

分散液液萃取-HPLC 测定中药化妆品中皂苷含量

卢兆晨¹, 李梦娇², 刘迪², 蒋晔^{2*} (1. 吉林大学第一医院药学部, 长春 130000; 2. 河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

摘要: 目的 建立一种简便快速的分散液液萃取法(dispersive liquid-liquid extraction method, DLLE)用于除去中药化妆品中的基质类干扰成分, 分离得到目标活性成分, 并进行含量测定。方法 取样品加甲醇溶解, 过滤, 调 pH 值至酸性。精密量取滤液 1.0 mL, 加入 3 mL 水饱和的氯仿和 0.5 mL 水, 涡旋振荡 2 min 使成均一的乳浊液。离心(3 000 r·min⁻¹, 5 min)分取上清液, 即可完成中药化妆品中基质成分的去除以及目标活性成分的纯化。结果 使用 DLLE 法对中药化妆品进行处理, 分离得到活性成分, 方法回收率为 97.3%~98.0%, 精密度和重复性良好。样品测定 3 个批号的中药护肤霜中人参皂苷 Rg1 含量测定值分别为 0.236, 0.210, 0.222 mg·g⁻¹。结论 本研究所建立的 DLLE 法操作简便, 能快速有效地去除中药化妆品中的基质干扰, 分离得到目标成分, 方法回收率高; 有机溶剂用量少, 为中药化妆品分析测定提供了一个很好的分析手段。

关键词: 分散液液萃取法(DLLE); 中药化妆品; 中药活性成分; 快速除杂

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)11-1370-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.012

引用本文: 卢兆晨, 李梦娇, 刘迪, 等. 分散液液萃取-HPLC 测定中药化妆品中皂苷含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1370-1374.

Dispersive Liquid-Liquid Extraction Coupled with HPLC for the Determination of Saponins in Chinese Medicine Cosmetics

LU Zhaochen¹, LI Mengjiao², LIU Di², JIANG Ye^{2*} (1. Department of Pharmacy, the First Hospital of Jilin College, Changchun 130000, China; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a simple and rapid dispersive liquid-liquid extraction method (DLLE) to remove the stromal interference components in traditional Chinese medicine cosmetics, so as to isolate the target active components, and to determine the isolated content. **METHODS** Sample was dissolved in methanol, then the sample solution was filtered and the filtrate pH was adjusted to acidic. The 1.0 mL filtrate was measured precisely into a centrifuge tube, then 3 mL chloroform which was saturated with water and 0.5 mL water were added successively. Subsequently, the mixture was vortexed for 2 min to form a homogeneous emulsion. Then the cloudy solution was centrifuged for 5 min, and the supernatant was collected. As a result, the removal of impurity and the separation of target content were both accomplished. **RESULTS** By using the DLLE method for pretreatment of cosmetics sample, targeted active ingredient was isolated, and the recovery of method was between 97.3% to 98.0%, and the method has good precision and repeatability. The saponins values that was measured in three batches of dermatological Chinese medicine cosmetics were 0.236, 0.210, 0.222 mg·g⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The DLLE method developed in this paper is simple, and can effectively eliminate the interference and isolate targeted ingredient. In addition the method has high recovery rate, low organic solvent consumption and thus provides a good analysis method for the determination of saponins in Chinese medicine cosmetics.

KEYWORDS: dispersive liquid-liquid extraction(DLLE); Chinese medicine cosmetics; active ingredients in Chinese medicine; rapid removal of impurity

近年来, 随着中药研究水平的不断发展, 各种以中药提取物、活性成分为主导的产品层出不穷, 其中, 中药化妆品以其天然、健康等优点及特有的治疗作用而备受消费者和患者青睐^[1-2]。中药化妆品(乳膏剂、霜剂等)一般含有赋形剂、乳化剂等多种基质成分, 在对其中的活性成分进行含量测定时, 常会面临基质干扰、测定困难等系列

问题, 极大地限制了中药化妆品的发展和临床应用。因此, 建立适当的样品前处理方法成为了中药化妆品中活性成分定量及定性分析的关键环节。

传统的化妆品前处理方法有冷冻分离法^[3-6]、传统液液萃取法(liquid-liquid extraction, LLE)^[7-9]、固相萃取法(solid phase extraction, SPE)等, 但是这些方法均存在一定缺陷。常见的中药活性成分(如

