

中药研究

HPLC 法测定人参、三七颗粒中四种皂苷类成分的含量

柏冬¹ 胡芳² 詹旺达² 彭娟³ 范斌³

(1 北京中医药大学,北京市北三环东路11号,100029; 2 首都医科大学; 3 中国中医科学院医学实验中心)

摘要 目的:建立测定人参、三七颗粒中四种皂苷类成分含量的高效液相色谱方法。方法:Waters Nova-Pak C₁₈ (150 × 3.9mm 4μm)色谱柱,流动相为乙腈-水溶液梯度洗脱,流速为1.0mL/min,检测波长为203nm。结果:三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 分别在0.210~1.890μg, 0.822~7.398μg, 0.203~1.827μg 及 11.22~10.98μg 范围内线性关系良好,相关系数 r 均大于0.9995。三七皂苷 R1 的回收率为101.7, RSD=2.3% (n=5); 人参皂苷 Rg1 的回收率为97.4, RSD=1.3% (n=5); 人参皂苷 Re 的回收率为98.9, RSD=1.6% (n=5); 人参皂苷 Rb1 的回收率为100.4, RSD=0.9% (n=5)。结论:本方法操作简便,分离效果好,灵敏度高,重复性好,可用于控制人参、三七颗粒的质量。

关键词 人参三七颗粒;三七皂苷 R1;人参皂苷 Rg1;人参皂苷 Re;人参皂苷 Rb1

Content Determination by HPLC of Four Ginsenosides from Ginseng and Sanchi Granules

Baidong¹, Hu Fang², Zhan Wangda², et al.

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Add.: No. 11, East of North 3rd Ring Road, Beijing, Post code: 100029; 2. Capital Medical University)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of the contents of 4 Ginsenosides in granules of ginseng and sanchi. **Methods:** The determination was carried out with Waters Nova-Pak C18 column (150 × 3.9mm 4mm), using acetonitrile-water as the mobile phase (gradient elution) at a flow rate of 1 ml/min and detected at the wavelength 203 nm. **Results:** The calibration curves of Notoginsenoside R1, Ginsenoside Rg1, Ginsenoside Re, Ginsenoside Rb1 were in good linearity over the range of 0.210 - 1.890μg, 0.822 - 7.398μg, 0.203 - 1.827μg and 11.22 - 10.98μg, with $r=0.9998, 0.9999, 0.9996$ and 0.9999 , respectively. The average recoveries for Notoginsenoside R1, Ginsenoside Rg1, Ginsenoside Re, Ginsenoside Rb1 were 101.7 with RSD (n=5) 2.3%, 97.4 with RSD (n=5) 1.3%, 98.9 with RSD (n=5) 1.6%, and 100.4 with RSD (n=5) 0.9%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, accurate and reproducible, and can be used to control the qualities of granules of ginseng and sanchi.

Key Words Granule of Ginseng and Sanchi; Notoginsenoside R1; Ginsenoside Rg1; Ginsenoside Re; Ginsenoside Rb1

人参、三七临床上经常相须配伍,具有益气、活血、消瘀的功用,可用于现代医学所说的冠心病、心绞痛、冠状动脉供血不足等心脑血管疾病的治疗。本研究将人参、三七醇提后制成颗粒,方便临床使用。

2005年版《中国药典》^[1-2]中要求测定人参中人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 的含量,三七中三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 的含量。所以本制剂中选择三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 四种皂苷作为人参、三七颗粒含量测定的指标。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪包括:在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Agilent ChemStation 色谱数据工作站。

乙腈为色谱纯,人参、三七颗粒为中国中医科学院

医学实验中心自制(批号:050411、050412、050413)。

人参皂苷 Rg1 (0703-98125,供含量测定用)、人参皂苷 Re (754-9406,供含量测定用)、人参皂苷 Rb1 (110704-200318,供含量测定用)和三七皂苷 R1 (10745-200312,供含量测定用)。均购自中国药品生物制品检定所。

2 实验方法

2.1 色谱条件 Waters Nova-Pak C₁₈ (150 × 3.9mm 4μm)色谱柱;流动相为A(乙腈)-B(水)二元梯度洗脱:0~36min 18% A;36~38min 20% - 30% A;38~60min 28% A;流速为1.0mL/min,检测波长为203nm。理论塔板数按三七皂苷 R1 计应不低于4000、人参皂苷 Rb1 计应不低于6000、人参皂苷 Re 计应不低于4000和人参皂苷 Rb1 应不低于6000。

