

中空纤维离心超滤-HPLC 法分析 藿香正气水中的橙皮苷

安静¹, 张福成², 卢彦芳¹, 蒋晔^{1*}

(1. 河北医科大学药学院, 河北石家庄 050017; 2. 空军总医院药学部, 北京 10036)

[摘要] 目的: 建立分析含有高分子杂质的中草药中极性物质的中空纤维分离离心超滤前处理方法, 并用于藿香正气水中橙皮苷的分析。方法: 试验采用新型中空纤维微量离心超滤装置(HFCUF)纯化样品溶液, 在离心力作用下, 利用中空纤维超滤膜除去样品溶液中的大分子, 提高了色谱柱的使用寿命、分析的重现性和准确性。分析方法 Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.5%的乙酸水溶液(35:65), 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 283 nm, 柱温 30 °C。结果: 橙皮苷在 4.69 ~ 150 mg · L⁻¹ 线性关系良好($r=0.9997$), 回收率 103.0%, RSD 1.9%。结论: 该法简便快速、结果准确, 为中药中极性活性成分的测定提供了新的、简单廉价的前处理手段。

[关键词] 中空纤维; 离心超滤; 橙皮苷; 藿香正气水

中草药制剂的基质复杂, 常含有多糖、蛋白质等高分子物质以及一些黏度很大的物质, 这些物质的存在既影响着色谱分析的重复性和准确性, 也降低了色谱柱的使用寿命, 增加了分析成本, 因此在分析测定前常常需进行除去高分子杂质的样品前处理过程。传统除去大分子的方法如大孔树脂法^[1-2]、凝胶色谱^[3-4]等, 操作过程繁杂, 准确性和重复性容易受到操作者熟练程度的影响。此外, 传统的有机溶剂液液萃取也很难将极性较强的成分分离纯化出来。

本文采用新型的中空纤维膜离心超滤法进行样品前处理, 通过简单的离心超滤即可除去样品溶液中的多糖、蛋白质等大分子物质, 离心后的超滤液可直接进行色谱分析, 保证了分析的准确性和重复性, 提高了色谱柱的使用寿命, 降低了分析成本且处理过程不使用有机溶剂, 环境友好。利用所建立的方法测定了藿香正气水中极性指标成分橙皮苷的含量, 操作简便快速, 结果准确可靠。

1 材料

岛津 LC-40AT 液相色谱系统: 岛津 LC-40AT. vp 泵, SPD-10A 检测器, CTO-10A 中央控制器, 岛津 Class-vp 工作站; 聚丙烯中空纤维(壁厚 20 μm, 截留相对分子质量 6 000, 杭州凯洁膜分离技术有限公

司); 橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110721-200512); 藿香正气水(北京同仁堂科技股份有限公司, 批号 0144760, 0144781, 0144829); 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品 7.50 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即配得 150 mg · L⁻¹ 的橙皮苷对照品储备溶液。精密量取 2 mL 置 5 mL 量瓶中即得质量浓度为 60 mg · L⁻¹ 的橙皮苷对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 根据文献[5]精密吸取本品 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇适量, 振摇, 用 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得样品溶液。

中空纤维离心超滤法制备样品溶液: 将中空纤维切成 15 cm 的小段, 放入水中超声清洗 15 min, 晾干备用。将 2 个注射用针头穿过橡胶塞, 插入已处理好的中空纤维中, 并置于离心管中。精密吸取本品 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇适量, 振摇, 用 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 取适量约 8 mL 注入离心管中, 6 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取出中空纤维, 收集中空纤维内的溶液(约 50 μL) 即得样品溶液(图 1)。

2.3 色谱条件及系统适用性试验 Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.5% 的乙酸水溶液(35:65), 等度洗脱; 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 283 nm, 进样量 10 μL。