作者简介: 卢兆晨, 男, 药师 Tel: 13041371333 E-mail: 693316876@qq.com
(0311)86266069 E-mail: jiangye@hebm.edu.cn

*通信作者: 蒋晔, 男, 教授, 博导 Tel:

皂苷)一般在水相和有机相均具有良好的溶解性,且易于被基质包埋,因此采用以上方法分离除去基质成分的同时会导致目标成分损失,重现性差;此外,LLE、SPE 法操作繁琐,耗时,回收率低,且有机溶剂用量大^[7-10]。近年来,DLLE 技术作为一种新型的样品前处理方法,具有简便高效、节能环保等优点,目前已经广泛应用于复杂基质中目标成分的富集纯化^[10-14]。然而,传统的 DLLE 方法多用于萃取富集中等极性或弱极性的成分,而在中药化妆品中,基质类干扰成分也多为弱极性物质,直接采用 DLLE 方法萃取目标成分时常面临基质干扰。

本实验应用 DLLE 法快速分离除去中药化妆品中的基质类干扰成分,并结合 HPLC 对其中的活性成分进行了含量测定。

1 仪器与试剂

Acquity UPLC H-CLASS(美国 Waters); BP211D 电子天平(上海耀华检测仪器设备有限公司); JA1203N 电子天平(上海天平仪器厂)。

人参皂苷 Rg1(上海源叶生物科技有限公司,批号:Z21563601;纯度 $\geq 98\%$);甲醇(天津市风船化学试剂有限公司,分析纯);氯仿(上海化学试剂厂,分析纯);人参护肤霜[皮肤病外用,配方组成:人参皂苷 0.8 g,混合醇 80 g,甘油 100 g,单硬脂酸甘油酯 30 g,液体石蜡 80 g,HR-S1(月桂醇磷酸酯钾)30 g,甜香香精 2 g,尼泊金乙酯 0.3 g,纯化水加至 1 000 g。批号:151120,151122,151124];空白基质除不加入人参皂苷外,其余与护肤霜处方相同,由空军总医院提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 Rg1 对照品 4.26 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得 $426 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取护肤霜样品约 2.0 g,精密称定,加 10 mL 甲醇溶解,过滤,再加 5 mL 甲醇洗涤残渣,合并滤液,加入 0.25 mL 磷酸,摇匀。精密吸取上述溶液 1.0 mL,加入 3 mL 水饱和的氯仿,摇匀,精密加入 0.5 mL 水,摇匀,溶液呈乳浊态,振荡 2 min,离心($3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min),移取上清液至 2 mL 量瓶中,加甲醇定容,0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 阴性对照溶液的制备

按处方比例制备缺人参皂苷的阴性对照样

品,按“2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.4 色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂[Innoval C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)或效能相当的色谱柱];流动相 A 为乙腈-0.1%醋酸(26:74),流动相 B 为乙腈-水(90:10),梯度洗脱:0~10 min, 100%A; 10~11 min, 0%A; 11~13 min, 0%A; 13~14 min, 100%A; 14~19 min, 100%A 平衡 5 min;检测波长为 203 nm;流速为 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积为 10 μL 。

2.5 样品前处理方法的研究

考虑到中药护肤霜中除含有中药活性成分外,还含有许多赋形剂、香精、防腐剂等一系列复杂的处方成分,采用有机溶剂溶解样品直接进样时,HPLC 图谱上会呈现出许多干扰峰,不仅会影响目标成分的测定,还会给色谱柱带来危害。尝试采用不同的样品前处理方法对护肤霜样品进行处理:

方法①:取样品直接加 50%甲醇溶液溶解,震荡,离心($5\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)分层,置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 2 h 后,分取下层水相溶液,0.45 μm 滤膜过滤,进样分析。

