

表 3 样品测定结果 (n=3)

组份	081114		090402		090605		090921	
	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%	含量/(mg/g)	RSD/%
淫羊藿苷	0.338	2.36	1.768	0.85	0.691	0.73	0.565	2.65
柚皮苷	0.244	0.82	0.345	1.74	0.351	2.84	0.391	2.30

3 讨论

由于柚皮苷和淫羊藿苷性质差异较大,为了使两组分能按各自适宜的容量因子 k 达到良好的分离目的,以不同比例的乙腈-水为流动相对色谱条件进行考察。结果表明,当流动相为乙腈-水的起始浓度为 25:75 时,各组份能达到较好的分离。采用乙腈-水单一比例测定淫羊藿苷约 10 min^[1],但柚皮苷不能很好分离。骨碎补药材中新北美圣草苷和柚皮苷的含量同时测定用时为 20 min^[3],本方法 2 组分同时测定用时约 20 min,缩短了多组份检测的分析时间。进一步的对比研究发现,梯度洗脱可以消除杂质对被测成分的干扰,避免因使用聚酰胺进行净化处理^[1]导致被测成分的损失,大大节省了样品制备的时间及溶剂,适于全面评价补肾壮骨颗粒的质量。

淫羊藿苷的最大吸收波长为 270 nm,柚皮苷的最大吸收波长为 285 nm,本实验考察了在波长为 270 及 285 nm 条件下的吸收图谱,发现在 285 nm 单一波长下,淫羊藿苷及柚皮苷同时可以得到较好的色谱峰。也可用双通道检测,在 270 nm 波长下检测淫羊藿苷,在 285 nm 下波长检测柚皮苷。

本次实验对不同批次补肾壮骨颗粒含量进行测定,结果显示,不同批次样品之间淫羊藿苷含量差异较大,与笔者之前的报道^[1]不相符,主要原因是报道中的 3 批样品均使用同一批次药材制备,而本次实验的样品使用不同批次药材制备,但市面上淫羊藿药材的质量参差不齐,笔者测定不同批次的淫羊藿药材,淫羊藿苷含量差异可达到 10 倍以上,因此控制原药材质量,是保证中药制剂质量的根本措施。

参考文献:

[1] 韩丽萍,梁 达,刘志刚,等. 补肾壮骨颗粒质量标准的研究[J]. 解放军药学学报, 2009, 25(2):145-147.
 [2] 李 超,葛 洁,鹿秀梅,等. RP-HPLC 法测定骨疏丹颗粒中 5 种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008(9):728-731.
 [3] 李遇伯,孟繁浩,李发美,等. HPLC 同时测定骨碎补药材中新北美圣草苷和柚皮苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(6):808-810.

HPLC-ELSD 法测定希明婷片中 27-脱氧升麻亭的含量

陈 丽^{1,2}, 程屹俊^{3,2}, 梁琼麟², 王义明², 由春娜⁴, 董 敏⁵, 罗国安^{2,3*}

(江西中医学院药学院,江西 南昌 330004; 2. 清华大学中药现代化研究中心,北京 100084; 3. 华东理工大学中药现代化工程中心,上海 200237; 4. 北京北大维信生物科技有限公司,北京 100080; 5. 山东绿叶制药有限公司,山东 烟台 264003)

关键词:希明婷片; 27-脱氧升麻亭; RID; ELSD

摘要:目的:建立希明婷片中 27-脱氧升麻亭的 HPLC-ELSD 含量测定的方法。方法:色谱柱为资生堂 MG C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm);流速:1 mL/min;流动相体系为乙腈和水;检测器:蒸发光散射检测器 梯度洗脱 柱温:30 ℃,干燥气流速:2.9 L/min,漂移管温度:115 ℃。结果:27-脱氧升麻亭在 1.67 ~ 13.40 μg 之间线性关系良好(r² = 0.999 7) 检测限为 0.100 μg 定量限为 0.904 μg,重复性良好(RSD = 4.94%),样品的加样平均回收率为 102.20%,相对标准偏差为 2.68%。结论:该法简便、重复性和准确性好,适用希明婷片中 27-脱氧升麻亭的含量测定。同时,可为希明婷片的质量控制提供参考。

