

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.015

高效液相色谱-蒸发光散射检测器法同时测定化癍祛斑胶囊中4种柴胡皂苷含量

王丽方^{1,2,3}, 刘 炜^{1,2,3,△}

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂科, 北京 100038; 2. 临床合理用药生物特征谱学评价北京市重点实验室, 北京 100038; 3. 临床合理用药生物特征谱学评价国际合作联合实验室, 北京 100038)

摘要:目的 建立同时测定化癍祛斑胶囊中柴胡皂苷 a、b₁、b₂、d 的高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法。方法 色谱柱采用 Agilent Zorbax Bonus-RP C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30℃, 漂移管温度为 42℃, 载气为氮气(流速为 2.5 mL/min)。结果 样品中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b₂、柴胡皂苷 b₁ 和柴胡皂苷 d 进样量分别在 0.082 1~3.208 0 μg($r=0.998\ 5$), 0.267 3~10.440 0 μg($r=0.999\ 8$), 0.083 5~3.260 0 μg($r=0.999\ 3$), 0.090 9~3.552 0 μg($r=0.999\ 7$)范围内与峰面积平均值的对数值呈良好线性关系; 平均回收率分别为 101.61%, 99.64%, 95.36%, 95.26%, RSD 均小于 2%($n=6$)。结论 该方法操作简单, 准确度高, 专属性强, 可用于化癍祛斑胶囊中 4 种柴胡皂苷的含量测定。

关键词:化癍祛斑胶囊; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 b₂; 柴胡皂苷 b₁; 柴胡皂苷 d; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0056-04

Simultaneous Determination of Four Saikosaponins in Huayu Quban Capsules by HPLC-ELSD Method

WANG Lifang^{1,2,3}, LIU Wei^{1,2,3}

(1. Department of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing, China 100038; 2. Beijing Key Laboratory of Clinical Bioavailability Spectrometry Evaluation, Beijing, China 100038; 3. Joint Clinical Laboratory for the Evaluation of Biometric Characteristics of Clinical Rational Drug Use, Beijing, China 100038)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of four saikosaponins a, b₁, b₂, and d in Huayu Quban Capsules by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection(HPLC-ELSD) method. **Methods** Agilent Zorbax Bonus-RP C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was performed for separation with a gradient program of acetonitrile(A)-water(B) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min; the column temperature was maintained at 30℃. The temperature of drift tube was 42℃ and the flow rate of N₂ was 2.5 mL/min. **Results** The logarithm values of injection volumes exhibited good liner relationship with the logarithm value of peak areas when the injection volumes of saikosaponins a, b₂, b₁, and d were 0.082 1~3.208 0 μg($r=0.998\ 5$), 0.267 3~10.440 0 μg($r=0.999\ 8$), 0.083 5~3.260 0 μg($r=0.999\ 3$), 0.090 9~3.552 0 μg($r=0.999\ 7$). The average recoveries were 101.61%, 99.64%, 95.36%, 95.26%, respectively, and the RSDs were all less than 2% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple in operation, high in accuracy and strong in specificity, and can be used for the determination of 4 saikosaponins in Huayu Quban Capsules.

Key words: Huayu Quban Capsules; saikosaponins a; Saikosaponins b₂; Saikosaponins b₁; Saikosaponins d; high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection; content determination

化癍祛斑胶囊质量标准收录于 2015 年版《中国药典(一部)》, 其由柴胡、薄荷、黄芩、当归、红花、赤芍 6 味药材经过提取精制而成, 具有疏风清热、活血化痰的功效, 主要用于风热痰阻产生的黄褐斑、酒齄等症^[1-3]。方中柴胡疏散退热、疏肝解郁、升举阳气, 为君药, 且与该药的药理作用一致, 柴胡皂苷为柴胡疏风散热、解郁的主要有效成分^[4-7]。目前, 柴胡的质量控制标准仅有薄层色谱鉴别, 而无定量控制。2015 年版《中国药典(一部)》柴胡药材项下以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 为指标成分进行含量控制, 但两者均不稳定, 在煎煮和制剂过程中均易分解, 分别产生柴胡皂苷 b₁ 和柴胡皂苷 b₂, 且其次生皂苷也具有较好的生物活性^[8-10]。目前, 关于化

