

RP-HPLC 双波长切换法同时测定复方酸枣仁颗粒中 芒果苷和斯皮诺素

田笑菲, 李清, 梁可, 刘莉, 陈晓辉, 毕开顺*
(沈阳药科大学 药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立复方酸枣仁颗粒中芒果苷和斯皮诺素含量测定的反相高效液相色谱方法。方法: 采用液-液萃取法纯化样品。采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-1% 冰醋酸水系统作为流动相, 梯度洗脱; 波长检测程序 0 ~ 25 min, 258 nm, 25 ~ 35 min, 335 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C。结果: 在上述色谱条件下, 测得芒果苷和斯皮诺素分别在 $4.320 \times 10^{-3} \sim 5.200 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9994$) 和 $5.200 \times 10^{-3} \sim 1.040 \times 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9997$) 线性关系良好; 芒果苷和斯皮诺素的平均回收率 ($n=9$) 分别为 94.6% (RSD 1.9%) 和 95.1% (RSD 2.3%)。结论: 方法操作简便, 准确, 重复性良好, 可用于复方酸枣仁颗粒的质量控制。

[关键词] 复方酸枣仁颗粒; 芒果苷; 斯皮诺素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0052-05

RP-HPLC Simultaneous Determination of Mangiferin and Spinosin in Ziziphus Jujuba Mill Granules under Double UV Wavelengths

TIAN Xiao-fei, LI Qing, LIANG Ke, LIU Li, CHEN Xiao-hui, BI Kai-shun*
(Shengyang Pharmaceutical University School of Pharmacy, Shengyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for determination of mangiferin and spinosin in Ziziphus Jujuba Mill granules. **Method:** Samples were purified by Liquid-Liquid extraction. Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase consisted of acetonitrile and water with 1% glacial acetic acid; the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. Detection wavelengths were set at 258 nm, and switched to 335 nm at 25 min. **Result:** The linear response ranges were $4.320 \times 10^{-3} \sim 5.200 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9994$) and $5.200 \times 10^{-3} \sim 1.040 \times 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9997$) for mangiferin and spinosin respectively. The average recoveries ($n=9$) of these compounds were 94.6% (RSD 1.9%) and 95.1% (RSD 2.3%) respectively. **Conclusion:** A simple, accurate and reproducible method is provided for simultaneous determination of mangiferin and spinosin in Ziziphus Jujuba Mill granules by RP-HPLC.

[Key words] Ziziphus jujuba mill granules; mangiferin; spinosin

复方酸枣仁颗粒是根据古方酸枣仁汤, 采用现代科学方法精制而成, 由酸枣仁、川芎、知母、茯苓、甘草 5 味中药组成, 具有养血安神, 清热除烦的功

效。现代药理研究表明, 酸枣仁汤中黄酮类成分和多糖类成分在抗焦虑方面有一定的协同作用, 其与抗焦虑作用关系最为密切^[1]; 君药酸枣仁中黄酮类

[收稿日期] 20110117(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-012)

[第一作者] 田笑菲, 硕士研究生, 从事中药复方制剂质量标准研究, Tel: 024-23986296, E-mail: sophietian0512@gmail.com

[通讯作者] * 毕开顺, 教授, 博士生导师, 从事中药化学模式识别、指纹图谱、中药药效物质基础和质量标准研究, Tel: 024-23986016, E-mail: bikaishun@yahoo.com

成分斯皮诺素具有重要的镇静、催眠作用^[2];臣药知母中黄酮成分芒果苷具有明显的镇静利胆作用^[3],斯皮诺素、芒果苷均为复方中重要的药效成分,并在复方制剂中含量较大。目前,对于酸枣仁汤及相关制剂有效成分测定多集中于酸枣仁中的酸枣仁皂苷A或B^[4-5],尚未见对于该制剂及汤剂中芒果苷和斯皮诺素的同时含量测定的报道。本实验采用RP-HPLC双波长切换同时测定制剂中芒果苷和斯皮诺素2种黄酮类成分,可为全面评价复方酸枣仁颗粒质量提供依据。

