

HPLC 测定白头翁总皂苷乳剂指标成分含量及释放度

黄秀娃¹, 李翔², 刘微², 罗晓健^{1,2}, 陈兰英^{1,2}, 杨世林^{1,2}, 何雁^{1*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330006;

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**建立 HPLC 测定白头翁总皂苷乳剂中白头翁皂苷 B3 及白头翁皂苷 BD 含量的方法,测定该乳剂体外释放度。**方法:**采用液液萃取法处理样品,HPLC 进行检测。色谱条件为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), C₁₈ 保护柱(4.0 mm × 3.0 mm), 柱温 40 °C, 流动相乙腈-水-四氢呋喃(52:45:3), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL。采用改良的动态透析法进行白头翁总皂苷乳剂及白头翁总皂苷水溶液的体外释药试验。**结果:**白头翁皂苷 B3 和白头翁皂苷 BD 的线性范围分别为 0.01 ~ 1 ($r=0.999\ 6$), 0.01 ~ 2 ($r=0.999\ 8$) g·L⁻¹, 精密度的 RSD 分别为 3.19%, 1.17%, 重复性 RSD 分别为 1.40%, 1.60%, 平均回收率分别为 99.63%, 100.27%。3 批白头翁总皂苷乳剂中白头翁皂苷 B3 质量浓度分别为 0.186, 0.190, 0.191 g·L⁻¹, 白头翁皂苷 BD 分别为 0.069, 0.065, 0.066 g·L⁻¹。该乳剂中白头翁皂苷 B3 及白头翁皂苷 BD 在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中 12 h 的累积释放率分别 91.30%, 74.97%。**结论:**建立的方法准确、灵敏,适用于白头翁乳剂指标成分含量及释放度的测定。

[关键词] 白头翁总皂苷; 液液萃取; 高效液相色谱; 乳剂; 释放度

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0022-04

[doi] 10.11653/syjf2013190022

HPLC Determination of Indicators Ingredients and Release of Pulsatilla Total Saponins Emulsions

HUANG Xiu-wa¹, LI Xiang², LIU Wei², LUO Xiao-jian^{1,2}, CHEN Lan-ying^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}, HE Yan^{1*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an RP-HPLC method for determination of pulsatilla saponin B3 and pulsatilla saponin BD in pulsatilla total saponins emulsions, and determine its *in vitro* release. **Method:** Liquid-liquid extraction method was adopted to dispose samples and HPLC was adopted to detect. Chromatographic conditions were as follows: Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), C₁₈ guard column (4.0 mm × 3.0 mm), column temperature 40 °C, mobile phase of acetonitrile-water-tetrahydrofuran (52:45:3), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength 203 nm, injection volume 10 μL. *In vitro* release tests of pulsatilla total saponins emulsions and pulsatilla total saponins solution were adopted modified dynamic dialysis. **Result:** Linear ranges of pulsatilla saponin B3 and pulsatilla saponin BD were 0.01-1 ($r=0.999\ 6$) and 0.01-2 ($r=0.999\ 8$) g·L⁻¹, RSD of precision were 3.19% and 1.17%, RSD of repetition were 1.40% and 1.60%, average recoveries were 99.63% and 100.27%. The concentration of pulsatilla saponin B3 in three batches of pulsatilla total saponins emulsions were 0.186, 0.190, 0.191 g·L⁻¹, the concentration of pulsatilla saponin BD were

[收稿日期] 20130223(007)

[基金项目] 十二五“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX11102-001-19);江西自然科学基金项目(20114BAB215045);江西省教育厅产学研合作项目(GJJ11006)

[第一作者] 黄秀娃,在读硕士,从事中药新剂型研究, Tel:13767404281, E-mail:huangxiuwa@163.com

[通讯作者] *何雁,教授,硕士生导师,从事中药新剂型研究, Tel:13576086421, E-mail:heyany95@yahoo.com.cn

0.069, 0.065, 0.066 g·L⁻¹, respectively. Cumulative release of pulsatilla saponin B3 and pulsatilla saponin BD from emulsions in pH 7.4 phosphate buffer reached 91.30% and 74.97% within 12 h, respectively.

Conclusion: This established method was accurate, sensitive and suitable for determination of index components and release of Pulsatillae Radix emulsions.