中图分类号:R927.2

文献标识码:B

文章编号:1001-1528(2011)01-0186-03

希明婷片是由升麻总皂苷经辅料加工而成,主要用于女性围绝经期综合征,改善烘热汗出、烦躁易怒等症^[1-2]。文

收稿日期:2010-06-13

作者简介:陈 丽(1986 -),女,硕士研究生,研究方向:药物化学。

* 通讯作者:罗国安,教授,博士生导师,研究方向:中药现代化研究。Tel:(010) 62781688 E-mail:luoga@tsinghua.edu.cn

文献报道升麻中三萜皂苷具有调节内分泌的作用^[3], Erdal Berdir 和 Ikhlal A. Khan 从升麻中分离出 27-脱氧升麻亭^[4]。故本实验选择以三萜皂苷中的 27-脱氧升麻亭为指标成分控制希明婷片的质量。

目前,紫外检测器(UVD)、示差折光检测器(RID)、蒸发光散射检测器(ELSD)、质谱检测器(MSD)是检测中药成分质量常用的4种检测器,其中紫外检测器只能用于有紫外吸收的物质的分析,其余3种检测器均为通用型检测器,可用于未知物、糖类、脂肪烃、其他无紫外吸收物质等的分析。3种通用型检测器中,RID和ELSD与MSD相比,因价格更便宜,应用相对更广。27-脱氧升麻亭为无紫外吸收物质,可采用常用的通用型检测器(RID、ELSD、MSD)进行检测,因MSD昂贵,不宜采用。文献[5]中有报道采用示差折光检测器测定升麻药材中27-脱氧升麻亭的质量,但未曾见采用蒸发光散射检测器法测定。本实验建立了采用HPLC-ELSD法测定希明婷片中27-脱氧升麻亭的含量的方法,并比较了ELSD和RID两种检测器对测定27-脱氧升麻亭的影响。

1 材料和试剂

0.45 μm 微孔滤膜;资生堂 MG C₁₈ 柱;乙腈(色谱纯, fisher 公司);超纯水(Milli Q Synthesis 超纯水纯化系统制过 0.2 μm 微孔滤膜)。无水甲醇(分析纯,北京化工厂生产);27-脱氧升麻亭标准品(山东绿叶制药有限公司提供);希明婷片(山东绿叶制药有限公司,批号:20070329、20071143、20081234、20090742)。

BS110S 电子天平(d=0.1 mg,赛多利斯公司);XP205 型电子天平(d=0.01 mg,梅特勒托利多公司);Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(配备 Alltech N2000 蒸发光散射检测器,N2000 色谱数据工作站);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率 500 W,频率 40 KHz);MilliQSynthesis 超纯水纯化系统。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 资生堂 MG C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm) 流动相:水-乙腈梯度洗脱(见表 1),流速:1 mL/min,柱温:30 °C,气体(氮气)流速:2.9 L/min,漂移管温度:115 °C。对照品溶液和供试品溶液各 20 μL。理论塔板数以 27-脱氧升麻亭峰计不低于 5 000。结果见图 1~2。

表 1 梯度条件

时间/min	乙腈/%	水/%
0	29	71
20	38	62
30	38.8	61.2
50	38.8	61.2

2.2 希明婷片供试品溶液的制备 取 10 片希明婷片,研细后,取 200 mg 希明婷片粉末,精密称定。置 25 mL 量瓶中,量取 20 mL 甲醇,超声溶解 30 min 后,甲醇定容至刻度。过 0.45 μm 微孔滤膜,所得滤液即为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 称取对照品 27-脱氧升麻亭 6.70 mg,甲醇溶解,定容至 10 mL 量瓶中,得对照品溶液。

