

高效液相色谱-蒸发光散射测定柴芩清肝方提取物中柴胡皂苷 a 的含量

付克, 王建宫, 闫广利

(黑龙江中医药大学中药研究院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:建立柴芩清肝方提取物中柴胡皂苷 a 的含量测定方法。方法:采用 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL · min⁻¹,蒸发光散射检测器进行检测,漂移管温度 105 °C,氮气流速 2.0 L · min⁻¹。结果:柴胡皂苷 a 进样量在 1.7 ~ 8.5 μg 与峰面积对数线性关系良好($r=0.9994$),平均回收率为 96.6%,RSD 1.8% ($n=5$)。结论:方法专属性强、准确、快速,适用于柴芩清肝方提取物中柴胡皂苷 a 的含量测定。

[关键词] 高效液相色谱-蒸发光散射检测法;柴胡皂苷 a;柴芩清肝方提取物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)02-0057-03

Determination of Saikosaponin A in Chaiqin Qinggan Formula Extract by HPLC-ELSD

FU Ke, WANG Jian-gong, YAN Guang-li

(Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of saikosaponin A in the extract of Chaiqin Qinggan formula. **Method:** The column of Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-water with a gradient elution program with the flow rate at 1.0 mL · min⁻¹. The evaporative light scattering detector (ELSD) was used as detector. Drift tube temperature was at 105 °C, and the gas flow rate was 2.0 L · min⁻¹. **Result:** The logarithmic calibration curves were linear in the range of 1.7-8.5 μg ($r=0.9994$). The average recovery was 96.6% with the RSD value of 1.8% ($n=5$). **Conclusion:** The method can be used to determine the content of saikosaponin a in the extract of Chaiqin Qinggan formula.

[Key words] HPLC-ELSD; saikosaponin a; Chaiqin Qinggan formula extract

柴芩清肝方由柴胡、黄芩、甘草、芍药等中药组成,具有疏肝解郁、清热解毒的功效,为临床治疗肝炎的有效方剂。方中柴胡疏肝解郁、透达郁热为君,其中柴胡皂苷 a 是其活性成分,具有抗炎、保肝、免疫调节等药理活性^[1]。为了更好地控制药品的内在质量,保证临床疗效,本试验采用高效液相色

谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)建立了柴芩清肝方提取物中柴胡皂苷 a 的含量测定方法,为本品质量控制提供依据。

1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪、Empower 色谱工作站(美国);2000ES 蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司);1/10 万分析天平,湘仪天平仪器厂)。柴胡皂苷 a 对照品(上海融禾医药科技发展有限公司提供,纯度大于 98%);色谱乙腈(Dikma 公司);水为 Milli-Q 超纯水;其他试剂均为分析纯。

柴芩清肝方提取物按照文献方法制备^[2]。

[收稿日期] 20100831(002)

[基金项目] 黑龙江省科技攻关项目资助(GC08C322)

[通讯作者] 付克,男,副研究员,硕士研究生导师,研究方向:中药及复方质量标准和新药研究, Tel: 0451-82195914, E-mail: fuke841213@sina.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为水, 梯度洗脱, 程序为 0 ~ 20 min, A (40% ~ 50%); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 蒸发光散射检测器漂移管温度为 105 °C, 气体流速为 2.0 L · min⁻¹; 进样体积 20 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取柴胡皂苷 a 对照品 8.50 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解制成 0.34 g · L⁻¹ 的溶液。

2.3 供试品溶液制备 取本品研细, 取粉末约 1 g, 精密称定, 用 5% 氨水甲醇溶液 (5 mL 浓氨水用甲醇稀释至 100 mL) 30 mL 回流提取 30 min, 过滤, 残渣用 5% 氨水甲醇溶液少量多次洗涤, 洗液一并过滤, 滤液水浴蒸干, 残渣加水 15 mL 使溶解, 置于分液漏斗中, 用水饱和的正丁醇萃取 4 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇层, 用正丁醇饱和的氨试液洗涤 2 次, 每次 30 mL, 弃去氨液, 正丁醇液蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 阴性对照液制备 按处方比例, 取去除柴胡外的其他味药材, 按柴芩清肝方提取物提取工艺同法制备阴性制剂^[2], 再按 2.3 项下方法操作, 制成阴性溶液。

2.5 专属性试验 分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 见图 1。结果表明, 与对照品色谱相同位置上, 具有相同保留时间的色谱峰, 阴性液无干扰。

