

HPLC-DAD-ELSD 测定酸枣仁分散片中 4 种成分含量

涂艳艳*

(南昌市第三医院药剂科,南昌 330009)

[摘要] 目的:建立同时测定酸枣仁分散片中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸 4 种成分含量的 HPLC-DAD-ELSD 方法。方法:应用高效液相色谱法,采用 Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以乙腈(A)-水(0.1% 乙酸)(B)为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 335 nm,蒸发光散射检测器的漂移管温度 100 °C,载气流速 2.9 L·min⁻¹。结果:斯皮诺素在 3.36 ~ 32.36 μg·g⁻¹ ($r=0.999\ 2$)、酸枣仁皂苷 A 在 1.12 ~ 11.24 μg·g⁻¹ ($r=0.999\ 6$)、酸枣仁皂苷 B 在 1.36 ~ 13.56 μg·g⁻¹ ($r=0.999\ 7$) 和白桦脂酸在 5.04 ~ 50.45 μg·g⁻¹ ($r=0.999\ 3$) 关系良好,平均加样回收率分别为 99.23% ,101.25% ,98.63% ,102.09% ;RSD 分别为 1.51% ,1.49% ,2.57% ,0.72% 。结论:方法快速简便,精密度好,灵敏度高,在同一色谱条件下实现多指标不同成分的同时测定,为酸枣仁分散片的全面质量评价提供参考。

[关键词] 酸枣仁;分散片;斯皮诺素;酸枣仁皂苷 A;酸枣仁皂苷 B;白桦脂酸;HPLC-DAD-ELSD

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0152-04

HPLC-DAD-ELSD Simultaneous Determination of Four Active Components in Semen Ziziphi Spinosae (Suanzaoren) Dispersible Tablet

TU Yan-yan*

(Department of Pharmacy, The Third Hospital of Nanchang, Nanchang 330009, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-DAD-ELSD method for the simultaneous determination of spinosin, jujuboside A, jujuboside B and betulinic acid in Semen Ziziphi Spinosae dispersible tablet. **Method:** The chromatographic separation was performed on a Venusil XBP reversed phase C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) analytical column by a gradient elution program with acetonitrile-water (containing 0.1% acetic acid) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was at 25 °C and the optimum detection wavelength of DAD was set at 335 nm, the evaporator tube temperature of ELSD was set at 100 °C with the nebulizing gas flow rate of 2.9 L·min⁻¹. **Result:** The linear range of spinosin, jujuboside A, jujuboside B and betulinic acid were 3.36-32.36 ($r=0.999\ 2$), 1.12-11.24 ($r=0.999\ 6$), 1.36-13.56 ($r=0.999\ 7$) 5.04-50.45 μg·g⁻¹ ($r=0.999\ 3$), respectively. The average recoveries were 99.23% (RSD 1.51%), 101.25% (RSD 1.49%), 98.63% (RSD 2.57%), 102.09% (RSD 0.72%), respectively. **Conclusion:** The method is simple and accurate, it can be used for the quality control of Semen Ziziphi Spinosae dispersible tablet.

[Key words] Semen Ziziphi Spinosae; dispersible tablet; spinosin; jujuboside A; jujuboside B; betulinic acid; HPLC-DAD-ELSD

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子,具有镇静安神、补肝宁心、生津、敛汗的功

效,用于治疗惊悸多梦、虚烦不眠、头晕眼花等症^[1]。目前酸枣仁的临床应用剂型主要有汤剂^[2]、口服液,颗粒剂和胶囊等。以上剂型有携带不便、易霉败变质,口感较差,吞服不易等缺点。为了克服酸枣仁现有剂型的缺点,笔者采用 PVPP,CCNa 等为崩解剂^[3],MCC 为填充剂,硬脂酸镁为润滑剂制备了酸枣仁分散片。

[收稿日期] 20120319(019)