1 仪器与试剂

YL9120 UV-Vis Detector, YL9111 Binary Pump, YL-clarity 色谱工作站(韩国英麟公司)。芒果苷、斯皮诺素对照品由本教研室提供(纯度>98%)。复方酸枣仁颗粒剂(产品批号090803, 091018, 20100401)购自沈阳军区总医院;炒枣仁、茯苓、知母、川芎与甘草购自沈阳天益堂药店,粉碎,过60目筛。甲醇、乙腈(山东禹王实业有限公司)为色谱纯,冰乙酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)为色谱纯,无水乙醇、石油醚、正丁醇(天津市大茂化学试剂厂)为分析纯,水为二次重蒸水。

2 方法

2.1 对照品溶液制备 取芒果苷、斯皮诺素对照品适量,精密称定,分别置于10 mL量瓶中,分别加入稀乙醇和甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.432 0 g·L⁻¹的芒果苷对照品储备溶液和1.040 g·L⁻¹的斯皮诺素对照品储备溶液。

2.2 供试溶液的制备 称取复方酸枣仁颗粒约2.0 g,精密称定,置50 mL锥形瓶中,精密加入90%甲醇-水20 mL,超声提取30 min,滤过。挥干溶剂,残渣用20 mL水溶解,转移至125 mL分液漏斗中,加入石油醚20 mL萃取1次,弃去醚层,水层再加入水饱和正丁醇萃取3次,每次20 mL,收集正丁醇层,挥干正丁醇,残渣用流动相溶解,转移至10 mL量瓶中,定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液即得供试品溶液。

2.3 阴性对照溶液的制备^[6] 按处方量1/10(酸枣仁18 g,知母10 g,茯苓10 g,川芎5 g,甘草3 g)分别称取除酸枣仁外的4味药材、除知母外的4味药材、除酸枣仁和知母外的3味药材,以100 mL水浸泡一夜(12 h),回流提取2 h,滤过;残渣再加入100 mL水,继续回流提取1 h,滤过,再依法煎煮1

次。合并煎液,挥干。按上述方法制备缺酸枣仁阴性对照溶液、缺知母阴性对照溶液和缺酸枣仁及知母的阴性对照溶液。

2.4 色谱条件及系统适用性试验 采用Hypersil C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱;以1%冰醋酸水溶液(A)和乙腈(B)为流动相,进行梯度洗脱0~10 min,95%~91% A;10~18 min,91% A;18~22 min,91%~87% A;22~35 min,87%~86% A;检测波长0~25 min,258 nm,25~35 min,335 nm;流速1.0 mL·min⁻¹,进样量20 μL,柱温30℃。结果理论板数按斯皮诺素计算不低于6 000,分离度大于1.5,对称因子均在0.95~1.05。见图1。

2.5 线性关系考察 精密吸取芒果苷对照品储备液0.1,0.25,0.5,1.0,1.25 mL和斯皮诺素对照品溶液储备液0.05,0.1,0.25,0.5,1 mL置10 mL量瓶中,流动相稀释至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,精密吸取续滤液20 μL注入高效液相色谱仪,按2.4项下色谱条件进行测定,记录色谱图。以对照品溶液浓度(g·L⁻¹)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。结果表明,芒果苷在4.320×10⁻³~5.200×10⁻² g·L⁻¹,斯皮诺素在5.200×10⁻³~1.040×10⁻¹ g·L⁻¹均有良好的线性关系,回归方程分别为 $Y = 7.665 \times 10^4 X - 148.9$ ($r = 0.9994$)和 $Y = 1.453 \times 10^3 X + 47.24$ ($r = 0.9997$)。

2.6 精密度试验 精密吸取芒果苷和斯皮诺素混合对照品溶液。按2.4项下色谱条件连续进样6次,测得芒果苷和斯皮诺素峰面积的RSD分别为0.6%和0.8%。结果表明,精密度良好。

2.7 重复性试验 称取样品(产品批号20100401)6份,每份约2.0 g,精密称定。按2.2项下方法制备供试溶液,按2.4项下色谱条件测定,测得芒果苷和斯皮诺素含量的RSD分别为2.8%和1.3%。结果表明重复性良好。