[Key words] total saponins from Pulsatillae Radix; liquid-liquid extraction; HPLC; emulsions; release

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根,具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效,临床主要用于治疗阿米巴痢疾、细菌性痢疾、阴道滴虫和下痢脓血等^[1-2]。现代药理研究表明白头翁总皂苷具有抗炎、抗肿瘤、诱导细胞凋亡等生物活性^[3-4],但存在溶解度低、吸收差且对胃肠道具有刺激性等不足。乳剂作为胃肠给药的载体,分散度大,有利于药物的吸收,提高生物利用度^[5];可使药物充分定位于油水界面膜或油滴核中^[6],避免药物直接与胃肠道接触,从而减少药物对胃肠道的刺激性,具有很大的开发前景。本实验制备了白头翁总皂苷水包油型乳剂,采用液液萃取-反相高效液相色谱法测定白头翁总皂苷乳剂中白头翁皂苷 B3 和白头翁皂苷 BD 的含量及其在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中的体外释放情况,为白头翁总皂苷乳剂的质量控制提供参考依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent),RV-10 型旋转蒸发仪、T-18 型高速剪切机、GENIUS 型涡旋仪(德国 IKA 集团),ZRS-8G 型溶出仪(天津市天大天发科技有限公司),TDL-40B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),BSA2202S 型分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),Milli-Q 型纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

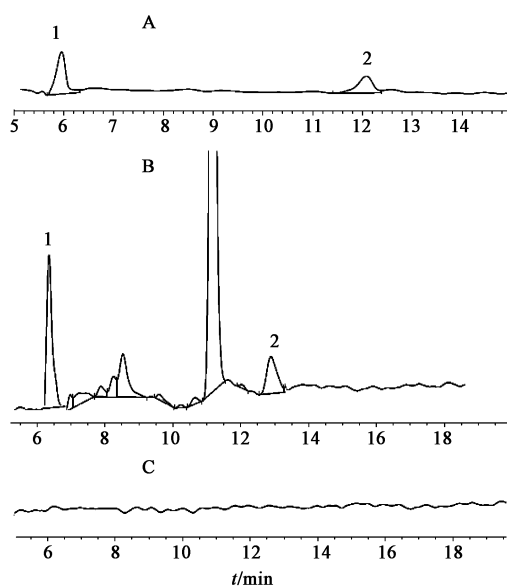
白头翁皂苷 B3、白头翁皂苷 BD 对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心植化室提供,批号均为 20111108),白头翁总皂苷(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心植化室提供,纯度 > 80%,批号 20120506),大豆卵磷脂(SPC,江苏曼氏生物科技有限公司),辛酸葵酸三甘油酯(GTCC,北京凤礼精求商贸有限责任公司),维生素 E 醋酸酯(VE,北京凤礼精求商贸有限责任公司),泊洛沙姆 188(北京凤礼精求商贸有限责任公司),甘油(西陇化工厂股份有限公司),白头翁总皂苷乳剂(自制,批号 20121120,20121121,20121122),乙腈、甲醇、四氢呋喃为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白头翁总皂苷乳剂的制备 称取处方量的白

头翁总皂苷,SPC,GTCC 及 VE,加入适量的无水乙醇,置磁力搅拌器中搅拌至全部溶解,蒸干无水乙醇,作为油相,60 ℃ 保温备用;另取处方量的泊洛沙姆 188、甘油于 60 ℃ 下分散于处方量水中,作为水相;在磁力搅拌、60 ℃ 条件下将水相缓慢滴加至油相中,磁力搅拌 40 min 后,高速分散机剪切 15 min,即得。

2.2 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 40 ℃,流动相乙腈-水-四氢呋喃(52:45:3),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,进样量 10 μL,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 空白乳剂;
1. 白头翁皂苷 B3; 2. 白头翁皂苷 BD

图 1 白头翁总皂苷乳剂 HPLC

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品储备液 分别精密称取白头翁皂苷 B3、白头翁皂苷 BD 对照品 25, 50 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液 精密量取白头翁总皂苷乳剂 1 mL 于 10 mL 离心管中,加入三氯甲烷 5 mL,涡旋 30 min,离心(4 000 r·min⁻¹) 15 min,取三氯甲烷层,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,经 0.22 μm 微

