

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

刘婧姝, 乔卫*, 郝兰芳, 李陆, 杨奕
(天津医科大学药学院, 天津 300070)

[摘要] 目的:建立中药复方酸枣仁合欢方中酸枣仁皂苷 A 的定性鉴别以及高效液相色谱-蒸发光散射检测法的含量测定方法。方法:采用薄层色谱法对方剂中的有效成分酸枣仁皂苷 A 进行鉴别。采用 Ameritech Accurasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(60:40), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测器漂移管温度 102 °C。结果:在薄层色谱图谱中可以检出酸枣仁皂苷 A, 斑点清晰可见, 重复性好。酸枣仁皂苷 A 检测浓度在 0.6 ~ 3.0 μg 与峰面积呈良好的线性关系($r = 0.9999$), 平均回收率为 100.16% (RSD 1.63%)。结论:定性定量方法简便、准确、重复性好, 可作为酸枣仁合欢方的质量控制方法。

[关键词] 酸枣仁合欢方;薄层色谱法;高效液相色谱-蒸发光散射检测法;含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)05-0077-03

Identification and Determination of Jujuboside A in Suanzaoren Hehuan Formula

LIU Jing-shu, QIAO Wei*, HAO Lan-fang, LI Lu, YANG Yi

(School of Pharmaceutical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a TLC method for identification of Semen Zizyphi Spinosae and a HPLC-ELSD method for determination of jujuboside A in Suanzaoren Hehuan Formula. **Method:** Quality of Semen Zizyphi Spinosae was identified with thin layer chromatography. The analytical column was Ameritech Accurasil-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consist of methanol-water (60:40). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was set at 35 °C. The tube temperature of the detector was 102 °C. **Result:** TLC could be used for the identification of Semen Zizyphi Spinosae, the spots were clear and accurate. The jujuboside A was linear within the range of 0.6-3.0 μg ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.98% and RSD was 1.19%. **Conclusion:** These methods are sensitive, accurate and simple. The methods can be used for the quality control of Suanzaoren Hehuan Formula.

[Key words] Suanzaoren Hehuan formula; TLC; HPLC-ELSD; content determination

枣仁合欢方最早载于《神农本草经》,民间用于心烦不安、失眠等症,后经简化成为由酸枣仁、合欢皮、白芍、柏子仁 4 味中药组成,具有疏肝解郁,安神

定志的作用^[1]。随着对情志病发病规律认识的加深,安神定志药物的运用越来越多,中医在治疗抑郁症时常加入理气解郁、宁心安神之酸枣仁^[2]。据调查天津市安定医院以酸枣仁和合欢皮配伍抗抑郁治疗,临床疗效显著,总体效率可达 92%。药品的质量控制标准是药品稳定性和用药安全的重要保证。为了有效控制该方剂的质量,本研究采用薄层色谱法(TLC)鉴别了酸枣仁和白芍;用高效液相色谱-蒸发光散射法(HPLC-ELSD)测定了本方剂中的主药酸枣仁的有效成分酸枣仁皂苷 A 的含量,实验结果

[收稿日期] 20100708(002)

[基金项目] 天津市卫生局基金资助项目(02020)

[第一作者] 刘婧姝,在读硕士研究生,从事中药药效物质基础的研究, Tel: 13820945322, E-mail: ljs322@126.com

[通讯作者] * 乔卫, Tel: 022-23542805-815, E-mail: qiaowei@tjmu.edu.cn

表明定性定量方法简便、准确,可作为本方剂的质量控制方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪,Alltech 2000ES 型 ELSD 检测器;KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);WHF-2038 三用紫外分析仪(上海精科实验有限公司)。

1.2 试剂 酸枣仁皂苷 A(批号 110734-200509);酸枣仁皂苷 B(批号 110814-200505)均购于中国药品生物制品检定所;薄层硅胶 G(青岛海洋化工厂);甲醇(天津基准化学试剂有限公司,色谱纯);水为重蒸水;其他试剂均为分析纯;酸枣仁 Semen Ziziphi spinosae、合欢皮 Cortex Albiziae、白芍 Radix Paeoniae Alba、柏子仁 Semen Platycladi 均购于天津太平大药房,经天津医科大学药教研室周晔教授鉴定,符合《中国药典》2010 年版第一部的要求。

