

HPLC-ELSD 测定 GSSM 颗粒中酸枣仁 皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁

王燕, 柴程芝, 朱丹妮*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

[摘要] 目的:建立用 HPLC-ELSD 同时测定 GSSM 颗粒中酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁ 的方法。方法:采用 HPLC-ELSD 法,色谱柱 SUPELCO Discovery C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,ELSD 参数:漂移管温度 104 °C,载气流速 2.8 mL·min⁻¹。结果:该法加样回收率酸枣仁皂苷 A 为 98.67%,人参皂苷 Rb₁ 为 100.32%。结论:结果准确,重现性好,可作为控制 GSSM 颗粒质量的方法。

[关键词] GSSM 颗粒;酸枣仁皂苷;人参皂苷;高效液相色谱-蒸发散射法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0076-03

Determination of Jujuboside A and Ginsenoside Rb₁ in GSSM Granules by HPLC-ELSD

WANG Yan, CHAI Cheng-zhi, ZHU Dan-ni*

(Department of Traditional Chinese Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC-ELSD method for the determination of jujuboside A and ginsenoside Rb₁ in GSSM granules. **Method:** SUPELCO Discovery C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water as a mobile phase in a gradient program at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detector drift tube temperature was set at 104 °C and the nitrogen flow rate was 2.8 mL·min⁻¹. **Result:** The average recovery were 98.67% and 100.32% for jujuboside A and ginsenoside Rb₁ respectively. **Conclusion:** The method is accurate and reproducible, and can be used for quality control of GSSM granules.

[Key words] GSSM granules; jujuboside A; ginsenoside Rb₁; HPLC-ELSD

GSSM 颗粒是由《金匱要略》中经典古方酸枣仁汤去甘草,加西洋参、五味子而成。通过临床和药理学试验表明,GSSM 颗粒具有缓解精神压力,调节改善睡眠的复方保健作用。目前市面上已有的复方酸枣仁制剂大多只针对君药酸枣仁进行质量控制^[1-4],本研究参考相关文献选择了制剂中君药酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 和臣药西洋参中人参皂苷 Rb₁,建立了

同时测定这 2 种有效成分含量的 HPLC-ELSD 方法,为该制剂的质量控制标准提供参考。

1 仪器与试药

日本岛津高效液相色谱仪(岛津 LC-10AD 双泵、CLASS-VP 工作站),Alltech ELSD 2000ES 检测器,1/10 万电子天平(美国 Denver)。

酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁ 均购自南京泽朗医药科技有限公司(纯度 >98%),GSSM 颗粒(批号 100922,100923,100924)由河北承德雾灵药业提供,乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 SUPELCO Discovery C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水(A)-乙腈(B);

[收稿日期] 20110116(002)