方法②:取样品直接加乙醇溶解,过滤,滤液蒸干,加入 20 mL 水复溶,加入乙酸乙酯萃取 3 次,每次 20 mL,弃去乙酸乙酯层,取下层溶液,进样分析。

方法③:取样品直接加甲醇溶解,过滤,续滤液加正己烷萃取 3 次,弃去正己烷层,取下层溶液进样分析。

方法④:取样品直接加流动相溶解,过滤,滤液加氯仿进行提取,弃去氯仿层,剩余相氮吹,流动相复溶。

采用上述方法得到的色谱图见图 1,结果显示,无论是冷冻分离法还是乙酸乙酯 LLE、氯仿 LLE、正己烷 LLE 法都会在除去基质成分的同时导致目标成分部分或全部丢失,色谱图方法①②④中未见目标成分检出,方法③中检出目标成分,方法回收率为 50%。这主要是因为直接进行液液萃取时,由于乳化剂的存在,目标成分被基质和乳化剂包埋其中,会导致液液萃取法除去基质时,目标成分随之一起被除去。

因此,基于目标成分的溶解性能和中药化妆品的处方组成,本研究建立了一种 DLLE 法,即将样品加甲醇溶解,提取目标成分的同时破坏乳

化状态,再加入萃取剂氯仿,将基质类干扰成分萃取除去。本方法充分利用了 DLLE 方法的简便快速及卓越的纯化性能,能在极短的时间内完成目标成分的提取和基质去除,且有机溶剂消耗少,方法回收率在 99.5%左右,结果见图 1。

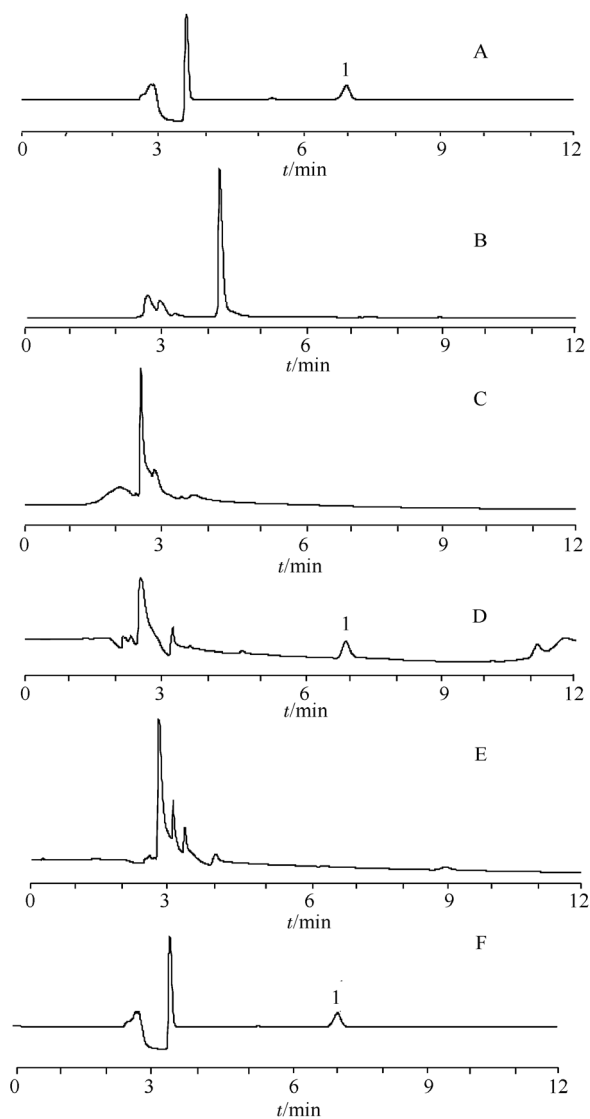


图 1 不同前处理方法得到的色谱图

A-对照品溶液色谱图; B-方法①, 冷冻分离法; C-方法②, 乙酸乙酯 LLE; D-方法③, 正己烷 LLE; E-方法④, 氯仿 LLE; F-方法⑤: DLLE; 1-人参皂苷 Rg1。

Fig. 1 Chromatograms of different pretreatment methods

A-chromatogram of reference solution; B-method ①, freezing separation; C-method ②, liquid-liquid extraction by ethyl acetate; D-method ③, liquid-liquid extraction by hexane; E-method ④, liquid-liquid extraction by chloroform; F-method ⑤, dispersive liquid-liquid extraction; 1-ginsenoside Rg1.