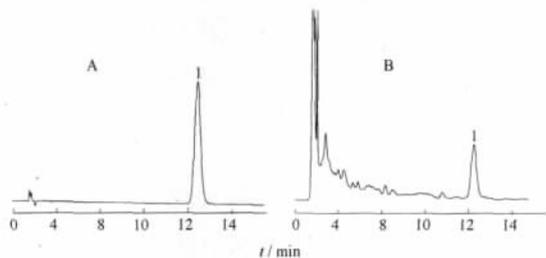
[稿件编号] 20100818011

[通信作者] * 蒋晔, Tel: (0311) 86266069, E-mail: jiangye@hebmu.edu.cn



图 1 中空纤维离心超滤装置

在上述色谱条件下,分别取橙皮苷对照品及样品溶液进样测定,记录色谱图(图 2)。橙皮苷保留时间约为 16.9 min,理论板数以橙皮苷记不低于 5 000。



1. 橙皮苷。

图 2 对照品(A)与供试品(B)的 HPLC 图

2.4 线性、检测限和定量限 精密量取 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品储备液 5 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度即得质量浓度为 $75.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的橙皮苷对照品溶液,对倍稀释得质量浓度分别为 37.5, 18.8, 9.37, 4.69 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的橙皮苷对照品系列线性工作溶液。进样测定,以橙皮苷的峰面积对质量浓度进行回归,得回归方程为 $A = 1.57 \times 10^4 C + 5.61 \times 10^3$ ($r = 0.9997$)。橙皮苷在 4.69 ~ $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。以 $S/N = 10$ 计,定量限为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;以 $S/N = 3$ 计,检测限为 $0.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 精密度 取橙皮苷样品溶液,连续测定 6 次,记录峰面积,RSD 0.9%。

2.6 稳定性 取同批(批号 0144781)藿香正气水,按 2.2 项下方法制备供试品,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定,记录峰面积,RSD 1.0%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性 取同批(批号 0144781)藿香正气水共 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品,进样测定,记录峰面积,RSD 2.1%。

2.8 回收率试验 精密量取 5 份已知含量为 $220 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的藿香正气水 2.5 mL 分别置 25 mL 量瓶中,各精密加入质量浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的橙皮苷对照品储备液 2 mL,按 2.2 项下方法制备供试品,进样测定,平均回收率为 103.0%,RSD 1.9%。

2.9 样品测定 取 3 批藿香正气水,按 2.2 项下方法配制供试品溶液,进样测定。采用标准曲线法计算橙皮苷的含量,结果表明,本文方法与文献 [5] 法测定结果基本一致(表 1)。

表 1 样品中橙皮苷含量测定($n = 3$)

批号	文献[5]法		中空纤维超滤法	
	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%
0144760	214.5	1.6	219.2	1.1
0144781	216.0	1.1	220.0	1.5
0144829	218.7	0.8	222.9	0.9

3 讨论

橙皮苷(hesperidin)是一种具有双氢黄酮氧苷结构的类黄酮物质,极性较强,几乎不溶于丙酮、苯、氯仿等有机溶剂,采用液液分离纯化十分困难。虽然有文献采用大孔树脂法进行样品前处理^[6]或采用甲醇回流提取^[7]以除去大分子,但这些方法操作繁琐费时,易引起误差。本试验采用自制的中空纤维离心超滤装置,方便除去样品溶液中的大分子,不用任何进一步处理,可以直接进入色谱柱分析,方法简单快速,为藿香正气水中橙皮苷的测定提供了简便可行的前处理手段。

橙皮苷是藿香正气水主要的质控指标之一^[5],其含有的大分子主要来源于处方中的茯苓及半夏,茯苓中的 β -茯苓聚糖约占其干燥品的 93%^[8],此外还可能含有由茯苓、半夏带来的少量蛋白质、树胶、酶等大分子物质^[9]。它们无法通过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤除,采用高效液相色谱法直接测定^[5]时,易吸附堵塞在填料小孔处,使色谱柱性能发生改变,缩短色谱柱寿命,降低分析的准确性和重复性。

本文采用的中空纤维离心超滤法,其过滤动力为离心力,其过滤速度主要取决于离心力,在一定时

间内,离心力太小收集不到足够进样分析的样品溶液,本文考察了离心 15 min 时相对离心力为 7.8×10^3 g 时对超滤液的量的影响,当离心力为 2.8×10^3 g 时已能收集到足够分析的超滤液且在 $2.8 \times 10^3 \sim 7.8 \times 10^3$ g 所得超滤液体积基本一致,故试验最终选择离心力为 2.8×10^3 g,相当于离心机转速为 $6\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