[通讯作者] *涂艳艳,主管药师,从事药物新剂型与新技术研究,Tel:13177881666,E-mail:181609782@qq.com

现代药理研究表明酸枣仁中皂苷类和黄酮类化合物是其镇静催眠的主要有效成分^[4]。目前对酸枣仁药材中皂苷类和黄酮类化合物的定量分析方法多为 HPLC, UV, TLCS, ELSD 等, 且多针对其中一个^[5-6]、一类^[7]、多个成分^[8-9]或是指纹图谱^[10]进行分析, 同时测定斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸的方法还未见报道。本试验建立 HPLC-DAD-ELSD 法对酸枣仁分散片中以上 4 种成分含量进行同时测定, 为酸枣仁分散片质量标准的制定提供参考。

1 仪器与试剂

美国 Waters Alliance 2695 型高效液相色谱仪, Waters2420 蒸发光散射检测器, Empower 色谱工作站, 梅特勒 AL104 型电子析天平和 Sartorius BT25S 1/10 万天平, KQ-300E 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

斯皮诺素(批号 72063-39-9)购于上海纯优生物科技有限公司, 纯度 >98.0%; 酸枣仁皂苷 A(批号 110734-200510)、酸枣仁皂苷 B(批号 110814-200607)、白桦脂酸对照品(批号 111802-201001)均购于中国药品生物制品检定所。乙腈(色谱纯), 双蒸水(自制), 其他所用试剂均为分析纯, 酸枣仁分散片自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(0.1% 乙酸), 梯度洗脱, 见表 1, 柱温 25 °C, DAD 检测波长 335 nm^[1], ELSD 参数漂移管温度 100 °C, 载气流速 2.9 L·min⁻¹, 进样体积 20 μL。

表 1 流动相梯度

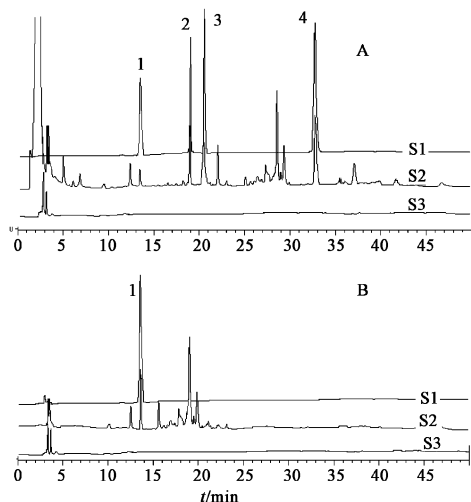
t/min	乙腈/%	0.1% 乙酸/%
0	19	81
5	23	67
25	70	30
35	90	10
40	100	0
50	100	0

2.2 混合对照品溶液的配制 分别精密称取斯皮诺素对照品 16.18 mg、酸枣仁皂苷 A 对照品 5.62 mg、酸枣仁皂苷 B 对照品 6.78 mg 和白桦脂酸对照品 25.22 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密量取 1 mL, 置同一 5 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 制成混合标

准液, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释, 配制成 1 mL 含 32.36 μg 斯皮诺素、11.24 μg 酸枣仁皂苷 A、13.56 μg 酸枣仁皂苷 B 和 50.45 μg 白桦脂酸的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取酸枣仁分散片 20 片, 置研钵中磨成粉末。取 0.5 g, 精确称定, 至于 25 mL 量瓶中, 加入 70% 乙醇 20 mL, 超声提取 30 min(超声功率 100 W), 冷却, 用 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按酸枣仁分散片处方比例和制备工艺制缺酸枣仁的分散片, 按供试品制备方法制备阴性对照溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果阴性对照样品对测定无干扰。结果见图 1。



A. HPLC-ELSD; B. HPLC-DAD;

S1. 混合对照品; S2. 供试品; S3. 阴性样品

1. 斯皮诺素; 2. 酸枣仁皂苷 A; 3. 酸枣仁皂苷 B; 4. 白桦脂酸

图 1 酸枣仁分散片色谱

2.5 测定方法 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 采用外标法计算即得。

2.6 线性关系考察 分别准确吸取按 2.2 项下方法制备的混合对照品储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL 置 1 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 即得 6 种系列不同质量浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述浓度对照品溶液 20 μL, 注入色谱仪, 记录色谱图。斯皮诺素以峰面积(Y)对质量浓度(X, mg·L⁻¹)进行线性回归, 酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸则以进样质量浓度的常用对数值为横坐标(X), 峰面积常用对数值为纵坐标(Y), 进行线性回归, 得回归方程, 见表 2。