孔滤膜滤过,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取白头翁皂苷 B3 及白头翁皂苷 BD 对照品储备液各 1 mL,混匀,得母液。将母液分别稀释 1.25,2.5,5,12.5,50,100 倍,按 2.2 项下色谱条件测定,以质量浓度对峰面积进行线性回归,得回归方程分别为 $Y = 0.0005X - 0.0167$ ($r = 0.9996$), $Y = 0.0003X - 0.0125$ ($r = 0.9997$),线性范围分别为 0.01 ~ 1,0.01 ~ 2 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品,按 2.2 项下色谱条件连续进样 6 次,结果白头翁皂苷 B3 和白头翁皂苷 BD 峰面积的 RSD 分别为 3.19%,1.17%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批白头翁总皂苷乳剂 6 份,分别按 2.3.2 项下方法平行制备供试品溶液,进样,测得白头翁皂苷 B3、白头翁皂苷 BD 平均质量浓度分别为 0.193 (RSD 1.40%),0.072 (RSD 1.60%) $g \cdot L^{-1}$,表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密量取同一批白头翁总皂苷乳剂适量,共 6 份,分别加入相当标示量的 80%,100%,120% 的白头翁皂苷 B3 及白头翁皂苷 BD 对照品溶液,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样,计算回收率,结果白头翁皂苷 B3 低、中、高质量浓度的回收率分别为 100.02%,99.16%,99.72%,白头翁皂苷 BD 低、中、高质量浓度的回收率分别为 100.16%,101.02%,99.62%,表明本方法回收率良好。

2.8 样品测定 取 3 批白头翁总皂苷乳剂样品,分别按 2.3.2 项下方法制备样品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样,测定,结果白头翁皂苷 B3 质量浓度分别为 0.186,0.190,0.191 $g \cdot L^{-1}$,白头翁皂苷 BD 则分别为 0.069,0.065,0.066 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.9 体外释放度试验 采用改良的动态透析法^[7-8]。取 3 批白头翁总皂苷乳剂及白头翁总皂苷原粉水溶液,分别精密量取该乳剂及水溶液 2 mL 置于处理过的透析袋中,将扎好的透析袋置于盛有经脱气处理的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 200 mL 的溶出杯中,使温度保持在 37 °C,调整转速至 100 $r \cdot min^{-1}$,分别于 0.5,1,2,4,6,8,10,12 h 取样,每次 2 mL,同时向杯中补充释放介质溶液 2 mL,按 2.3.2 项下方法处理样品,测定释放介质中白头翁皂苷 B3 和白头翁皂苷 BD 的质量浓度,计算累积释放率,见图 2。

3 讨论

白头翁皂苷 B3 和白头翁皂苷 BD 为三萜皂苷,皂苷元结构中无共轭体系,紫外吸收为末端吸收,且

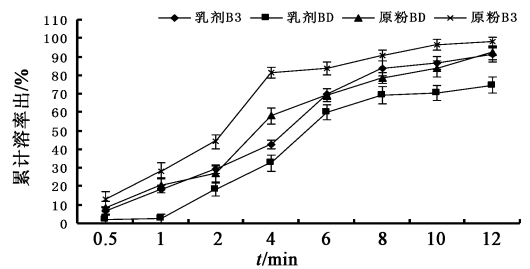


图 2 白头翁总皂苷乳剂和原粉中白头翁皂苷 B3、白头翁皂苷 BD 的累积释放曲线

吸收较弱。检测波长分别考察了 203,205,210 nm,发现于 203 nm 检测时杂质峰干扰较小,图谱特征性较强。流动相选择时,发现乙腈-水体系较甲醇-水体系基线稳定,且加入少量的四氢呋喃可改善峰形^[9-10]。预试验发现选择流动相为乙腈-水-四氢呋喃(45:52:3)时,白头翁皂苷 B3 和白头翁皂苷 BD 的分离效果较理想。

白头翁有效成分多且复杂^[11],对白头翁皂苷 B3 及白头翁皂苷 BD 的含量测定会造成杂质干扰。通过液液萃取,以三氯甲烷为溶剂,在除去白头翁总皂苷大部分杂质的同时富集指标成分白头翁皂苷 B3 及白头翁皂苷 BD,该萃取方法简单易行、成本低。

乳剂含量测定涉及破乳提取药物的过程,破乳的主要方法有物理法和化学法。物理法包括加热和高压电破乳;化学破乳法是通过加入破乳剂破坏乳化剂或界面膜而改变分散体系的界面性质,造成破乳,如加入高分子物质、有机溶剂和酸碱溶液^[12]。单纯加热法难以在短时间内造成稳定性良好的乳剂破乳且不利于药物的稳定,高压电破乳不适于实验室应用,故采用化学破乳法,在乳剂中加入 5 倍量三氯甲烷,可得到澄清透明的供试品溶液,并能有效萃取出白头翁皂苷 B3 及白头翁皂苷 BD。