2.6 DLLE 方法的优化

2.6.1 分散剂种类的优化 分散剂的选择是

DLLE 法的关键,分散剂种类直接影响着目标成分在萃取剂和样品溶液之间的传质。通常分散剂与样品溶液及萃取剂都应具有良好的相容性,常见的分散剂主要有甲醇、乙腈、丙酮等。然而,本研究所建立的方法中未加入额外的分散剂,这是由于本研究中采用甲醇作为溶剂来溶解护肤霜样品,甲醇溶液可以同时作为分散剂。

2.6.2 萃取剂种类的优化 本方法使用萃取剂的目的是去除霜剂中的非极性赋形剂及辅料,其选择是关乎试验结果成功与否的重要因素,应满足以下条件:对待去除分离物质有良好的溶解能力;与分散剂相容性良好;与基质溶液不互溶。对不同种类的萃取溶剂进行了考察,以方法回收率为考察指标,当采用氯仿作为萃取剂时方法回收率约为 99.5%,因此本实验最终选用氯仿为萃取剂。

2.6.3 分散剂及萃取剂加入体积的优化 分散剂和萃取剂的体积是 DLLE 方法中的另外一个关键因素,二者的体积将直接影响样品溶液与萃取相的相分离程度,以及对目标成分的纯化和分离效果。以回收率为考察指标,对分散剂、萃取剂、水的加入量进行了考察,结果见表 1。当采用氯仿体积 3 mL,水体积 0.5 mL 时,方法回收率最高,因此本研究所有的试验都是在该条件下进行的。

2.7 方法学验证

2.7.1 系统适用性与专属性 按“2.4”项下色谱条件,分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液进样分析,色谱图显示,人参皂苷 Rg1 保留时间约为 7.0 min,与邻近组分分离良好,其他组分不干扰测定,结果表明,系统适应性良好。色谱图见图 2。

2.7.2 线性关系考察 精密量取适量“2.1”项下制备得到的人参皂苷 Rg1 对照品储备溶液,加甲醇逐级稀释为 213, 106, 53.2, 26.6, 13.3, $6.66 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按“2.4”项下色谱条件,进行色谱分析,以最小二乘法计算得到回归方程为 $A=3.6\times 10^3C+3.3\times 10^3$, $R^2=0.997$, 人参皂苷 Rg1 在 $6.66\sim 426 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好。

2.7.3 仪器精密度考察 精密吸取对照品溶液 ($426 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),按“2.4”项下色谱条件,连续进样 6 次,以峰面积计算, RSD 为 0.8%,结果显示仪器精密度良好。

表 1 分散剂及萃取剂体积的优化

Tab. 1 Optimization of the volume of disperser solvent and extraction solvent

氯仿体积/ mL	甲醇体积/ mL	水体积/ mL	分离情况	回收率/%
0.5	1	0.1	不分层	/
		0.15	不分层	/
		0.2	不分层	/
		0.3	不分层	/
		0.5	不分层	/
		0.6	不分层	/
1	1	0.1	不分层	/
		0.15	不分层	/
		0.2	不分层	/
		0.3	不分层	/
		0.5	分层且上层澄清	81.5
		0.6	分层且上层澄清	81.4
1.5	1	0.1	不分层	/
		0.15	不分层	/
		0.2	不分层	/
		0.3	分层且上层澄清	89.7
		0.5	分层且上层澄清	93.4
		0.6	分层且上层澄清	93.9
3	1	0.1	不分层	/
		0.15	不分层	/
		0.2	不分层	/
		0.3	不分层	/
		0.5	分层且上层澄清	100.2
		0.6	分层且上层澄清	94.0