本文采用的中空纤维离心超滤装置为本实验室自制^[10-11],与市售的小型平面膜结构的离心超滤装置比,不仅价格低廉,且由于离心力与平行的中空纤维膜平行没有浓差极化现象,同时由管外至管内的超滤方式使得它的孔径和超滤性能不受离心力影响,更适合用于黏度较大的样品溶液,特别是含有高分子的中草药样品溶液的前处理,提高色谱柱的使用效率,减少分析成本,提高方法的耐用性。

[参考文献]

- [1] Zhang B, Yang R Y, Zhao Y, et al. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins [J]. J Chromtogr B, 2008, 867: 253.
- [2] Fu B Q, Liu J, Li H, et al. The application of macroporous res-

ins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid [J]. J Chromtogr A, 2005, 1089: 18.

- [3] 马丹,封士兰,赵良功,等. 红芪多糖的提取分离纯化及组成分析 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(3): 177.
- [4] 徐洁蕾,应剑波,李晓飞. 快速溶剂萃取-凝胶色谱净化-GC-MS 结合测定血中的滥用药物 [J]. 质谱学报, 2010, 31(2): 125.
- [5] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 1231.
- [6] 刘永刚,卢建秋,刘珍清,等. 高效液相色谱法测定藿香正气水中橙皮苷等 4 种成分的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1947.
- [7] 吴丽璇. 高效液相色谱法测定蓬香正气水中橙皮苷的含量 [J]. 中国药师, 2006, 9(1): 43.
- [8] 张思访,刘静涵,蒋建勤. 茯苓的化学成分和药理作用及开发利用 [J]. 中华实用中医药杂志, 2005, 18(2): 227.
- [9] 葛秀允,吴皓. 半夏的化学成分及质量评价方法 [J]. 中国药业, 2009, 18(9): 3.
- [10] Li J M, Jiang Y, Sun T. Howlow-biber ultrafiltration then centrifugation for LC analysis of water-soluble sucrose in a water-soluble high-molecular-mass gel matrix [J]. Chromatographic, 2009, 70: 1023.
- [11] 蒋晔,康丽娟,李珺沫,等. 一种适用于微量样品前处理的离心超滤装置: 中国, 200910074429. 4 [P]. 2010-12-01.

Separation and determination of hesperidin in Huoxiangzhengqi water by hollow fiber ultrafiltration-high performance liquid chromatography

AN Jing¹, ZHANG Fucheng², LU Yanfang¹, JIANG Ye^{1*}

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Dept. of Pharmacy, General Hospital of Air Force, Beijing 100036, China)

[Abstract] A simple hollow fiber based centrifuge ultrafiltration pretreatment procedure has been developed for the analysis of active components with high polarity in Chinese traditional and herbal drugs which usually contain macromolecule impurities. The procedure combined with HPLC was applied to the determination of hesperidin in Huoxiangzhengqi water. Sample solutions were purified by our patent hollow fiber centrifuge ultrafiltration device. Under the effect of the centrifugal force, micromolecules were removed from solution samples, thus it increased the service life of the column. The accuracy and repeatability of this method have also been improved. The separation was carried out on a Promosil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with methanol-0.5% acetic acid solution (35:65) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detector wavelength was 283 nm and the column temperature was 30 °C. A good linear relation was obtained in the range of 4.69 ~ 150 mg · L⁻¹ ($r = 0.9997$) and the average recovery was 103.0% with RSD of 1.9%. This method is simple, rapid and accurate, and it provides a simple and cheap ultrafiltration means for the analysis of the polar components in Chinese traditional and herbal drugs.

[Key words] hollow fiber; ultrafiltration; hesperidin; Huoxiang Zhengqi water

doi: 10.4268/cjcm20110416

[责任编辑 马超一]

• 457 •