2.7 精密度试验 精密吸取质量浓度为 6.47 mg·L⁻¹ 斯皮诺素、2.25 mg·L⁻¹ 酸枣仁皂苷 A、2.71 mg·

表 2 线性关系

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 /mg·L ⁻¹
斯皮诺素	$Y = 1.4169X - 0.9183$	0.9992	3.36 ~ 32.36
酸枣仁皂苷 A	$Y = 2.0135X + 0.2638$	0.9996	1.12 ~ 11.24
酸枣仁皂苷 B	$Y = 1.5822X - 0.0108$	0.9997	1.36 ~ 13.56
白桦脂酸	$Y = 1.1956X - 0.3676$	0.9993	5.04 ~ 50.45

L⁻¹酸枣仁皂苷 B、10.09 mg·L⁻¹白桦脂酸的混合照品溶液 20 μL,在 2.1 项色谱条件下连续进样 6 次,记录 4 个物质的峰面积,计算 RSD 分别为 2.02%,0.69%,2.81%,1.43%。结果表明精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10,12 h 按上述色谱条件测定峰面积。斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸的 RSD 分别为 1.24%,1.56%,0.81%,1.78%。12 h 内供试品溶液色谱峰面积无明显变化,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 重复性试验 取同一批样品 6 份(批号 20110806),按供试品溶液制备方法制备,依法测定,计算各物质含量。结果斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸的平均含量分别为 622.86,225.38,261.23,1 002.15 μg·g⁻¹,其 RSD 分别为 1.03%,1.59%,0.66%,1.39%。

2.10 加样回收率试验 取已知含量的供试品粉末(含斯皮诺素 620.32 μg·g⁻¹、酸枣仁皂苷 A 220.65 μg·g⁻¹、酸枣仁皂苷 B 260.87 μg·g⁻¹和白桦脂酸 1 001.28 μg·g⁻¹)平行 6 份,每份重约 0.25 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,分别精密加入质量浓度为 150.18 mg·L⁻¹的斯皮诺素、55.14 mg·L⁻¹酸枣仁皂苷 A、60.24 mg·L⁻¹酸枣仁皂苷 B、250.12 mg·L⁻¹的白桦脂酸 4 种对照品混合溶液 1.0 mL,按供试品溶液制备方法制备,按色谱条件测定,计算平均回收率,结果见表 3。

2.11 样品含量测定 取 3 批酸枣仁分散片样品,按 2.3 项下方法制备样品溶液,按色谱条件测定,采用外标法计算含量,结果见表 4。

3 讨论

酸枣仁中所含的皂苷类成分属于紫外的末端吸收,使用紫外低波长检测时,易受梯度洗脱和噪音的影响,导致定量不准确,而 HPLC-ELSD 由于流动相在检测前即已蒸发,因此提高了其基线的稳定性,并不受梯度洗脱的影响,HPLC-ELSD 测定酸枣仁分散片的皂苷类成分研究结果表明:此法回收率高,准确

表 3 酸枣仁分散片加样回收率试验

成分	样品中 含量 /μg	加入量 μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
斯皮诺素	155.33	150.18	304.02	99.01	99.23	1.51
	155.20		302.79	98.27		
	154.96		305.97	100.56		
	154.83		306.92	101.27		
	155.27		304.15	99.14		
酸枣仁皂苷 A	55.14	55.14	110.25	99.74	101.25	1.49
	55.21		112.09	103.16		
	55.12		111.98	103.12		
	55.07		110.46	100.45		
	55.23		110.46	100.17		
酸枣仁皂苷 B	55.18		110.79	100.84	98.63	2.57
	65.32	60.24	125.84	100.46		
	65.27		126.88	102.27		
	65.17		124.94	99.23		
	65.11		122.79	95.75		
白桦脂酸	65.30		123.18	96.09	102.09	0.72
	65.24		124.26	97.97		
	250.72	250.12	506.08	102.09		
	250.52		504.68	101.62		
	250.12		505.73	102.20		
	249.92		506.94	102.76		
	250.62		503.13	100.96		
	250.42		507.88	102.93		

