

· 论著 ·

HPLC法和UV法测定复方枣参片中斯皮诺素和总皂苷含量

郑峰¹, 阙晓¹, 苏靖¹, 丁丽燕², 聂曲³, 邱明丰^{1,3} (1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 上海乔源生物制药有限公司, 上海 201203; 3. 滇西应用技术大学傣医药学院, 云南 景洪 600100)

[摘要] 目的 建立复方枣参片中斯皮诺素和总皂苷的含量测定方法。方法 HPLC法测定斯皮诺素采用 Agilent Zorbax SB C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温25℃, 流动相为乙腈-水, 采用梯度洗脱, 流速为1.0 ml/min, 检测波长为335 nm。UV法测定总皂苷采用 Amberlite XAD-2大孔树脂柱层析后, 香草醛-冰醋酸法显色测定, 检测波长为560 nm。结果 斯皮诺素和总皂苷的线性范围分别为20~100 μg/ml($r=0.9990$)和40~200 μg/ml($r=1.0000$), 准确度平均值分别为99.55%和99.85%。结论 本方法准确可靠, 可作为复方枣参片的质量控制依据。

[关键词] 复方枣参片; 高效液相色谱法; 紫外-可见分光光度法; 斯皮诺素; 总皂苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)02-0134-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.009

Determination of spinosin and total saponins in compound Zaoshen tablet by HPLC and UV

ZHENG Feng¹, QUE Xiao¹, SU Jing¹, DING Liyan², NIE Qu³, QIU Mingfeng^{1,3} (1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Shanghai QiaoYuan Biological Pharmaceutical co., LTD., Shanghai 201203, China; 3. School of Dai Medicine, West Yunnan University of Applied Sciences, Jinghong 600100, China)

[Abstract] **Objective** To establish methods for the determination of spinosin and total saponins in compound Zaoshen tablet. **Methods** The separation of spinosin was performed on Agilent Zorbax SB C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) at 30℃ with water and acetonitrile as mobile phase for gradient elution at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 335 nm. Determination of total saponins was fulfilled by column chromatography followed by UV spectrometer with vanillin glacial acetic acid colorimetry. The detection wavelength was 560 nm. **Results** Linear range of spinosin was 20-100 μg/ml ($r=0.9990$) and total saponins was 40-200 μg/ml ($r=1.0000$). The average recoveries for accuracy tests were 99.55% and 99.85% respectively. **Conclusion** Those methods are accurate and reliable. They can be used for the quality control of compound Zaoshen tablet.

[Key words] compound Zaoshen tablet; HPLC; UV; spinosin; total saponins

复方枣参片用于治疗气血不足、虚热内扰导致的失眠。本品是由酸枣仁、西洋参等数味中药材配伍而成的经验方。方中君药为酸枣仁, 臣药为西洋参, 主要有效成分为斯皮诺素、酸枣仁皂苷、人参皂苷和西洋参皂苷^[1-3]。针对黄酮类成分斯皮诺素, 《中华人民共和国药典》(2015年版)规定以高效液相色谱(HPLC)法对其进行含量测定。而针对众多皂苷类成分, 由于成分组成相对复杂, 在同一液相色

谱条件下很难达到完全分离, 药典和文献中也多分别进行测定^[4-9]。因此, 笔者采用简便易行的紫外-可见光分光光度(UV)法对皂苷这一大类成分进行控制。笔者率先使用 HPLC 与 UV 法分别测定斯皮诺素和皂苷类有效成分, 进而用于控制复方枣参片的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent Zorbax SB C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(美国 Agilent 公司); APL 759 UV Spectrophotometer(上海奥谱勒仪器有限公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-4 型数显恒温水浴锅(江苏金坛水北科学仪

[作者简介] 郑峰, 硕士研究生。Tel: 18217207750; E-mail: ZhengFeng.in.SJTU@sjtu.edu.cn

[通讯作者] 邱明丰, 副教授。研究方向: 新制剂与新剂型研究。Tel: (021)34205051; E-mail: mfqiu@sjtu.edu.cn; 聂曲, 副教授。研究方向: 传统医药研究。Tel: (0691)2269080; E-mail: 280816348@qq.com

器有限公司);AL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];DHG-9123A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试药 斯皮诺素(批号:111869-201203)、人参皂苷 Re(批号:110754-201525),均购自中国食品药品检定研究院;Amberlite XAD-2大孔树脂[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号:#3025-U];中性氧化铝(FCP)(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20150124);复方枣参片(上海卡乐康包衣技术有限公司,批号:S20150806、S20150808和S20150810);乙腈为色谱纯,石油醚(60~90℃)、甲醇、乙醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 HPLC法测定斯皮诺素含量