[第一作者] 王燕,硕士研究生,研究方向:中药复方药效物质基础,E-mail: littlekiky_0808@163.com

[通讯作者] *朱丹妮,教授,Tel:025-86185158, E-mail: Danizhu@163.com

梯度洗脱程序为 0 min(72:28)~7 min(72:28)~13 min(66:34)~22 min(66:34)~25 min(55:45)~30 min(55:45)~40 min(72:28);流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温;蒸发光散射检测器条件,漂移管温度 104 °C,载气流速 2.8 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁ 对照品各适量,用甲醇溶解,配成 0.74 g·L⁻¹的酸枣仁皂苷 A 和 1.23 g·L⁻¹的人参皂苷 Rb₁ 混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研细(过 60 目筛),取约 10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,超声提取 40 min,放冷,过滤,滤液浓缩,残渣用 20 mL 水溶解,氯仿萃取 2 次,每次 20 mL,弃去氯仿层,水层用水饱和的正丁醇萃取 5 次,每次 20 mL,合并正丁醇层,氨试液洗涤 2 次,每次 20 mL,正丁醇饱和的水洗涤 2 次,每次 10 mL,正丁醇层蒸干,残渣用 5 mL 水溶解,固相萃取小柱(Supelclean™ LC-18 SPE)吸附,用水洗至 Molish 反应为阴性,后依次用 30 mL 30% 甲醇和 5 mL 纯甲醇洗脱,收集纯甲醇洗脱部分,浓缩至干,残渣甲醇定容于 5 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4 干扰试验 按处方量配制缺酸枣仁和西洋参的阴性对照样品,按含量测定项下方法,比较供试品溶液、对照品溶液、阴性对照品溶液的 HPLC 图,结果样品中酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁ 峰与其他组分色谱峰能较好分离,阴性对照样品中色谱峰对测定无干扰,见图 1。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品储备液适量,以甲醇稀释配制成酸枣仁皂苷 A 质量浓度为 0.027 8,0.046 2,0.092 5,0.111 0,0.185 0 g·L⁻¹,人参皂苷 Rb₁ 质量浓度为 0.046 1,0.076 9,0.153 8,0.184 5,0.307 5 g·L⁻¹的系列混合对照品溶液。取上述溶液分别注入液相色谱仪,进样量为 20 μL,测定。以峰面积对数值为纵坐标(Y),对照品进样量对数值为横坐标(X)绘制标准曲线,得酸枣仁皂苷 A 回归方程为 $Y = 1.73X + 2.79$ ($r = 0.9967$),人参皂苷 Rb₁ 回归方程为 $Y = 1.55X + 3.38$ ($r = 0.9978$)。结果表明,酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁ 分别在进样量为 0.56~3.70 μg 和 0.92~6.15 μg 与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

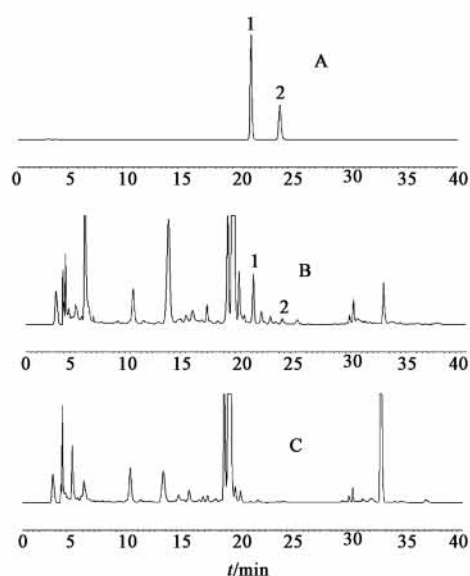


图 1 GSSM 颗粒色谱

A. 对照品;B. GSSM 颗粒;C. 阴性样品;

1. 人参皂苷 Rb₁;2. 酸枣仁皂苷 A

2.6 精密度试验 取一定浓度混合标准溶液,重复进样 6 次,进样量 20 μL,测得酸枣仁皂苷 A 质量分数的 RSD 1.82%,人参皂苷 Rb₁ 的 RSD 1.95%,结果表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批次 GSSM 颗粒(批号 20100922)6 份,每份 10 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,注入液相色谱仪,进样量 20 μL。结果显示,6 次测定样品中酸枣仁皂苷 A 质量分数 RSD 2.58% ($n = 6$),人参皂苷 Rb₁ 质量分数 RSD 1.74% ($n = 6$),酸枣仁皂苷 A 的质量分数平均值为 0.038 5 mg·g⁻¹,人参皂苷 Rb₁ 的质量分数平均值为 0.073 4 mg·g⁻¹。

2.8 稳定性试验 吸取供试品溶液,每间隔 2 h 进样 1 次,共进样 6 次,进样量 20 μL,酸枣仁皂苷 A 的 RSD 1.68%,人参皂苷 Rb₁ 的 RSD 1.64%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取 GSSM 颗粒 6 份,每份 5 g,精密称定,精密加入混和对照品储备液 0.28 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4 项下液相条件,注入液相色谱仪测定,进样量 20 μL,计算回收率。结果见表 1,2。