癍祛斑胶囊的研究主要集中在临床研究^[11-12]、黄芩苷含量测定^[13-14]及多组分的含量测定^[15-16], 尚未见柴胡皂苷含量测定报道。参考文献[17], 本研究中以柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 b₂ 和柴胡皂苷 d 作为控制化癍祛斑胶囊中柴胡的指标成分, 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法同时测定 4 种柴胡皂苷含量, 为全面提高化癍祛斑胶囊的质量标准提供参考。现报道如下。

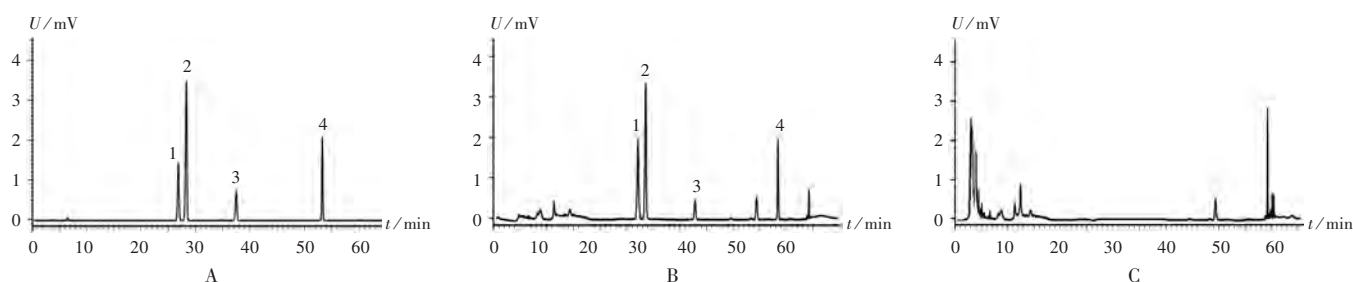
1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪, 包括 2424ELSD 蒸发光散射检测器, Empower3 色谱工作站(Waters 公

第一作者: 王丽方, 女, 大学本科, 初级药师, 研究方向为药物分析和静脉用药调配, (电子信箱)sytc7010@163.com。

△通信作者: 刘炜, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为新药研发和药物分析, (电子信箱)Liuwei8090@126.com。



1. 柴胡皂苷 a 2. 柴胡皂苷 b₂ 3. 柴胡皂苷 b₁ 4. 柴胡皂苷 d

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照药材溶液

图1 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法色谱图

司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 40 kHz);XPE204 型电子天平(美国梅特勒多利多公司,精度为十万分之一)。

1.2 试药

柴胡皂苷 a 对照品(批号为 110777-201912,含量为 94.8%),柴胡皂苷 d 对照品(批号为 110778-201912,含量为 96.3%),均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用;柴胡皂苷 b₁ 对照品(批号为 DST180519-009,含量为 98.0%),柴胡皂苷 b₂ 对照品(批号为 DST170330-010,含量为 99.0%),均购自成都曼斯特生物技术有限公司;柴胡药材(陕西兴德中药饮片公司,批号为 80301),经首都医科大学王伟主任药师鉴定为伞形科柴胡 *Bupleurum Chinese* DC. 的干燥根(习称北柴胡);化瘀祛斑胶囊(山西仁源堂药业有限公司,批号分别为 20181002,20181105,20181203,规格为每粒 0.32 g);氮气(纯度不低于 99.999%),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Bonus-RP C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,0~18 min 时 38%A,18~32 min 时 38%~41%A,32~40 min 时 41%A,40~56 min 时 41%~52%A,56~59 min 时 52%~90%A,59~69 min 时 90%A;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;漂移管温度:42℃;载气:氮气,流速:2.5 mL/min;进样量:10,20 μL。

2.2 溶液制备

取柴胡皂苷 a 对照品 8.02 mg、柴胡皂苷 b₁ 对照品 8.15 mg、柴胡皂苷 d 对照品 8.88 mg,精密称定,置同一 20 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备溶液 I;另取柴胡皂苷 b₂ 对照品 2.61 mg,精密称定,置 5 mL 容量瓶中,精密加入上述对照品贮备溶液 I 2 mL,置上述同一 5 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为 5 号混合对照品溶液。然后采