2.8 稳定性试验 称取样品(产品批号20100401)约2.0 g,精密称定。按2.2项下方法制备供试溶液。分别于0,2,4,6,8,12,24 h测定,计算芒果苷及斯皮诺素峰面积的RSD分别为2.0%和1.4%。结果表明供试品溶液室温放置24 h稳定。

2.9 回收率试验 称取已知含量的复方酸枣仁颗粒样品(产品批号20100401)约1.0 g,共9份,精密称定,分别精密加入一定量的对照品,按2.2项下方法制备低、中、高浓度的样品,按2.4项下色谱条件

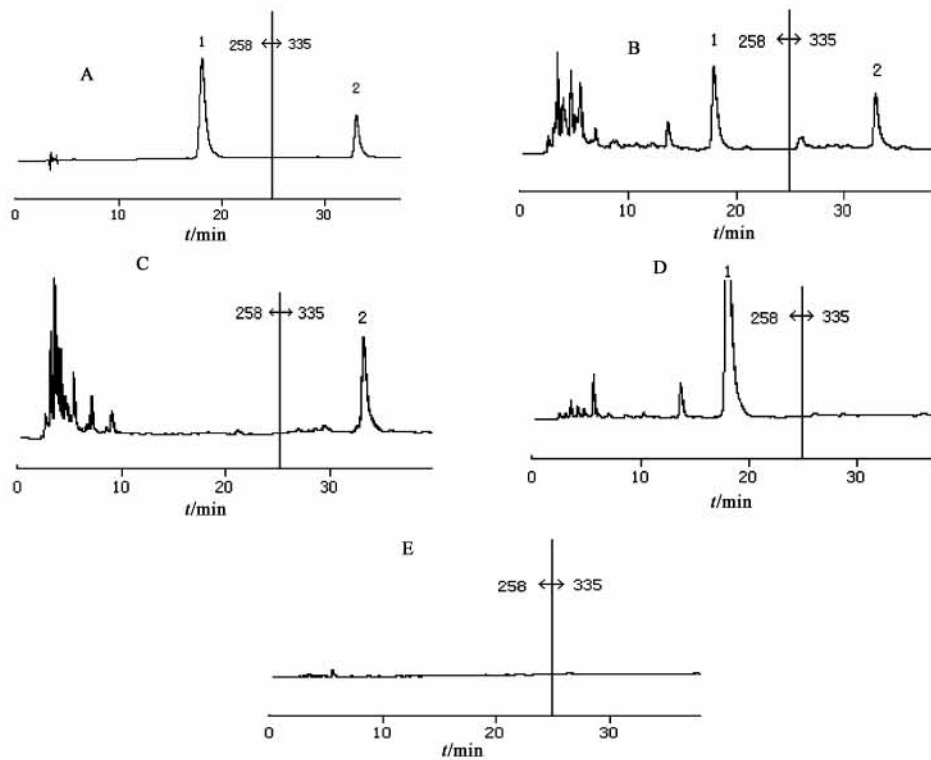


图 1 对照品 (A)、样品 (B)、缺知母阴性对照 (C)、缺酸枣仁阴性对照 (D)、缺知母和酸枣仁的阴性对照 (E)

1. 芒果苷; 2. 斯皮诺素

表 1 复方酸枣仁颗粒中加样回收率测定 (n=9)

成分	取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
芒果苷	1.003	0.158 3	0.124 2	0.276 8	95.4	94.6	1.9
	1.002	0.158 1		0.273 5	92.9		
	1.002	0.158 1		0.277 5	96.1		
	1.000	0.157 8	0.155 5	0.303 3	93.6		
	1.001	0.158 0		0.306 7	95.7		
	1.001	0.158 0		0.301 2	92.1		
	1.008	0.159 1	0.190 1	0.344 0	97.3		
	1.001	0.158 0		0.334 1	92.7		
	1.007	0.158 9		0.341 0	95.8		
斯皮诺素	1.003	0.159 3	0.127 6	0.277 3	92.5	95.1	2.3
	1.002	0.159 2		0.280 0	94.6		
	1.002	0.159 2		0.282 7	96.8		
	1.000	0.158 8	0.159 0	0.307 6	93.5		
	1.001	0.159 0		0.314 6	97.8		
	1.001	0.159 0		0.313 7	97.3		
	1.008	0.160 1	0.190 3	0.345 6	97.4		
	1.001	0.159 0		0.335 8	92.9		
	1.007	0.160 0		0.337 8	93.4		