2.1.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱为Agilent Zorbax SB C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:乙腈(A)-水(B)进行梯度洗脱(0~10 min, 88%B~81%B;10~16 min, 81%B~80%B;16~22 min, 80%B~0%B;22~30 min, 0%B),流速为1 ml/min,进样量10 μl,检测波长335 nm,柱温25℃。在该色谱条件下,理论塔板数按斯皮诺素峰计算为58 000。对照品溶液、样品溶液及阴性样品溶液色谱结果见图1。

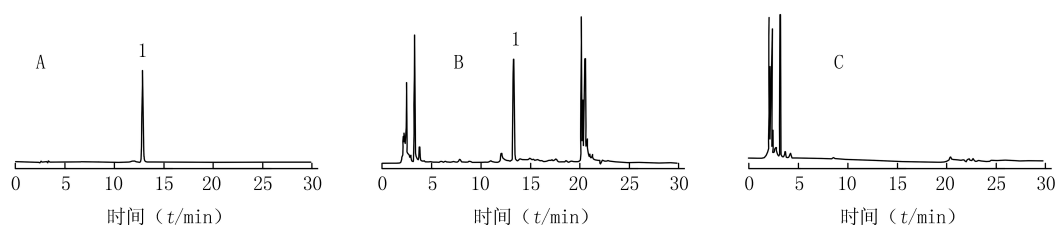


图1 斯皮诺素 HPLC 图

A. 斯皮诺素对照品;B. 复方枣参片;C. 阴性样品;1. 斯皮诺素

2.1.2 对照品及样品溶液的制备 对照品溶液:取斯皮诺素对照品约5.0 mg,精密称定,置25 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别精密移取适量于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成质量浓度为20、40、60、80、100 μg/ml的对照品溶液。

供试品溶液:取复方枣参片粉末约2 g,精密称定,置索氏提取器中,加石油醚(60~90℃)适量,加热回流4 h,弃去石油醚液,药渣挥去溶剂,转移至锥形瓶中,加入70%乙醇20 ml,加热回流2 h,滤过,滤渣用70%乙醇5 ml洗涤,合并洗液与滤液,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至5 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性样品溶液:按处方制备不含酸枣仁的阴性样品,与供试品同法制备成阴性样品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密取各质量浓度对照品溶液10 μl,进样,按“2.1.1”项下方法进行分析。以质量浓度(X, μg/ml)对峰面积积分值(Y)进行线性回归,计算得到回归方程为 $Y=8.4805X+2.97$,

$r=0.9990$,结果表明斯皮诺素在20~100 μg/ml范围内线性关系良好。

2.1.4 重复性试验 取复方枣参片粉末6份,每份2.0 g,精密称定,按供试品溶液项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下方法进行分析。计算得到斯皮诺素平均含量为0.2044 mg/g, RSD值为0.57%,表明该方法的重复性良好。

2.1.5 中间精密度试验 另一试验人员取复方枣参片粉末6份,每份2.0 g,按供试品溶液项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下方法进行分析。与重复性试验结果合并计算得到斯皮诺素平均含量为0.2067 mg/g, RSD值为1.44%,表明该方法的中间精密度良好。结果见表1。

2.1.6 准确度试验 取复方枣参片粉末6份,每份约1.0 g,精密称定,加对照品溶液项下100 μg/ml对照品溶液2.05 ml,按该项方法制备准确度试验供试品溶液(含量100%),按“2.1.1”项下方法进行分析。经计算得到平均回收率为99.55%, RSD值为

表1 中间精密度试验结果(n=12)

化合物	含量(mg/g)						平均值(mg/g)	RSD(%)
斯皮诺素	0.2029	0.2035	0.2037	0.2049	0.2055	0.2059	0.2067	1.44
	0.2061	0.2065	0.2085	0.2100	0.2111	0.2116		

1.20%,表明该方法的准确度良好。测定结果见表2。
2.1.7 耐用性试验 将供试品溶液和对照品溶液在不同检测波长(333~337 nm)、不同流速(0.8~1.2 ml/min)和不同柱温(20~35 ℃)下进行测定,其余条件均保持一致。结果表明,在不同检测波长和不同柱温下,斯皮诺素峰与周围峰分离度良好,以外标法计算含量的RSD值均不超过2%,表明该方