表 4 酸枣仁分散片中 4 种成分的含量(n=3) μg·g⁻¹

批号	斯皮诺素	酸枣仁皂苷 A	酸枣仁皂苷 B	白桦脂酸
20110801	625.35	228.71	269.75	998.72
20110803	618.49	223.85	258.24	1005.53
20110804	630.28	214.98	272.68	991.84

度好,精密度好,在测定浓度范围内浓度与峰面积线性关系良好;而斯皮诺素为黄酮类成分,具有较强的紫外吸收,其在 DAD 上的响应大于 ELSD,所以斯皮诺素采用 DAD 的检测结果进行定量分析。

分散片系指在水中能迅速崩解并均匀分散的片剂,综合了片剂和液体制剂的优点,大剂量服用方便、吸收快、生物利用度高,克服了与其他剂型的如携带不便、易霉败变质,口感较差,吞服不易等缺点,

单味柴胡煎煮过程中皂苷煎出量的变化

李军*, 姜华, 张延萍, 张倩, 徐幽

(河南科技大学化工与制药学院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 目的:考察柴胡煎煮过程中皂苷 a, b₁, b₂, h 煎出量的变化。方法:采用 HPLC, Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水, 梯度洗脱(0~70 min, 22:78→50:50), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 210, 254 nm。结果:柴胡在单煎时其皂苷的成分溶出随煎煮时间存在较大的变化。柴胡皂苷 a 的煎出量随时间逐渐下降, 煎煮的 4 h 后, 其含量下降逐渐趋于稳定。柴胡皂苷 b₁, b₂, h 的煎出量随时间增加, 其中柴胡皂苷 b₁ 的煎出量在煎煮 5 h 后其含量仍处于增加的阶段, 柴胡皂苷 b₂ 煎煮 2 h 后煎液中的含量便达到了最大值, 柴胡皂苷 h 在煎煮 4 h 后煎出量增加的幅度逐渐趋缓。结论:在从化学成分角度研究柴胡在方剂中配伍规律时, 应注意煎煮过程对柴胡皂苷成分含量变化的影响。本文对含不稳定性成分药材配伍规律研究模式的建立奠定基础。

[关键词] 柴胡; 含量测定; 柴胡皂苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0155-04

Content Change of Saikosaponins During Preparation of Saiko Decoction

LI Jun*, JIANG Hua, ZHANG Yan-ping, ZHANG Qian, XU You
(Chemical Engineering and Pharmaceutics College, Henan University
of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

[收稿日期] 20120508(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001615)

[通讯作者] *李军, 博士, 副教授, 从事中药活性成分(组)研究, Tel:0379-64231914, E-mail:huomanlee@126.com

我们对酸枣仁分散片中的黄酮类与皂苷类成分的含量测定方法进行了研究, 从而为酸枣仁分散片的质量控制提供依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:343.
- [2] 林渊, 周良良, 吴水生. 对中药汤剂剂型改革研究的思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 264.
- [3] 王艳荣, 李慧, 张保献, 等. 新型辅料在中药分散片中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 207.
- [4] 张雪, 丁长河, 李和平. 酸枣仁的化学成分和药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 348.
- [5] 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.

- [6] 王燕, 柴程芝, 朱丹妮. HPLC-ELSD 测定 GSSM 颗粒中酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 76.
- [7] 张彦青, 解军波, 张明春, 等. HPLC-ELSD 法测定酸枣仁滴丸中酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸[J]. 中草药, 2009, 42(2): 234.
- [8] 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, 2011, 31(1): 30.
- [9] 鲍康德, 李萍, 李会军, 等. HPLC-ELSD 法同时测定酸枣仁中黄酮及皂苷类成分[J]. 中国天然药物, 2009, 7(1): 47.
- [10] 闫艳, 杜晨晖, 裴香萍, 等. 不同产地酸枣仁药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 67.

[责任编辑 顾雪竹]