou University of TCM, Guangzhou, 510407)

Abstract: The sarsasapogenin in an anti-virus oral liquid was absorbed by great occipital resin to get rid of the disturbance of impurities like sugar, then eluted with 75% alcohol and hydrolyzed by acid to produce sapsogenin, whose content was determined with a TLCS-method was sensitive with high specificity and good linear relationship, and the rate of recovery was 97.2%, RSD 3.28%.

Key words: anti-virus oral liquid, sarsasapogenin, great occipital resin, TLCS content determination

抗病毒口服液由北板蓝根、知母、广藿香、连翘等药材制成,具有清热祛湿、凉血解毒的功效,用于治疗病毒性疾患疗效较好。原试行的质量标准只有挥发油的试管反应和连翘的薄层鉴别,尚不能满足进一步控制质量的需要。我们选择清热泻火之要药知母作为研究对象,利用知母皂甙易被大孔树脂吸附,除去糖等杂质的干扰;再将知母皂甙洗脱,加酸水解生成皂甙元后,用有机溶媒富集,薄层扫描法测定菝葜皂甙元含量。现将实验结果报告如下。

1 实验材料

抗病毒口服液,无附加剂的抗病毒口服液原液,知母药材等均由广州市萝岗制药厂提供。

菝葜皂甙元(Sarsasapogenin,简写SAR)对照品,批号为744-8701,由中国药品

生物制品检定所提供。大孔树脂D₁₀₁(天津树脂厂)。硅胶G(青岛海洋化工厂)。氯仿,正己烷,乙酸乙酯等试剂均为AR级。

Shimadzu CS-920型薄层扫描仪,薄层涂布器,微量进样器,索氏提取器。

2 实验方法与结果

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 菝葜皂甙元对照品溶液 精密称取菝葜皂甙元5mg,置5ml容量瓶中,用苯溶解并稀释至刻度、摇匀、备用。

2.1.2 知母药材对照液 取干燥的知母药材粉碎成粗粉(过40目筛),精密称取2g,置50ml具塞三角瓶中,加入95%乙醇20.0ml,超声波振荡提取40min,静置后取上清液10.0ml于100ml圆底烧瓶中,加入浓盐酸5ml及蒸馏水40ml,沸水浴回流2h,放置至室温,用滤纸过滤,烧瓶用少量水多次洗涤,

过滤,蒸馏水洗至滤液无色(pH6~7),滤纸100℃干燥1h后,置索氏提取器中用氯仿回流提取3h,提取液回收氯仿至剩余少量,转移至具塞离心管中,挥去氯仿至干。取1.0ml氯仿-乙醇(1:1)混合液定量溶解,取5 μ l点样。

2.1.3 抗病毒口服液样液 精密量取口服液50.0ml,置已处理好的大孔树脂柱(大孔树脂D₁₀₁经95%乙醇浸泡3d,水洗至无醇味,取10g大孔树脂,置内径1cm,高20cm层析柱上,水冲洗备用),先用100ml蒸馏水洗去糖等干扰物质,再用75%乙醇100ml洗脱,收集洗脱液,将洗脱液置100ml圆底烧瓶中,回收乙醇。残渣按2.1.2方法提取定容,取20 μ l点样。

2.1.4 无附加剂抗病毒口服液原液 按抗病毒口服液样液方法制备。

2.1.5 缺知母样液 按抗病毒口服液处方制成缺知母样液,依法水解,提取,定容后取20 μ l点样。

2.2 测定方法的建立

2.2.1 薄层层析条件和专一性考察 吸附剂:硅胶G-0.5%CMC-Na板(厚0.5mm,105℃活化2h);展开剂:正己烷-乙酸乙酯(8:2)。上行展开10cm;8%香草醛乙醇液-3%高氯酸液(1:1)混合液喷雾显色,于100℃烘烤10min。抗病毒口服液在 $R_f=0.45$ 处可检出与知母相对应的菝葜皂甙元的黄色斑点,缺知母的样液不能检出相应的斑点,结果果表明,其它药材对测定无干扰。结果如图1。

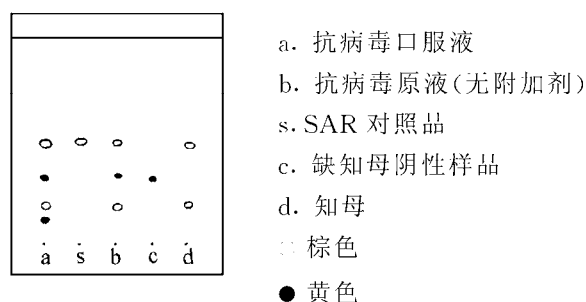


图1 抗病毒口服液的TLC图谱

2.2.2 线性关系考察 精密吸取菝葜皂甙

元对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μ l,分别点于薄层板上,展开,显色后,参照文献^[1],在 $\lambda=445\text{nm}$, $SX=3$,狭缝 $1.25\times 1.25\text{mm}^2$ 条件下反射式锯齿扫描测定峰面积,经回归分析,回归方程 $Y=1.509\times 10^{-4}x+0.209$;相关系数 $r=0.9991$ 。结果显示,在1~6 μ g内,线性关系良好。

2.2.3 显色稳定性考察 取4 μ l菝葜皂甙元对照品溶液点于薄层板上,展开,显色后,在不同的时间进行扫描测定。结果显示,显色后1h内峰面积值基本保持恒定;时间延长后,斑点逐渐褪色,峰面积值明显下降。本实验采用立即测定。

2.2.4 纯化条件的考察 样品溶液采用大孔树脂吸附去糖,加酸水解,有机溶媒提取等纯化措施。为了优化纯化条件,我们进行了如下试验:

(1)排除糖的干扰:精密量取50.0ml同一批号的不含附加剂的口服液原液9份,其中6份按处方加入一定量的糖等附加剂制成抗病毒口服液。其中原液3份,抗病毒口服液3份不经大孔树脂处理,直接依法水解,提取,定容,测定。抗病毒口服液另外3份依法过大孔树脂去糖,水解,提取,定容,测定。结果如表1。

表1 大孔树脂排除糖干扰测定结果

样品	测定法	测定结果($\bar{x}\pm s$)
不含糖原液	不经大孔树脂柱	3.483 \pm 0.275
样液(含糖)	不经大孔树脂柱	2.134 \pm 0.034
样液(含糖)	经大孔树脂柱	3.452 \pm 0.080

结果不加附加剂的半成品原液测定值远大于加附加剂的样液。含糖等附加剂的样液经大孔树脂吸附除糖处理之后,测定值与无糖原液无差别。结果显示,附加剂糖对测定结果干扰大;大孔树脂处理可排除糖的干扰。

(2)水解时间的选择 精密量取抗病毒口服液原液50.0ml 6份,分别置100ml圆底烧瓶中,加入浓盐酸5ml及蒸馏水10ml,分别在沸水浴回流0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、6.0h后,依抗病毒口服液样液制备法提取,

薄层扫描测定,按外标二点法计算含量,结果如表 2。

表 2 不同水解时间的测定结果

水解时间(h)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	6.0
测定结果(μg/ml)	2.060	3.080	3.660	3.810	3.760	3.780

结果显示。水解 1.5h,含量已接近最高值,本实验采用水解 2h 测定。

(3)提取时间的选择 精密量取抗病毒口服液 50.0ml 5 份,分别依法过大孔树脂柱,加酸水解 2h 后,放置至室温,过滤洗涤,干燥后,置索氏提取器中加氯仿 100ml,分别回流 1.0、2.0、3.0、4.5、6.0 后,提取液回收氯仿至氯仿剩余少量,转移至具塞离心管中,挥去氯仿至干。用 1.0ml 氯仿:乙醇(1:1)混合液定量溶解,取 20μl 点样,薄层扫描测定。按外标二点法计算含量,结果如表 3。

表 3 不同提取时间的测定结果

水解时间(h)	1.0	2.0	3.0	4.5	6.0
测定结果(μg/ml)	3.527	3.607	3.633	3.740	3.627

结果显示,提取 2h,含量已接近最高值。本实验采用提取 3h 测定。

2.2.5 回收率试验 按抗病毒口服液的制剂处方(含辅料),制成缺知母的样液 300ml,精密量取 50.0ml 5 份,分别精密加入已知含量的知母水提醇沉液 2.0ml,按上述方法测定含量。结果如表 4。

表 4 回收率试验结果

编号	SAR 加入值 (mg)	SAR 测得值 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x} \pm s$ (%)	RSD (%)
1	3.042	2.925	96.2		
2	3.042	2.808	92.3	97.2±3.2	3.28
3	3.042	2.971	97.7		
4	3.042	3.028	99.5		
5	3.042	3.054	100.4		

2.3 样品测定 将抗病毒口服液,知母原药材分别按上述方法提取纯化。与 SAR 对照品溶液随行点于同一硅胶 G 板上,展开,显色后扫描测定,按外标二点法计算含量。结果如表 5。

3 小结与讨论

3.1 知母系本方的君药,具有清热泻火,滋

表 5 样品测定结果

样品批号/来源	SAR 含量[μg/ml(g)]				$\bar{x} \pm s$	
抗病毒口服液	9110128	4.82	5.03	4.15	4.67	4.67±0.38
	9112147	3.80	4.30	4.13	3.98	4.08±0.21
	9201114	4.10	4.60	5.13	4.53	4.59±0.42
	9111136	4.40	4.33	5.10	4.92	4.69±0.38
	9111131	3.32	2.93	3.25	3.10	3.15±0.17
知母	本校卫生所	2850	2880	2680	2800	±110
	本校一附院	9450	10910	10130	10160	±730
	萝岗制药厂	10370	9440	10550	10120	±600

阴润燥的功效。知母主要成分为知母皂甙,甙元部分有菝葜皂甙元(Sarsasapogenin)、马可甙元(markogenin)和新吉托甙元(neogitogenin)。其中菝葜皂甙元含量较多,故选择菝葜皂甙元进行含量测定,控制抗病毒口服液的内在质量。

3.2 抗病毒口服液中的附加剂主要由蔗糖,蜂蜜及甜味素等组成,对含量测定结果影响较大。利用大孔树脂对皂甙的特异性吸附,将糖等杂质除去,排除干扰,回收率由 61.2% 提高至 97.2%。

3.3 该法具有专一性强,灵敏度高,线性关系好,回收率高的特点,适宜抗病毒口服液、半成品、药材的含量测定。曾将本法与原位水解法^[1]平行测定同一批知母,结果本法测定值为 10.12±0.59mg/g,原位水解法测定结果为 3.60±0.13mg/g。两法测定结果有显著性差异,这可能是原位水解法属固体不均相水解,难以水解完全,以致 SAR 测定结果偏低。

3.4 知母药材的质量,直接影响成品的质量。经鉴定为百合科 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 根茎的药材,因批次不一,其 SAR 含量相差较大。这可能与知母生长环境,物候期,饮片加工因素有关。为确保抗病毒口服液质量,应于投料前对药材进行含量测定。

参考文献

- 1 孙文基,沙振方,杨春光. 知母及含知母成药中菝葜皂甙元的薄层扫描法测定. 中国中药杂志, 1989,14(9):34

(收稿:1997-04-28)