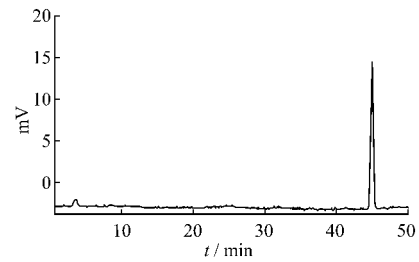


图 1 27-脱氧升麻亭的 HPLC-ELSD 图谱

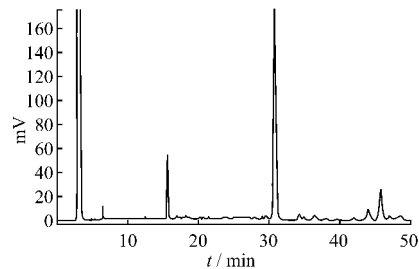


图 2 希明婷片的 HPLC-ELSD 图谱

2.4 线性关系考察 分别精密量取 1.5、1.25、0.75、0.45、0.25 mL 的对照品溶液至 2 mL 量瓶中,甲醇稀释定容,即得 6 个不同浓度的对照品溶液。按 2.1 项下的色谱条件测定,以对照品进样量的对数值为横坐标,以峰面积值的对数值为纵坐标,进行回归,标准曲线为: $Y = 1.4454X + 4.961$, $r^2 = 0.9997$,其线性范围为 1.67 ~ 13.40 μg。

2.5 最低检测限及定量限试验 采用信噪比法检测 27-脱氧升麻亭的检出限及定量限。以信噪比为 3:1 时相应浓度确定其检测限,以信噪比大于或等于 10:1 且能准确定量时的相应浓度确定其定量限。

将 27-脱氧升麻亭对照品溶液稀释一定倍数,进样 20 μL,得到 27-脱氧升麻亭的检出限及定量限,检测限为: 0.100 μg,定量限为: 0.904 μg。

2.6 精密度实验 取 1 个 27-脱氧升麻亭对照品溶液分别连续进样 6 次及 6 日内每日进样一次,分别计算 6 次所测的组分峰面积及相对标准偏差(RSD%),日内精密度的 RSD 为 4.18%,日间精密度的 RSD 为 4.71%。结果表明该仪器精密度良好。

2.7 稳定性实验 取同一份供试品溶液,分别于 0、3、6、20、22、24 h 不同时间间隔点进样分析,对峰面积进行考察,峰面积的 RSD 为 3.43%。结果显示样品溶液至少在 24 h 稳定。

2.8 重复性实验 取同一批希明婷片(批号 20090742,每片的平均重量为 101.93 mg)按供试品溶液制备方法制备 6 份,每份样品进样 2 针,每针进样量 20 μL。以分别计算 27-脱氧升麻亭的含量(外标两点对方程计算)及 RSD(%),结果其平均含量为 2.61%,RSD 为 4.94%,表明该方法重现性良好。

2.9 加样回收率实验 取同一批希明婷片(批号: 20090742)按 2.2 项供试品溶液的制备方法,平行制备 9 份样品,每 3 份样品分别加入高(120%)、中(100%)、低

(80%) 3个不同每个样品按照2.1项色谱条件,分别测定其色谱图,计算其27-脱氧升麻亭的加样回收率,结果表明平均加样回收率为102.20%,RSD为2.68%(n=9),说明该方法准确度良好(见表2)。

表2 27-脱氧升麻亭的加样回收率实验结果

称样量/mg	样品含量/mg	加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
225.5	5.89	4.76	10.90	105.25		
202.8	5.30	4.20	9.64	103.33		
187.5	4.89	3.89	8.67	97.17		
212.3	5.54	5.51	11.20	102.72		
211.6	5.52	5.58	11.21	101.97	102.24	2.69
214.8	5.61	5.62	11.31	101.42		
219.9	5.74	6.99	13.13	105.72		
205.8	5.37	6.43	11.74	99.07		
213.7	5.58	6.82	12.64	103.52		

2.10 样品测定 取3批希明婷片,按2.2项供试品溶液制备方法制备。按2.1项下的色谱条件分析对照品溶液和供试品溶液,每批希明婷片重复测定3次,按外标法计算各样品中27-脱氧升麻亭的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3)