法在不同检测波长和流速下耐用性良好;在较高温度(35 ℃)下,以外标法计算的斯皮诺素含量显著高于较低温度下的测定结果,表明该方法的柱温应控制在20~30 ℃范围内。

2.1.8 含量测定 取3批复方枣参片,依法制备供试品溶液并测定斯皮诺素含量。3批复方枣参片斯皮诺素平均含量为0.2715 mg/片,见表3。

表2 准确度试验结果(n=6)

化合物	取样量(m/g)	样品含量(m/mg)	加入量(m/mg)	测得量(m/mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
斯皮诺素	0.996 6	0.206 0	0.205	0.407 3	98.20	99.55	1.20
	1.005 3	0.207 8	0.205	0.410 1	98.69		
	1.000 5	0.206 8	0.205	0.409 2	98.73		
	1.001 5	0.207 0	0.205	0.411 5	99.75		
	1.002 9	0.207 3	0.205	0.414 2	100.93		
	0.996 6	0.206 0	0.205	0.413 0	100.99		

表3 含量测定结果(n=6)

批号	平均片重(m/g)	称样量(m/g)	峰面积	含量(μg/ml)	斯皮诺素含量(mg/片)	
					各样品	平均值
S20150806	1.325 4	2.000 1	697.6	81.909	0.271 4	0.271 5
		2.000 0	695.4	81.650	0.270 6	
S20150808	1.327 7	2.000 0	700.1	82.204	0.273 9	0.271 8
		2.000 0	697.5	81.897	0.271 8	
S20150810	1.322 3	2.000 1	697.2	81.862	0.270 6	0.270 6
		2.000 0	697.1	81.850	0.270 6	

2.2 UV法测定总皂苷含量

2.2.1 对照品与供试品溶液的制备 对照品溶液:取人参皂苷 Re 对照品约10.0 mg,精密称定,置25 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别精密移取适量于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成质量浓度为40、80、120、160、200 μg/ml的对照品溶液。

供试品溶液:取复方枣参片粉末约1 g,精密称定,置100 ml量瓶中,加少量水,超声30 min,放冷至室温,水稀释至刻度,摇匀,静置(使固体物沉淀),取上清液,即得。

2.2.2 柱层析 在内径为1.35 cm的玻璃层析柱中加入4.25 g Amberlite XAD-2大孔树脂,上加1.48 g中性氧化铝,加70%乙醇25 ml洗脱,弃去洗脱液,再加水25 ml洗脱,弃去洗脱液。精密移取“1.4.1”项下供试品溶液1.0 ml,于层析柱中,加水25 ml洗脱,弃去洗脱液,再加70%乙醇45 ml洗脱,收集洗脱液于蒸发皿中,60 ℃水浴挥干。

2.2.3 测定方法 精确移取5%香草醛冰醋酸溶

液0.4 ml,于上述残渣中,使溶解,加高氯酸1.6 ml,混匀,转移至具塞离心管中,60 ℃水浴10 min,冰浴2 min,加冰醋酸5.0 ml,摇匀,于560 nm波长处测定吸光度。

2.2.4 线性关系考察 精密取各质量浓度对照品溶液100 μl,氮气吹干,按“2.2.3”项下方法测定吸光度,以质量浓度(X, μg/ml)对吸光度值(Y)进行线性回归,计算得到回归方程为 $Y=0.0037X-0.0119$, $r=1.0000$,结果表明,总皂苷在40~200 μg/ml范围内线性关系良好。

2.2.5 重复性试验 精密移取供试品溶液项下供试品溶液6份,每份1.0 ml,按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法进行处理并测定吸光度。计算得到总皂苷平均含量为14.425 mg/g,RSD值为1.79%,表明该方法的重复性良好。

2.2.6 准确度试验 精密移取供试品溶液项下供试品溶液6份,每份2.5 ml,置5 ml量瓶中,分别加对照品溶液项下200 μg/ml对照品溶液1.8 ml,水稀释至刻度,制备成准确度试验供试品溶液(含量100%),

按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法进行处理并测定吸光度。计算得到平均回收率为 99.85%，RSD 值为 1.46%，表明该方法的准确度良好。测定结果见表 4。

2.2.7 含量测定 取 3 批复方枣参片，依法制备供试品溶液并测定总皂苷含量。3 批复方枣参片总皂苷平均含量为 19.12 mg/片，见表 5。

表 4 准确度试验结果 (n=6)