2.6 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μL, 注入高效液相色谱仪, 按前述色谱条件测定, 以进样量 (μg) 的自然对数值为纵坐标 (Y), 峰面积的自然对数值为横坐标 (X), 进行线性回归, 结果回归方程为 $Y = 1.628 3X + 10.665 4$, 相关系数 $r = 0.999 4$ 。表明柴胡皂苷 a 在 1.7 ~ 8.5 μg 线性关系良好。

2.7 精密度试验 取对照品溶液, 连续进样 5 次, 每次 20 μL。结果柴胡皂苷 a 峰面积 RSD 1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取供试品溶液, 在制备后 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 分别进样 20 μL, 柴胡皂苷 a 在各时间点的峰面积 RSD 1.9%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

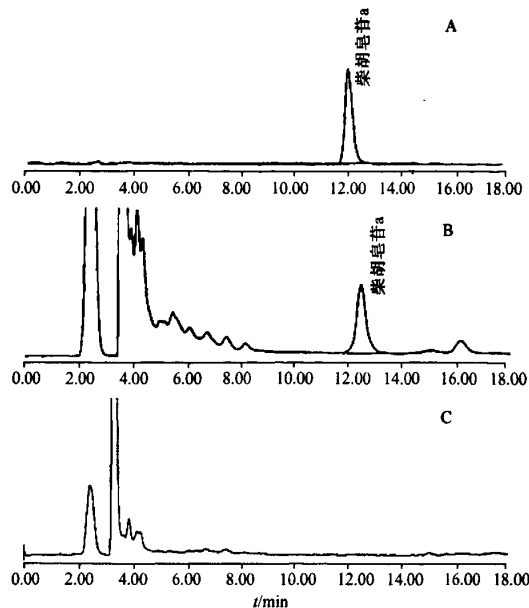


图 1 柴芩清肝方提取物中柴胡皂苷 a 含量测定的高效液相色谱图
A. 柴胡皂苷 a 对照品; B. 柴芩清肝方提取物; C. 缺柴胡阴性

2.9 重现性试验 取同一批样品, 按 2.3 项平行制备 5 份供试品溶液, 测定柴胡皂苷 a 的含量, 结果各样品中柴胡皂苷 a 的含量基本一致, 平均含量为 1.493 2 g · L⁻¹, RSD 2.5%, 表明方法重现性较好。

2.10 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品粉末 5 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 置于烧瓶中, 精密加入柴胡皂苷 a 对照品溶液 2.2 mL, 挥干溶剂, 再加入 5% 氨水甲醇溶液 30 mL, 按 2.3 项下方法制备成供试品溶液, 外标两点法对数方程计算含量, 并计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 柴芩清肝方提取物中柴胡皂苷 a 的加样回收率

No.	取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.504 3	0.753 0	0.748	1.468 2	95.6		
2	0.502 4	0.750 2	0.748	1.473 8	96.7		
3	0.503 0	0.751 1	0.748	1.459 3	94.6	96.6	1.8
4	0.507 0	0.757 1	0.748	1.480 9	96.7		
5	0.501 3	0.748 5	0.748	1.490 6	99.2		

2.11 样品测定 按供试品溶液制备项下方法制备, 精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积, 外标两点法对数方程计算含量, 结果 3 批柴芩清肝方提取物中柴胡皂苷 a 分别为 1.493 2, 1.530 3, 1.542 8 mg · g⁻¹, RSD 1.7%。

3 讨论与结论

柴胡皂苷 a 为齐墩果烷型三萜皂苷,分子结构中仅有一个双键,仅在紫外末端有较弱的吸收,因此有关柴胡皂苷 a 的 HPLC-UV 测定方法,多采用 203 nm 左右作为检测波长^[3,4]。这种方法对于柴胡单味药材中柴胡皂苷 a 的测定尚可满足,而对于中药复方的复杂化学体系来说,由于其他成分的严重紫外吸收干扰,很难获得柴胡皂苷 a 的有效检测。蒸发光散射检测器(ELSD)是一种通用检测器,其最大优越性在于能检测不含发色团的化合物,因而极大地拓宽了 HPLC 在中药及其复方制剂检测中的应用,现已在很多皂苷类成分的检测中已获得应用^[5,6],在柴胡皂苷的检测中也有报道^[7,8]。本试验对漂移管温度和气体流速进行考察,确定了本文中所采用的参数,与文献报道的检测参数设置有所不同。