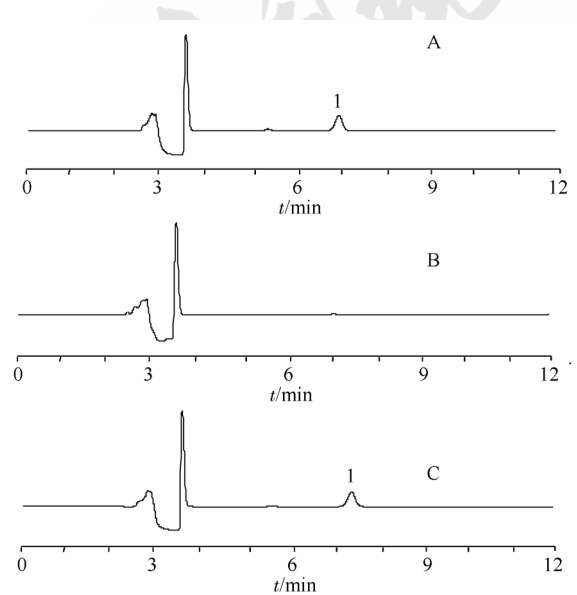


图 2 对照品、供试品及阴性对照溶液色谱图
A-对照品溶液; B-阴性对照溶液; C-供试品溶液; 1-人参皂苷 Rg1。
Fig. 2 Chromatograms of reference solution, sample solution, and negative control solution
A-reference solution; B-negative control solution; C-sample solution; 1-ginsenoside Rg1.

2.7.4 检测限与定量限 取“2.7.2”项下各浓度的对照品溶液各 10 μL 进行分析,以信噪比 $S/N=10$ 计算,可得定量限为 $6.66 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,以 $S/N=3$ 计算,可得检测限为 $2.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7.5 重复性试验 取同一批护肤霜样品 2.0 g (批号: 151120),平行取样 6 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4”项下色谱条件测定,以峰面积计算,人参皂苷 Rg1 含量分别为 0.236, 0.236, 0.234, 0.233, 0.235, 0.232 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $\text{RSD}<0.7\%$,结果表明方法重复性良好。

2.7.6 加样回收率试验 取已知含量的护肤霜样品(批号: 151122)1.0 g,精密称定,分别精密加入人参皂苷 Rg1 对照品溶液($426 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)0.5 mL,按“2.2”项下方法制备回收率试液,按“2.4”项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 加样回收率结果

Tab. 2 Experimental results of the recovery rate

称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
1.032	0.216 7	0.213 0	0.424 9	97.7	97.6	0.3
1.001	0.210 2	0.213 0	0.418 9	98.0		
1.031	0.216 5	0.213 0	0.423 7	97.3		
1.048	0.220 1	0.213 0	0.428 2	97.7		
1.074	0.225 5	0.213 0	0.433 2	97.5		
1.019	0.214 0	0.213 0	0.421 4	97.4		

2.7.7 稳定性试验 取“2.7.5”项下同一供试品溶液,分别在 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 进样,按人参皂苷 Rg1 的峰面积计算, RSD 为 0.6%,表明人参皂苷 Rg1 在 48 h 内稳定性良好。

2.7.8 耐用性考察 在“2.4”项色谱条件下,分别取“2.1”项下制备得到的人参皂苷 Rg1 对照品储备溶液和“2.2”项下制备的供试品溶液各 10 μL ,在不同品牌色谱柱、不同流速条件下测定,结果见表 3。试验结果表明不同品牌的同类型色谱柱及不同流速对人参皂苷 Rg1 的含量测定没有显著影响,均能准确地对其进行含量测定。

2.8 护肤霜样品含量测定

取护肤霜样品 3 批(批号分别为 151120, 151122 和 151124),按“2.2”项下方法制备样品溶液,每批样品平行 2 份,每份样品进 2 针,各取 10 μL 进行分析,计算含量。3 个批号(151120, 151122, 151124)的含量平均值分别为 0.236, 0.210, 0.222 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $\text{RSD}<0.9\%$,结果见表 4。

表 3 耐用性考察结果

Tab. 3 Results of durability test

考察项目	样品 峰面积	对照品 峰面积	保留时 间/min	含量/ mg·g ⁻¹	RSD/ %
色谱柱					
Innoval C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	361 446	1 288 020	7.094	0.239	0.7
Welch Ultimate C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	359 973	1 283 450	7.184	0.239	
Diamonsil C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	360 356	1 287 435	7.131	0.238	
Phenomenex C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	359 721	1 302 344	7.123	0.235	
流速					
0.8 mL·min ⁻¹	359 973	1 323 450	7.184	0.232	1.0
0.9 mL·min ⁻¹	359 024	1 329 225	6.205	0.230	
1.0 mL·min ⁻¹	358 892	1 310 154	5.547	0.233	
1.1 mL·min ⁻¹	358 789	1 339 425	5.024	0.228	

注：不同流速的耐用性考察是在 Innoval C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱条件下完成的，供试品批号为 151120。

Note: The durability of different flow rates was investigated under the condition of Innoval C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), and the batch number of the test sample was 151120.