由图 2 可知,白头翁总皂苷水溶液中,药物直接从透析袋扩散至释放介质中,释放快且完全。乳剂中药物释放需先从分散相或界面层向连续相扩散,而后从连续相扩散至释放介质中,故释放慢且 12 h 释放未完全。白头翁皂苷 BD 在五环三萜皂苷元 3 位上连了鼠李糖和阿拉伯糖各 1 个,白头翁皂苷 B3 则在五环三萜皂苷元 3 位上连了鼠李糖、葡萄糖及阿拉伯糖各 1 个,测得二者的油水分配系数分别为 0.40,0.39,说明这 2 种成分均具有较强的亲脂性,在乳剂中分布可能大部分包封于油滴核中,从乳剂中释放需从油相扩散至水相,而后从水相扩散至释放介质中,故释放较慢。白头翁皂苷 B3 连了 3 个糖,油水分配系数略小于白头翁皂苷 BD,可能由于

三种不同煎煮方法对复方丹参汤剂中有效成分溶出的影响

雷凯君*, 李子鸿, 吴声振

(佛山市中医院药剂科, 广东 佛山 528000)

[摘要] 目的:比较传统砂锅、高压煎药机和两煎常压煎药机制备复方丹参汤剂的质量差异。方法:采用传统砂锅、高压煎药机和两煎常压煎药机制备复方丹参汤剂。利用 HPLC 测定煎液中丹酚酸 B 含量,色谱条件为 LunaC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μL),流动相乙腈-甲醇-甲酸-水(10:30:1:59),检测波长 286 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。结果:传统砂锅、高压煎药机和两煎常压煎药机制备复方丹参汤剂中丹酚酸 B 平均质量浓度分别为 2.534, 2.673, 2.766 g·L⁻¹, RSD 分别为 3.32%, 1.15%, 1.25% (n=5)。结论:两煎常压煎药机更适用于复方丹参汤剂的制备。

[关键词] 传统煎药法; 高压煎药机; 两煎常压煎药机; 复方丹参汤剂; 丹酚酸 B; 含量测定

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0025-03

[doi] 10.11653/syfy2013190025

Effects of Three Different Decoction Methods on Dissolution of Active Ingredients from Compound Danshen Decoction

LEI Kai-jun*, LI Zi-hong, WU Sheng-zhen

(Department of Pharmacy, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000, China)

[收稿日期] 20130311(008)

[基金项目] 佛山市医学类科技攻关项目(201008018)

[通讯作者] *雷凯君, 学士, 主任药师, 从事药剂管理研究, Tel:0757-83063373, E-mail:leikaijun@sina.com

一部分白头翁皂苷 B3 分布于乳剂的水相中,故释放速率快于白头翁皂苷 BD。乳剂中药物释放取决于药物在乳滴中所处的部位和载体性质,且乳剂中不同部位的药物释放速度和释放机制均不相同^[13]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:68.

[2] 舒莹, 韩广轩, 刘文庸, 等. 中药白头翁的药材、化学成分和药理作用的研究[J]. 药学实践杂志, 2000, 18(6):387.

[3] Gepdiremen A, Mshvildadze V, Süleyman H, et al. Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema[J]. Phytomedicine, 2005, 12(6/7):440.

[4] 钟邱, 倪琼珠. 白头翁中皂苷成分对肿瘤细胞的抑制作用[J]. 中药材, 2004, 27(8):604.

[5] 卢立忠. 中药乳剂作用机制的研究进展[J]. 中医临床杂志, 2012, 24(8):806.

[6] Jumaa M, Müller B W. Lipid emulsions as a novel

system to reduce the hemolytic activity of lytic agents: mechanism of the protective effect[J]. Eur J Pharm Sci, 2000, 9(3):285.

[7] 耿丽娟, 游本刚, 唐丽华, 等. α-常春藤皂苷丙烯酸树脂 L100 纳米粒的制备及其体外评价[J]. 苏州大学学报:自然科学版, 2012, 32(3):363.

[8] 林晓洁, 张华, 金少钢, 等. 盐酸青藤碱壳聚糖纳米粒的制备及体外释放性能的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):22.

[9] 鹿燕敏, 王蓓, 薛小平, 等. RP-HPLC 法测定清热解毒浸膏白头翁皂苷 B4 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10):8.

[10] 冯果, 刘文, 冯勇. 复方白头翁汤结肠缓释片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):81.

[11] 莫少红. 白头翁化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(5):385.

[12] 董武军, 刘玉玲. HPLC 法测定黄芩素静脉注射亚微乳剂的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12):2120.

[13] 苏德森. 物理药剂学[M]. 沈阳:沈阳药科大学出版社, 2000:38.

[责任编辑 仝燕]