化合物	取样量 (m/g)	样品含量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
总皂苷	0.998 5	0.360 1	0.360	0.712 9	97.99	99.85	1.46
	0.999 6	0.360 5	0.360	0.714 0	98.19		
	1.000 5	0.360 8	0.360	0.720 0	99.76		
	0.995 0	0.358 8	0.360	0.721 6	100.78		
	0.996 3	0.359 3	0.360	0.723 4	101.13		
	1.001 2	0.361 1	0.360	0.725 5	101.24		

表 5 含量测定结果 (n=6)

批号	平均片重 (m/g)	称样量 (m/g)	吸光度	含量 (μg/ml)	总皂苷含量(mg/片)	
					各样品	平均值
S20150806	1.325 4	1.000 0	0.530	146.460	19.41	19.12
		1.000 2	0.525	145.108	19.23	
S20150808	1.327 7	1.000 0	0.519	143.487	19.05	
		1.000 0	0.515	142.405	18.91	
S20150810	1.322 3	1.000 0	0.515	142.405	18.83	
		1.000 0	0.527	145.649	19.26	

3 讨论

针对皂苷类成分，本研究采用大孔树脂柱层析与香草醛-冰醋酸显色相结合的方法对其进行分离和测定。根据有关文献，最初确定了显色剂香草醛和高氯酸的用量为 0.2 ml 和 0.8 ml^[10-13]。在实际操作中发现，显色剂用量过少，可能无法充分溶解残渣。在加入高氯酸后转移至具塞离心管的过程中存在一定的损失，并且显色稳定性较差，造成显色结果差异较大。故通过单因素考察，分别对显色剂香草醛和高氯酸的用量进行研究。结果显示，在香草醛 0.4 ml，高氯酸 1.6 ml，即用量加倍的情况下，吸光度达到最高且不再增加，同时由于酸性环境的加强，使显色共轭物质更加稳定，达到了较为理想的显色效果，显著提高了方法的可操作性。

对于斯皮诺素的分离，先后采用了 Agilent TC C₁₈ (2)、Agilent Extend C₁₈、Zorbax Eclipse XDB C₁₈、Zorbax SB C₁₈ 和 Welch Ultimate XB C₁₈ 等色谱柱。斯皮诺素在 Zorbax Eclipse XDB C₁₈、Agilent Extend C₁₈ 和 Welch Ultimate XB C₁₈ 上分离效果不佳，无法实现有效分离。最终选择 Zorbax SB C₁₈ 柱，斯皮诺素出峰时间适宜，峰型良好，无拖尾，分离效果符合要求。对于方法的耐用性考察，主要

对波长、流速和柱温等常见的影响因素开展实验。测定方法在波长 ±2 nm、流速 ±20% 和柱温 ±20% 等条件变动下，含量测定结果呈现较好的稳定性和准确性，RSD 均不超过 2%。

通过 HPLC 法测定斯皮诺素含量以及 UV 法测定总皂苷含量，制剂中发挥镇静催眠作用的黄酮类成分和皂苷类成分得以控制。两种方法专属性高，具有较高的可操作性和可靠性，可以较好地应用于复方枣参片的含量控制。

【参考文献】

- [1] 胡明亚. 酸枣仁的药理作用及现代临床应用研究[J]. 中医临床研究, 2012, 4(19): 20.
- [2] 李秋玲, 王二丽, 郭素华. 中药酸枣仁镇静催眠化学成分及药理作用[J]. 天津药学, 2010, 22(5): 59-61.
- [3] 马宝兰, 秦绪花, 史载祥, 等. 西洋参临床药理研究进展 (2004-2010)[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(5): 88-92.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 366-367.
- [5] 田笑菲, 李清, 梁可, 等. RP-HPLC 双波长切换法同时测定复方酸枣仁颗粒中芒果苷和斯皮诺素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 52-55.
- [6] 刘昌辉, 黄小桃, 李颖仪, 等. LC-MS/MS 法测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A、B 和斯皮诺素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 69-72.

(下转第 173 页)

面的中性粒细胞,保护气道上皮细胞,而且能抑制炎症反应,促进组织修复,从而减少对支气管管壁的破坏^[7]。临床医师综合考虑后,采纳药师建议,给予阿奇霉素肠溶片 250 mg, qd, 口服,嘱患者定期呼吸科复诊。