柴胡皂苷 a 经酸处理易形成柴胡皂苷 b₁,后者无抗炎活性,为保护柴胡皂苷 a 不被转化,在供试品溶液制备过程中采用 5% 氨水甲醇溶液提取。

本试验采用梯度洗脱,减小了柴胡皂苷 a 峰的峰宽,使峰型尖锐,峰面积测定准确。

[参考文献]


[1] 吴明芳. 中药柴胡中的有效成分及其药理作用研究进

展[J]. 中华中西医杂志,2010,8(6):32.

- [2] 付克,张坤,闫广利. 多成分评价优化柴苓清肝方提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):10.
- [3] 李媛媛,秦雪梅,王玉庆,等. 北柴胡皂苷类成分的特征(指纹)图谱研究[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(11):1500.
- [4] 肖蓉,王春英,张志斐,等. 河北道地药材北柴胡 HPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 中药材,2006,29(2):119.
- [5] 石威,王玉堂,权新军,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定人参根中人参皂苷的含量[J]. 分析化学,2006,34(2):243.
- [6] 宗鸣,郭靖,王和平. 高效液相-蒸发光散射法测定解毒维康胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(5):19.
- [7] 刘伟,郭蕾,范婷,等. 生长期不同施肥方法对柴胡中柴胡皂苷 a、d 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):18.
- [8] 宋宏刚,许红辉,裴彩云,等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定柴胡中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的含量[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):1963.

[责任编辑 顾雪竹]

a 的含量

作者: [付克](#), [王建宫](#), [闫广利](#), [FU Ke](#), [WANG Jian-gong](#), [YAN Guang-li](#)
 作者单位: [黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨, 150040](#)
 刊名: [中国实验方剂学杂志](#) 
 英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF EXPERIMENTAL TRADITIONAL MEDICAL FORMULAE](#)
 年, 卷(期): 2011, 17(2)

参考文献(16条)

1. [宋宏刚;许红辉;裴彩云](#) 高效液相色谱-蒸发光散射法测定柴胡中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷d的含量 2006(10)
2. [吴明芳](#) 中药柴胡中的有效成分及其药理作用研究进展 2010(6)
3. [刘伟;郭蕾;范婷](#) 生长期不同施肥方法对柴胡中柴胡皂苷 a、d含量的影响 2010(10)
4. [付克;张坤;闫广利](#) 多成分评价优化柴芩清肝方提取工艺研究 2010(7)
5. [宗鸣;郭靖;王和平](#) 高效液相-蒸发光散射法测定解毒维康胶囊中黄芪甲苷的含量[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2006(05)
6. [李媛媛;秦雪梅;王玉庆](#) 北柴胡皂苷类成分的特征(指纹) 图谱研究 2007(11)
7. [石威;王玉堂;权新军](#) 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定人参根中人参皂苷的含量[期刊论文]-[分析化学](#) 2006(02)
8. [肖蓉;王春英;张志斐](#) 河北道地药材北柴胡 HPLC-UV指纹图谱研究 2006(2)
9. [肖蓉;王春英;张志斐](#) 河北道地药材北柴胡 HPLC-UV指纹图谱研究 2006(02)
10. [石威;王玉堂;权新军;白立飞;张华蓉;陈晓东;丁兰;张寒琦](#) 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定人参根中人参皂苷的含量 2006(2)
11. [李媛媛;秦雪梅;王玉庆](#) 北柴胡皂苷类成分的特征(指纹) 图谱研究 2007(11)
12. [宗鸣;郭靖;王和平](#) 高效液相-蒸发光散射法测定解毒维康胶囊中黄芪甲苷的含量 2006(5)
13. [付克;张坤;闫广利](#) 多成分评价优化柴芩清肝方提取工艺研究[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2010(07)
14. [刘伟;郭蕾;范婷](#) 生长期不同施肥方法对柴胡中柴胡皂苷 a、d含量的影响 2010(10)
15. [吴明芳](#) 中药柴胡中的有效成分及其药理作用研究进展 2010(06)
16. [宋宏刚;许红辉;裴彩云](#) 高效液相色谱-蒸发光散射法测定柴胡中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷d的含量 2006(10)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgsyfjxzz201102016.aspx