用逐级稀释法分别制备系列质量浓度的对照品溶液,记为 1~4 号混合对照品溶液。取样品(批号为 20181002)10 粒内容物,研匀,取 0.5 g,精密称取,置具塞锥形瓶中,精密加入 5% 浓氨试液的甲醇溶液 25 mL,称定质量,超声处理(功率为 240 W,频率为 40 kHz)30 min,取出放凉,加 5% 浓氨试液的甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取缺柴胡药材的阴性样品,依法制备阴性对照药材溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下 3 种溶液,按拟订色谱条件测定,色谱图见图 1。结果阴性对照药材溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上未见色谱峰,表明处方中其余药味对 4 种柴胡皂苷的含量测定无干扰。

线性关系考察:精密吸取上述 1~5 号混合对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,各进样 2 次,进样量为 20 μL,以峰面积平均值的对数值为纵坐标(Y)、进样量的对数值为横坐标(X)进行线性回归。结果见表 1。

表1 4种柴胡皂苷的线性关系考察结果

成分	线性回归方程	线性范围(μg)	相关系数(r)
柴胡皂苷 a	$Y = 1.7718X - 0.4610$	0.0821 ~ 3.2080	0.9985
柴胡皂苷 b ₂	$Y = 1.5781X + 0.0282$	0.2673 ~ 10.4400	0.9998
柴胡皂苷 b ₁	$Y = 1.6171X - 0.0804$	0.0835 ~ 3.2600	0.9993
柴胡皂苷 d	$Y = 1.3526X + 0.0045$	0.0909 ~ 3.5520	0.9997

精密度试验:分别精密吸取上述 1,3,5 号低、中、高质量浓度的对照品溶液,按拟订色谱条件测定峰面积,各进样 6 次。结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b₂、柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 d 的 RSD 分别为 0.36%, 0.42%, 0.23% (n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 20181002),依法平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件测定峰面积,并按照两点对数法计算含量。结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b₂、柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 d 含量的 RSD 分别为 0.71%, 0.56%, 0.38%, 0.65% (n=6)。表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 20181002),依法制备

供试品溶液,按拟订色谱条件分别于0,2,4,8,16,20,24 h时测定峰面积。结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b₂、柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 d 的 RSD 分别为 1.96%, 1.35%, 2.01%, 2.28% (n=6),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

加样回收试验:取柴胡皂苷 b₁ 5.38 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,作为待加溶液,另分别取柴胡皂苷 a 4.62 mg、柴胡皂苷 b₂ 8.65 mg 和柴胡皂苷 d 5.49 mg,精密称定,置同一 10 mL 容量瓶中,精密吸取上述柴胡皂苷 b₁ 待加溶液 2 mL,置上述同一 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为待加对照品的混合溶液。取样品(批号为 20181002) 0.25 g,共 6 份,加入上述待加对照品混合溶液 1 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 2。

表 2 4 种柴胡皂苷加样回收试验结果 (n=6)

待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
柴胡皂苷 a	0.251 5	0.459 1	0.462 0	0.925 6	100.97	101.61	0.73
	0.254 2	0.464 1	0.462 0	0.931 7	101.21		
	0.253 6	0.463 0	0.462 0	0.929 6	101.00		
	0.252 9	0.461 7	0.462 0	0.930 5	101.47		
	0.251 8	0.459 7	0.462 0	0.934 8	102.84		
	0.253 7	0.463 2	0.462 0	0.935 2	102.16		
柴胡皂苷 b ₂	0.251 5	0.869 2	0.865 0	1.725 3	98.97	99.64	0.95
	0.254 2	0.878 5	0.865 0	1.741 5	99.76		
	0.253 6	0.876 5	0.865 0	1.729 6	98.63		
	0.252 9	0.874 0	0.865 0	1.746 8	100.90		
	0.251 8	0.870 2	0.865 0	1.740 6	100.62		
	0.253 7	0.876 8	0.865 0	1.732 9	98.97		
柴胡皂苷 b ₁	0.251 5	0.246 8	0.215 2	0.446 8	92.95	95.36	1.93
	0.254 2	0.249 4	0.215 2	0.452 9	94.55		
	0.253 6	0.248 8	0.215 2	0.451 8	94.32		
	0.252 9	0.248 1	0.215 2	0.459 6	98.26		
	0.251 8	0.247 1	0.215 2	0.454 1	96.21		
	0.253 7	0.248 9	0.215 2	0.455 2	95.85		
柴胡皂苷 d	0.251 5	0.548 9	0.549 0	1.073 5	95.56	95.26	1.16
	0.254 2	0.554 8	0.549 0	1.076 5	95.03		
	0.253 6	0.553 5	0.549 0	1.069 9	94.07		
	0.252 9	0.551 9	0.549 0	1.069 2	94.22		
	0.251 8	0.549 5	0.549 0	1.082 2	97.03		
	0.253 7	0.553 7	0.549 0	1.079 9	95.85		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,平行制备 3 份,按拟订色谱条件进行测定。结果见表 3。