测定,记录色谱峰面积,计算加样回收率。结果见表1,芒果苷平均回收率为94.6%,RSD 1.9%;斯皮诺素平均回收率为95.1%,RSD 2.3%。

2.10 结果 取复方酸枣仁颗粒3批,平行制备3份,按2.2项下方法制备样品溶液,按2.4项下色谱条件测定。结果见表2。

表2 复方酸枣仁颗粒测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	芒果苷	斯皮诺素
090803	0.151 7	0.131 3
091018	0.202 6	0.224 5
20100401	0.159 6	0.155 1

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的优化 考察了超声和回流2种提取方式。经考察,回流提取方法繁琐且提取率不高,超声方法简便快捷,且提取完全,故采用超声提取方法;考察甲醇、乙醇、水为提取溶剂,结果表明,甲醇提取率最高;考察90%,70%,50%,30%甲醇,结果表明90%甲醇提取率最高;考察超声时间分别为10,20,30,40,50 min,经考察,30 min时芒果苷及斯皮诺素提取完全,提取率达到最高,因此采用30 min作为提取时间;采取液-液萃取方式排除干扰峰,分别考察了石油醚、水饱和正丁醇的萃取次数,表明,石油醚萃取1次,水饱和正丁醇萃取3次,可使干扰峰明显减少,且重复性良好。

3.2 测试条件的优化

3.2.1 波长选择 在《中国药典》2010年版(一部)中,酸枣仁和知母药材含量测定项下,斯皮诺素的检测波长为335 nm,芒果苷的检测波长为258 nm。在这2个波长下,2种物质的紫外吸收强。因此,采用双波长切换同时测定斯皮诺素和芒果苷,根据流动相洗脱程序确定检测波长程序为,0~25 min,258 nm;25~35 min,335 nm。

3.2.2 流动相选择 考察甲醇-磷酸水系统,甲醇-冰醋酸水系统,乙腈-冰醋酸水系统,最终确定乙腈-1%冰醋酸水系统,峰型较好,改善拖尾现象,在保证分离度的情况下使保留时间提前。

3.2.3 色谱柱及柱温的选择 考察了Kromasil C_{18} (Zhonghuida, Dalian, China), Hypersil ODS2 (Elite,

Dalian, China) 和 Luna C_{18} (Phenomenex, USA) 3种色谱柱。表明,仅Hypersil ODS2可使斯皮诺素与前面的干扰峰分开,分析原因可能与色谱柱中硅醇基封尾程度有关,Hypersil ODS2内固定相为ODS2,大部分端基封尾;而Kromasil C_{18} 非端基封尾,有大量裸露的硅羟基;Luna C_{18} 为完全端基封尾,故选择Hypersil ODS2 (Elite, Dalian, China)色谱柱。考察了柱温25,30,35 $^{\circ}\text{C}$ 对保留行为的影响,结果表明,柱温在30 $^{\circ}\text{C}$ 较25 $^{\circ}\text{C}$ 保留时间提前2 min,且分离效果基本一致,35 $^{\circ}\text{C}$ 色谱峰扩散严重,故采用柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.3 结论 建立双波长切换法测定了复方酸枣仁颗粒剂中芒果苷和斯皮诺素含量的RP-HPLC方法,结果表明该方法简单可靠,可用于复方酸枣仁颗粒中的芒果苷和斯皮诺素的测定;采用液-液萃取方法处理样品,不需要复杂仪器设备,重复性良好,可在实验室中广泛使用。以此方法对3个生产批次的复方酸枣仁颗粒进行测定,结果表明,可能由于药材或者中间体的储藏时间或者制备工艺的改进使3个生产批次的样品中芒果苷和斯皮诺素的含量有差别,但含量分别均大于0.150 0,0.100 0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,其含量对药效作用的影响需进行药效学实验来确定。