批号	平均片重/mg	样品质量/mg	27-脱氧升麻亭含量/(mg/片)	27-脱氧升麻亭含量均值/(mg/片)	RSD/%
		200.7	2.68		
20070329	100.2	202.4	2.70	2.73	2.77
		206.5	2.82		
		202.7	2.96		
20071143	102.9	200.4	2.87	2.93	1.88
		201.3	2.97		
	100.1	200.9	3.10	3.10	2.58
20081234		202.1	3.18		
		201.5	3.02		

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备 采用不同浓度的甲醇溶解升麻总皂苷提取物,结果发现,升麻总皂苷提取物在甲醇中溶解最好。此外,采用甲醇超声溶解希明婷片粉末10 min、20 min、30 min、45 min,发现甲醇超声溶解30 min后,升麻总皂苷即提取完全。

3.2 检测器的选择 本研究预实验比较了RID和ELSD在相同色谱条件下(等度洗脱:乙腈-水=40:60)分析样品时所得色谱图,见图3和图4。结果显示,ELSD所得图谱基线更稳定、噪音干扰更小;而且,ELSD的检测没有流动相的限制,且可以梯度洗脱,因而本实验采用ELSD作为27-脱氧升麻亭含量测定的检测器。

3.3 洗脱梯度及色谱柱的选择 采用不同等度洗脱和梯度洗脱条件分析样品时,等度洗脱虽然分析时间短,但27-脱氧

升麻亭和相邻峰的分离情况对色谱柱的耐用性差,故最终确定表1中所列洗脱梯度为最终洗脱梯度。在该洗脱梯度下,27-脱氧升麻亭的峰形和分离度都较好,且采用Agilent C₁₈柱、Phenomenex C₁₈柱、Agela C₁₈柱等色谱柱在相同色谱条件下分析样品时,27-脱氧升麻亭均获得较好的分离。且样品溶液中其它色谱峰的峰形和分离度也较好,为希明婷片其它成分的定量提供参考方法。

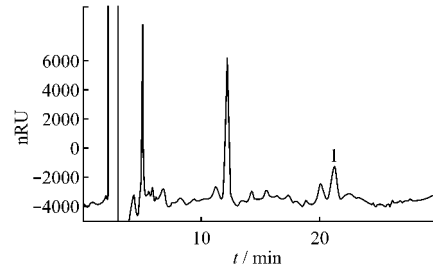


图3 等度洗脱下HPLC-RID的色谱图(1为27-脱氧升麻亭)

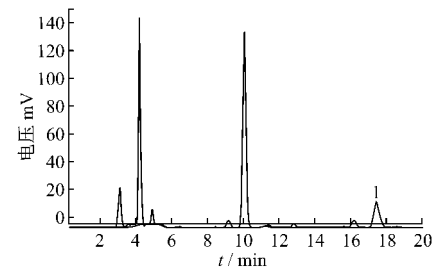


图4 等度洗脱下HPLC-ELSD的色谱图(1为27-脱氧升麻亭)

从研究分析结果显示,通过该方法不仅可对希明婷片中的活性成分的含量进行控制,同时也为测定希明婷片中其它成分的含量,提高希明婷片的质量标准提供了参考。

参考文献:

- [1] 刘培淑,李霞,刘媛,等.希明婷片治疗女性围绝经期综合征的临床研究[J].山东大学学报,2008,46(8):791-794.
- [2] 方超英,徐漪舟,张西芝,等.希明婷片治疗女性围绝经期综合征的临床观察[J].中国妇幼保健,2009,24(6):838-840.
- [3] 周亮,杨峻山.升麻族植物中的三萜皂苷[J].国外医药·植物药册,2005,20(4):149-156.
- [4] Bedir E, Khan I A. Cimicifugoside A: A New Cyclolanostanol Xyloside from the Rhizome of Cimicifuga racemosa [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(3): 425-427.
- [5] 潘瑞乐,陈迪华,斯建勇,等.反相高效液相色谱法测定不同品种升麻中27-脱氧升麻亭的含量[J].中南药学,2007,5(3):206-208.