3 讨论

3.1 供试品制备方法选择

参考《中国药典(一部)》柴胡项下的含量测定方法,

表 3 3 批样品中 4 种柴胡皂苷含量测定结果 (mg/g)

批号	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 b ₂	柴胡皂苷 b ₁	柴胡皂苷 d
20181002	1.826 5	3.456 1	0.981 2	2.182 4
20181105	2.062 3	3.521 7	1.125 6	2.356 6
20181203	1.653 8	3.068 5	0.693 3	1.843 7

采用 L₉(3³) 正交试验对氨水甲醇的体积分数(3%, 5%, 7%)、超声功率(180 W, 240 W, 300 W)和超声时间(20 min, 30 min, 40 min)进行预试验。结果表明,超声频率及时间对测定结果无显著性影响,氨水甲醇体积分数对测定结果有显著性影响。综合考虑,选择 5% 氨水甲醇作为提取溶剂,超声处理(功率为 240 W) 30 min,为供试品的最佳提取制备工艺。

3.2 检测器条件选择

预试验中采用紫外检测器测定 4 种皂苷,由于皂苷类均是末端吸收,干扰峰较多,通过调整流动相和更换不同厂家色谱柱均未能使其分离。柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 主要是环氧醚型柴胡皂苷,柴胡皂苷 b₁ 和柴胡皂苷 b₂ 是异环双烯型柴胡皂苷,含有共轭双烯结构^[10],与柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的最大吸收具有一定差异,前期试验发现其难以分离。由于蒸发光散射检测器是通用质量型检测器,且对皂苷类具有较好的响应。综合考虑,采用蒸发光散射检测器进行测定,同时对蒸发光散射检测器的漂移管温度进行优化。当漂移管温度升高至 80 ℃ 以上时,峰面积会急剧减小,且峰形不对称、分离度不好,可能是由于温度过高导致样品溶剂挥发时带走部分对照品,影响样品的测定结果。综合考虑,选择漂移管温度为 42 ℃,色谱峰分离良好,峰形良好,无干扰。

3.3 系统适用性考察

曾考察不同流速(0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2 mL/min)、不同柱温(20, 25, 30, 35, 40 ℃)、不同漂移管温度(38, 40, 42, 44, 46 ℃)及 3 种不同厂家的色谱柱(Agilent Zorbax Bonus-RP C₁₈ 柱, Welch Ulitimate XB C₁₈ 柱, Waters XBridge C₁₈ 柱),结果显示,在上述色谱条件范围内,样品中 4 种柴胡皂苷的色谱峰分离良好、理论板数高,对称因子在 0.95~1.05 之间,且峰形对称。不同厂家色谱柱均能分离 4 种柴胡皂苷色谱峰,故此方法可用于化痰祛斑胶囊中 4 种柴胡皂苷的含量测定。

3.4 方法评价

本研究中建立的 HPLC-ELSD 法可同时测定化痰祛斑胶囊中 4 种柴胡皂苷的含量,3 批样品中均检出柴胡皂苷 b₂ 和柴胡皂苷 b₁,且含量差异不大,可推断出在制剂和生产中存在柴胡皂苷 b₂ 和柴胡皂苷 b₁,因此有必要对其作为指标性成分进行质量控制。该方法具有操作简单、重复性好、专属性强的优点,4 种柴胡皂苷作为化痰祛斑胶囊中柴胡的特征性成分,用于其质量评价与