[参考文献]

- [1] 王守勇,谢鸣,王欣. 酸枣仁汤组分与抗焦虑效用的相关性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3):104.
- [2] 袁昌鲁,王中博,焦莹,等. 酸枣仁中黄酮类镇静催眠有效成分的研究[J]. 中药通报,1987,12(9):34.
- [3] 王育虎. 酸枣仁汤镇静催眠作用机理研究[D]. 济南:山东中医药大学,2007.
- [4] 周庆武,李玲玲,纪标,等. 反相高效液相色谱法测定酸枣仁颗粒中酸枣仁皂苷A与酸枣仁皂苷B的含量[J]. 时珍国医国药,2008,19(3):718.
- [5] 于连,于敏,焦淑清. 高效液相色谱法测定睡安口服液酸枣仁皂苷A和酸枣仁皂苷B的含量[J]. 时珍国医国药,2008,19(2):1059.
- [6] 高声传,郭涛,夏维杰,等. 复方酸枣仁汤颗粒的制备与质量控制[J]. 中国药师,2005,8(3):203.

[责任编辑 蔡仲德]

HPLC-ELSD 测定黄芪提取物中黄芪皂苷 I, II 及乙酰黄芪皂苷

赵强强¹, 韩丽^{1*}, 欧水平¹, 潘媛¹, 王森¹, 杨明^{1,2*}

- (1. 成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137;
2. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 研究以 HPLC-ELSD 法测定黄芪提取物中黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 的含量。方法: 色谱柱为 Welc C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈和水, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 漂移管温度 80 °C, 气体(空气)压力为 50 psi。结果: 黄芪皂苷 I, II, 乙酰黄芪皂苷 I 的平均回收率分别为 101.16%, 99.34%, 100.43%, RSD 分别为 2.76%, 2.28%, 2.55%, 含量分别为 4.01%, 1.70%, 3.67%。结论: 方法简单易行, 结果可靠, 分离效果好, 可作为黄芪提取物中皂苷类成分定量的方法。

[关键词] 黄芪提取物; 黄芪皂苷; 含量; 高效液相-蒸发光散射检测

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0056-03

Determination of Astragaloside I, II and Acetytastragaloside I in Astragalus Extract by HPLC-ELSD

ZHAO Qiang-qiang¹, HAN Li^{1*}, OU Shui-ping¹, PAN Yuan¹, WANG Miao¹, YANG Ming^{1,2*}

- (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Chengdu 611137, China;
2. Key Lab for Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education of China, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method to determine the content of astragaloside I, II and acetylastragaloside I in *Astragalus* extract. **Method:** The HPLC-ELSD system consisted of Welc C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile-water using a gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was at 30 °C. The drift tube temperature of ELSD was 80 °C with a carrier gas (air) pressure of 50 psi. **Result:** The average recoveries of astragaloside I, II and acetylastragaloside I were 101.16%, 99.34% and 100.43% respectively, with RSD of 2.76%, 2.28%, 2.55%. The content of astragaloside I, II and acetylastragaloside I was 4.01%, 1.70%, 3.67% respectively. **Conclusion:** It was proved that the newly-established HPLC-ELSD method was simple, reliable, well-separated and precise, which could be used for quantitative analysis of saponins in *Astragalus* extract.

[Key words] *Astragalus* extract; astragaloside; content; HPLC-ELSD

[收稿日期] 20110103(002)

[基金项目] 国家科技“重大新药创制”专项(2009ZX09103-307)

[第一作者] 赵强强, 硕士, 研究方向: 中药新剂型、新制剂, Tel: 13541076039, E-mail: zhaoqiangdengni@126.com

[通讯作者] * 韩丽, 副教授, 博士, 从事中药新制剂新技术研究, E-mail: hanliy@163.com, Tel: 028-61800127