1.3 酸枣仁合欢方提取物的制备 酸枣仁合欢方由酸枣仁、合欢皮、白芍、柏子仁 4 味中药按 24:13:6:10 配比组成。将 53 g 4 味药材用 70% 乙醇回流提取 2 次(2 h,1 h),合并滤液,减压浓缩至浸膏,所得浸膏以蒸馏水溶解,过 AB-8 大孔吸附树脂,分别用 2 倍量蒸馏水,3 倍量 70% 乙醇洗脱,收集 70% 乙醇洗脱液,浓缩蒸干,备用。酸枣仁合欢方固形物产率为 1.24% (相当于生药量)。

1.4 阴性对照品的制备 按处方药味比例,取除酸枣仁外的其余药材,按 1.3 项下制备工艺得阴性对照品,备用。

2 酸枣仁的 TLC 鉴别^[3]

取本品 1 g 以水饱和正丁醇萃取 3 次,合并醇层,蒸干,残渣加 5 mL 甲醇溶解作为供试品溶液;取酸枣仁对照药材 1 g,加甲醇 30 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 0.5 mL 溶解,作为酸枣仁对照药材溶液;同样方法制作不含酸枣仁的阴性对照溶液;另取酸枣仁皂苷 A、B 对照品各 1 mg,1 mL 甲醇溶解作为对照溶液。用毛细管吸取上述溶液 5 μ L 分别点于同一块硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇-水(7:5.5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛浓硫酸溶液,观察斑点显色情况。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的绿色斑点。

3 含量测定^[4-5]

3.1 色谱条件 Ameritech Accurasil C₁₈ 柱(4.6 mm \times

250 mm 5 μ m);流动相甲醇-水(60:40);流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;柱温 35 $^{\circ}$ C;检测器漂移管温度 102 $^{\circ}$ C;载气为空气,载气流速 2.8 L \cdot min⁻¹;0.45 μ m 微孔滤膜过滤,进样量为 20 μ L。在上述色谱条件下,药材中其他色谱峰对酸枣仁皂苷 A 色谱峰无干扰,理论塔板数为 4 452,酸枣仁皂苷 A 色谱峰能达到基线分离,峰形尖锐,基线平稳。

3.2 对照品溶液制备 精密称取酸枣仁皂苷 A 对照品 3.0 mg,置 10 mL 的量瓶中,加甲醇溶解并稀释到刻度,摇匀,制成浓度为 0.3 g \cdot L⁻¹,得酸枣仁皂苷 A 对照液,备用。

3.3 供试品溶液制备 取干燥的酸枣仁合欢方提取物约 0.05 g,精密称定,置具塞三角瓶中,加入甲醇 5 mL,超声(180 W,35 kHz)30 min,放置至室温,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,经微孔滤膜(0.45 μ m)过滤,取续滤液作为酸枣仁合欢方的供试品溶液。见图 1。

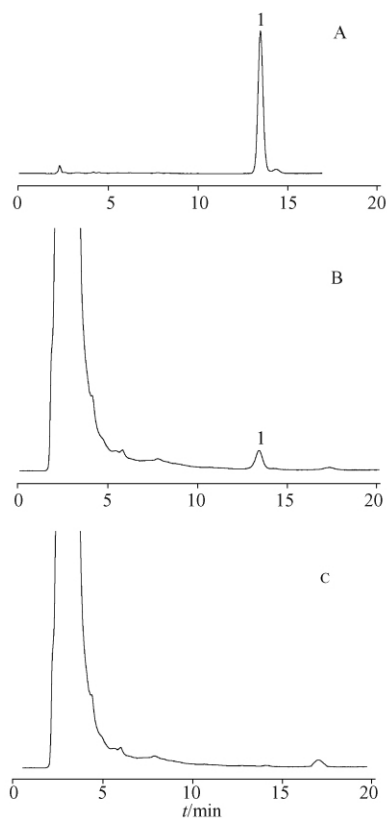


图 1 酸枣仁合欢方中酸枣仁皂苷 A 的 HPLC 图谱
A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照品;1. 酸枣仁皂苷 A

3.4 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液(0.3

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.4, 6, 8, 10 μL , 依次注入高效液相色谱仪中, 记录峰面积。以标准品含量的自然对数为横坐标 (X), 以峰面积的自然对数为纵坐标 (Y), 得到酸枣仁皂苷 A 的标准曲线, 回归方程 $Y = 1.2299X + 13.295$, $r = 0.9999$, 结果表明酸枣仁皂苷 A 浓度在 0.6 ~ 3.0 μg 线性关系良好。