2.10 样品测定 取 3 批 GSSM 颗粒(批号 100922,100923,100924)按 2.2 和 2.4 项下样品制备方法和液相条件进行测定,进样量 20 μL,计算酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁ 的含量。结果见表 3。

表 1 酸枣仁皂苷 A 加样回收率测定 (n=6)

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	5.022 5	0.193 5		0.406 4	102.76		
2	5.087 4	0.196 0		0.398 5	97.74		
3	5.000 7	0.192 6		0.393 1	96.77		
4	5.104 4	0.196 6	0.207 2	0.399 7	98.02	98.67	2.30
5	5.042 3	0.194 2		0.393 6	96.23		
6	5.006 6	0.192 8		0.401 1	100.52		

表 2 人参皂苷 Rb₁ 加样回收率测定 (n=6)

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	5.022 5	0.368 5		0.710 2	99.21		
2	5.087 4	0.373 2		0.728 4	103.13		
3	5.000 7	0.366 9		0.717 0	101.65		
4	5.104 4	0.374 5	0.344 4	0.728 0	98.12	100.32	2.38
5	5.042 3	0.369 9		0.724 3	102.89		
6	5.006 6	0.367 3		0.701 0	96.90		

表 3 GSSM 颗粒样品含量测定 (n=3)

批号	酸枣仁皂苷 A /mg·g ⁻¹	人参皂苷 Rb ₁ /mg·g ⁻¹
100922	0.038 5	0.073 4
100923	0.039 8	0.076 2
100924	0.040 4	0.077 7

3 讨论

方中主要有效成分为皂苷类成分,传统的比色法仅能进行总皂苷含量的测定,专属性不强,而薄层扫描法受外界环境影响较大,高效液相法具有操作简单,灵敏度,精密度和准确度好的特点,且由于皂苷类成分大多没有紫外吸收,或仅在紫外末端有吸收,使用紫外检测器时,容易受到试剂和其他成分的

干扰^[5];而蒸发光散射检测器(ELSD)是质量型通用检测器,对无紫外或紫外末端吸收的大分子有机化合物的检测具有极大的优越性,对所有样品的检测几乎具有相同的响应因子,对未知物和纯度的测定要比紫外检测更容易更准确。ELSD 的检测是流动相被蒸发之后进行的,在梯度洗脱过程中基线较稳定,消除了低波长紫外检测中来自溶剂峰的干扰^[6]。

有文献报道采用 HPLC-UV 法在 203 nm 下检测保健食品中酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁^[7],在本实验过程中先后比较了紫外检测器和蒸发光散射检测器,综合考虑峰形、分离度、有无干扰等因素,最终确定以蒸发光散射检测器测定。

[参考文献]

- [1] 闵成军,徐敏,文永盛.宁心安神口服液中酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量测定[J].成都中医药大学学报,2007,30(1):63.
- [2] 马晓莹.神牡胶囊中酸枣仁皂苷 A 的含量[J].西北药学杂志,2010,25(1):30.
- [3] 李小安,张军科,史美佳,等.枣仁安神颗粒的质量标准研究[J].西北药学杂志,2008,23(4):216.
- [4] 隋宏,周慧玲,陈建峰,等.HPLC-ELSD 测定酸枣仁合剂中酸枣仁皂苷 A 的含量[J].现代食品与药品杂志,2007,17(6):35.
- [5] 温平,胡瑞君.植物中皂苷类成分的检测技术进展[J].价值工程,2010,20:113.
- [6] 张悦哈,甄汉深,成莉.蒸发光散射检测器(ELSD)应用概况[J].中华中医药学刊,2007,25(4):831.
- [7] 李素云,李蔚.HPLC 同时测定保健食品中酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁ 方法的研究[J].中国卫生检验杂志,2004,14(1):51.

[责任编辑 蔡仲德]