2.3 降尿酸药物的调整及用药指导 该患者有痛风病史 4 年,现长期口服苯溴马隆片 50 mg, qd 治疗,临床药师进行药学查房时详细询问了患者病情,得知患者服药不规律,未正规监测血尿酸以及尿 pH 值,现仍偶有痛风发作。根据患者血肌酐及肌酐清除率,认为其肾功能损害明显。苯溴马隆为尿酸排泄药,主要通过抑制肾小管对尿酸的重吸收,从而降低血中尿酸浓度。该药药品说明书指出,中度至重度肾功能损害患者禁用苯溴马隆。临床药师建议患者可使用对肾功能影响较小的非布司他降尿酸,并告知患者在用药初始阶段,由于血清尿酸水平变化导致沉积的尿酸盐活动,可能出现痛风发作,同时给予非甾体抗炎药以及连续服用非布司他一段时间后症状会明显减轻^[8]。医师采纳了药师建议,给予口服非布司他片(40 mg, qd)联合塞来昔布胶囊(200 mg, qd, 3 d)。如果 2 周后,患者血尿酸水平高于 360 $\mu\text{mol/L}$,非布司他剂量可增至 80 mg, qd。同时鼓励患者多喝水,定期监测血清尿酸水平、尿酸碱度及肝肾功能。

3 小结

该患者病情复杂,患有多种疾病,用药种类多样。住院期间,临床药师全程参与该患者的诊疗,询问患者病情,重点针对肺部疾病进行控制,仔细观察患者用药后的治疗效果;患者出院后关注其并发症的控制情况。在抗菌药物的选择和剂量调整、抗痛风药物的选择等方面,临床药师为医师提供了专业的建议,医生综合分析后予以采纳,避免了可能的不良反应。

通过对该病例的药学监护,笔者体会到,药师在参与临床治疗过程中,不仅需要具备丰富的药学知识,更要对最新疾病诊治指南中的药物治疗进展有充分的了解,对肝肾功能不全、多种药物过敏等特殊人群,应在充分了解患者病情的基础上,结合病原学特点、各类药物的抗菌谱及药动学/药效学特点进行综合分析,制订个体化的治疗方案,才能确保患者获得最佳的药物治疗。

【参考文献】

- [1] 成人支气管扩张症诊治专家共识编写组. 成人支气管扩张症诊治专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(7): 485-492.
- [2] 李 訔, 李久荣, 高金明. 北京协和医院 136 例支气管扩张症住院患者临床特征分析[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(1): 61-67.
- [3] Wong C, Jayaram L, Karalus N, *et al.* Azithromycin for prevention of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis (EMBRACE): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2012, 380(9842): 660-667.
- [4] Altenburg J, de Graaf CS, Stienstra Y, *et al.* Effect of azithromycin maintenance treatment on infectious exacerbations among patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis: The BAT Randomized Controlled Trial[J]. *JAMA*, 2013, 309(12): 1251-1259.
- [5] Anwar GA, Bourke SC, Afolabi G, *et al.* Effects of long-term low-dose azithromycin in patients with non-CF bronchiectasis [J]. *Respir Med*, 2008, 102(10): 1494-1496.
- [6] Li H, Liu DH, Chen LL, *et al.* Meta-analysis of the adverse effects of long-term azithromycin use in patients with chronic lung diseases[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(1): 511-517.
- [7] Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, *et al.* Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143(2): 225-245.
- [8] 周启蒙, 杜冠华. 治疗高尿酸血症相关药物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(18): 2129-2135.

[收稿日期] 2016-10-18 [修回日期] 2016-12-30
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 137 页)

- [7] 解军波, 刘 艳, 张彦青, 等. HPLC 法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1653-1655.
- [8] 姜 婷, 刘婷婷, 李春雷, 等. 长芦人参、西洋参中总皂苷及单体皂苷 Re, R_{G1}, R_{B1} 的含量测定[J]. 人参研究, 2014, 26(1): 17-22.
- [9] 白 雪, 黄 鑫, 李帅坪, 等. HPLC-ESI-MS 法在西洋参总皂苷提取工艺研究中的应用[J]. 特产研究, 2016, 38(3): 25-30.
- [10] 沈 岚, 冯 怡, 徐德生, 等. 比色法测定三七花中总皂苷的含

量[J]. 中成药, 2007, 29(9): 1368-1370.

- [11] 杨 壮, 田景奎, 张 琳. 比色法测定桔梗中桔梗总皂苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(1): 58-61.
- [12] 唐 军. 比色法测定黄芪中黄芪总皂苷含量[J]. 安徽中医学院学报, 2004, 23(5): 37-38.
- [13] 李春红, 田 吉, 张金平, 等. 比色法测定黄芪总皂苷的含量[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(4): 349-351.

[收稿日期] 2016-12-22 [修回日期] 2017-02-28
[本文编辑] 李睿旻