表 4 样品含量测定结果

Tab. 4 Determination results of the sample

批号	组别	峰面积	含量/mg·g ⁻¹	平均含量/mg·g ⁻¹	RSD/%
151120	1-1	361 446	0.238	0.236	0.5
	1-2	359 328	0.236		
	2-1	357 407	0.235		
	2-2	358 887	0.236		
151122	1-1	313 023	0.207	0.210	0.9
	1-2	318 698	0.211		
	2-1	319 852	0.221		
	2-2	375 168	0.210		
151124	1-1	336 870	0.222	0.222	0.2
	1-2	337 168	0.222		
	2-1	335 919	0.221		
	2-2	226 980	0.222		

3 结论

本研究采用 DLLE 法对中药化妆品人参护肤霜中的中药活性成分人参皂苷 Rg1 进行了分离测定，方法操作简便快速，仅需两步操作就能够有效去除中药化妆品中的干扰性组分，显著提高了除杂效果，同时减少了目标成分的损失，仅需数分钟即可完成样品前处理过程，且方法回收率高，有机溶剂消耗量少。本研究所建立的 DLLE 方法为中药化妆品中的中药活性成分或提取物含量测定提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] 段明慧, 马晋芳, 张陈, 等. 中药活性成分样品前处理方法研究进展[J]. 中药材, 2017, 40(6): 1495-1498.
- [2] LIU Y H, LIU S S, MENG H. Analysis and suggestion on the distribution of patented technologies of traditional Chinese medicine cosmetics [J]. Detergent Cosmetics, 2015, 38(11): 11-14.
- [3] WANG M, WANG Y, WANG D, et al. Simultaneous determination of ginsenoside in Panax Cream by RP-HPLC [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2011, 13(6): 247-248.
- [4] XU M Z, YI L H, HU C Q. Content determination and content uniformity of tacrolimus ointment by HPLC [J]. Chin J Antibiotics(中国抗生素杂志), 2005, 30(12): 748-755.
- [5] ZUO Z H, TANG S F. Determination of hydrocortisone acetate in cream by RP-HPLC [J]. Tianjin Pharm(天津药学), 2010, 22(1): 22-24.
- [6] PAIZIYETI P, CHENG X M, TENG L, et al. Study on the quality standard for peganum harmala alkaloids cream [J]. China Pharm(中国药师), 2015, 18(11): 1864-1870.
- [7] XIONG W Z, LI L, SHI L, et al. Preparation and quality control of Zihuai Burn ointment [J]. China Pharm(中国药师), 2010, 19(22): 52-53.
- [8] 王利勇, 张云平. 参皇乳膏中主要成分的鉴别与含量测定方法的研究[J]. 医药与保健, 2010(6): 1.
- [9] LIN X X, LIU Y, ZHANG J H, et al. Simultaneous determination of five estrogens in hand cream by ultrahigh-performance liquid chromatography [J]. Sci Sin (Chimica)(中国科学), 2009, 39(8): 832-837.
- [10] CHA Y M, WANG X X, FAN Y, et al. Determination of bisphenol A in soybean milk by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. J Shanghai Univ(Nat Sci Ed)(上海大学学报: 自然科学版), 2016, 22(3): 1-8.
- [11] YU X P, FENG F, TENG B Q, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction-HPLC for the determination of magnolol and honokiol in Huoxiangzhengqi oral solution [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2012, 20(3): 264-266.
- [12] ZHANG Y J, BAI X H, LI L H, et al. Rapid determination of four kinds of furocoumarin compounds in traditional Chinese medicine by dispersive liquid-liquid microextraction [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2009, 37(12): 1805-1809.
- [13] CAO J P, DI H W, ZHOU J M, et al. A review on dispersive liquid-liquid microextraction method [J]. J Instrumental Anal, (分析测试学报) 2016, 35(7): 913-921.
- [14] BEHRUZ B, ALIREZA A, MARYAM R, et al. Comparison of ultrasound-enhanced air-assisted liquid-liquid microextraction and low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction methods for determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine samples [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015(111): 297-305.

收稿日期: 2018-06-13

(本文责编: 曹粤锋)