3.5 精密性试验 精密吸取对照品溶液 5 μL , 按上述色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 酸枣仁皂苷 A 峰面积 RSD 为 1.80%, 表明仪器精密性良好, 符合要求。

3.6 重复性试验 取酸枣仁合欢方样品, 按 3.3 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下测定峰面积, 计算酸枣仁合欢方提取物中酸枣仁皂苷 A 的含量, 平均含量为 $5.84 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.61%, 说明方法重复性良好。

3.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 按上述色谱条件, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样测定, 测得酸枣仁皂苷 A 峰面积 RSD 为 1.01%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

3.8 加样回收率试验 精密吸取同一批已知含量的酸枣仁合欢方供试品溶液 9 份, 分别按相当于样品溶液中酸枣仁皂苷 A 含量的 80% ($n = 3$), 100% ($n = 3$), 120% ($n = 3$) 加入对照品溶液, 进行测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 酸枣仁合欢方加样回收率试验 ($n = 3$)

样品含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.3993	0.4	0.7997	100.1		
0.3993	0.4	0.7979	99.65		
0.3993	0.4	0.8112	102.9		
0.3993	0.5	0.9123	102.6		
0.3993	0.5	0.9027	100.7	100.16	1.63
0.3993	0.5	0.8906	98.26		
0.3993	0.6	0.9956	99.38		
0.3993	0.6	0.9940	99.12		
0.3993	0.6	0.9917	98.73		

3.9 样品含量测定 取 3 批次酸枣仁合欢方样品, 分别按照 3.3 项下方法制备供试液, 按照色谱条件测定峰面积, 连续进样 3 次。酸枣仁皂苷 A 含量为

5.84, 5.60, 5.44 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

4 讨论

本方剂中酸枣仁的 TLC 鉴别试验显示, 阴性无干扰, 方法具有专属性, 可作为质量控制方法。

酸枣仁为该方剂中的主药, 酸枣仁皂苷 A 是酸枣仁中含量较高的有效成分, 常作为酸枣仁药材或制剂的质控指标, 被《中国药典》2005 年版所收载。由于酸枣仁皂苷 A 为三萜皂苷类成分, 紫外吸收差, 不宜用 UV 法检测, 而 ELSD 检测器为质量型通用检测器, 可检测任何挥发性低于流动相的化合物, 且化合物的响应值接近, 因而峰面积比例亦近乎各组分的质量之比, 同时灵敏度及稳定性均能符合含量测定的要求, 所以本文选用蒸发光散射检测器测定酸枣仁皂苷 A 的含量。结果表明该法简便、准确、重复性好, 可作为该方剂的质量控制方法。

本实验通过对不同提取方法 (超声、加热回流)、不同提取时间 (20, 30, 50 min)、不同溶剂类型 (甲醇、甲醇-水) 的考察来选择最佳提取方法, 最后确定甲醇超声提取 30 min 为最佳提取条件。之后又对甲醇-水 (70:30) 至甲醇-水 (60:40) 等不同比例流动相进行比较, 结果发现甲醇-水 (60:40) 能得到较好的分离度, 而保留时间适当, 不受干扰, 能使样品中所含成分有较好的分离度。为了获得最理想的样品分离效果, 需要调节 ELSD 的载气流速和漂移管温度这两个重要参数。本实验对载气流速和漂移管温度进行了考察, 结果表明, 在载气流速为 $2.8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 漂移管温度为 $102 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 分离效果最佳。

[参考文献]

- [1] 乔卫, 周晶, 段宏泉, 等. 治疗抑郁症的中药组合物及其制备方法 [P]. 中国专利: 101347524, 2009-01-21.
- [2] 畅洪升, 王庆国, 关玲, 等. 中医药抗抑郁复方分析和证治规律研究 [J]. 中国民间疗法, 2004, 12(2): 60.
- [3] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 343.
- [4] 陈婧, 刘焱文. HPLC-ELSD 法测定酸枣仁汤中酸枣仁皂苷 A 的含量 [J]. 中药材, 2006, 29(7): 730.
- [5] 隋红, 周慧玲, 陈建峰, 等. HPLC-ELSD 法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.

[责任编辑 顾雪竹]