2.2 测定波长的选择 参考2005版药典人参、三七

含量测定项下检测波长,选择 203nm 作为检测波长。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取三七皂苷 R1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 四种对照品用甲醇配制成每 1mL 含三七皂苷 R1 0.21mg、人参皂苷 Rg1 0.822mg、人参皂苷 Re 0.203mg、人参皂苷 Rb1 1.22mg 的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.4 供试品溶液的制备 取本品装量差异项下的内容物,混匀,取 0.5g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 50mL,称定重量,置水浴回流 2h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,用微孔滤膜(0.45 μ m)过滤,即得。

2.5 干扰试验 取阴性样品(缺人参、三七),按“供试品溶液的制备”方法制成阴性对照液。按上色谱条件,分别取供试品溶液、对照品溶液、阴性照液各 20 μ L,注入色谱仪,依法测定。结果缺人参、三七供试品溶液在三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 峰的位置上无干扰。

2.6 标准曲线的制备 精密吸取“2.3”项下的三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 混合对照品溶液各 1 μ L、3 μ L、5 μ L、7 μ L、9 μ L,注入液相色谱仪,测定色谱峰峰面积。以对照品量(μ g)为横坐标,色谱峰峰面积为纵坐标绘制标准曲线。计算三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 的回归方程分别为: $Y = 248.98X + 3.075$ $r = 0.9998$; $Y = 274.93X + 14.39$ $r = 0.9999$; $Y = 239.73X + 6.955$ $r = 0.9996$; $Y = 185.16X + 15.88$ $r = 0.9999$ 。

结果表明三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 分别在 0.210 ~ 1.890 μ g, 0.822 ~ 7.398 μ g, 0.203 ~ 1.827 μ g 及 1.22 ~ 10.98 μ g 范围内线性关系良好。

2.7 精密度试验 取“2.4”项下供试品溶液,重复进样 5 次,记录三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 色谱峰峰面积,计算 RSD 分别为 1.3%、1.7%、2.4% 和 1.0% ($n = 5$)。

2.8 稳定性试验 取同一供试品,按供试品溶液的制备方法操作,分别于制备后 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24h 依法测定,计算三七皂苷 R1 RSD = 1.8%, 人参皂苷 Rg1 RSD = 0.5%, 人参皂苷 Re RSD = 2.0%, 人参皂苷 Rb1 RSD = 1.2%, 结果表明供试品溶液在 24h 内稳定性较好。

2.9 重复性试验 取同一批号样品 5 份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.11”项下方法测定含量。

连续测定 5 次,计算三七皂苷 R1 平均含量为 1.008%, RSD = 1.5% ($n = 5$); 人参皂苷 Rg1 平均含量为 4.599%, RSD = 2.5% ($n = 5$); 人参皂苷 Re 平均含量为 1.111%, RSD = 2.7% ($n = 5$); 人参皂苷 Rb1 平均含量为 5.874%, RSD = 2.3% ($n = 5$)。

2.10 回收率试验 精密称取已测知三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 含量的人参、三七颗粒内容物 5 份,每份约 0.25g,置 100mL 锥形瓶中,分别精密加入三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 对照品混合溶液(三七皂苷 R1 0.21mg $\cdot$ mL⁻¹、人参皂苷 Rg1 0.822mg $\cdot$ mL⁻¹、人参皂苷 Re 0.203mg $\cdot$ mL⁻¹和人参皂苷 Rb1 1.22mg $\cdot$ mL⁻¹)25ml,精密加入 25ml 甲醇,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取上述溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,按“2.11”项下方法测定三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb1 含量及回收率。三七皂苷 R1 的回收率为 101.7, RSD = 2.3% ($n = 5$); 人参皂苷 Rg1 的回收率为 97.4, RSD = 1.3% ($n = 5$); 人参皂苷 Re 的回收率为 98.9, RSD = 1.6% ($n = 5$); 人参皂苷 Rb1 的回收率为 100.4, RSD = 0.9% ($n = 5$)。

2.11 样品含量测定 取 3 批样品按“2.4”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 10 μ L,对照品溶液 5 μ L,注入液相色谱仪,测定色谱峰峰面积,外标一点法计算含量。结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果

批次	三七皂苷 R1 含量	RSD	人参皂苷 Rg1 含量	RSD	人参皂苷 Re 含量	RSD	人参皂苷 Rb1 含量	RSD
050411	1.008	0.7	4.599	1.3	1.111	0.9	5.874	0.3
050412	0.985	1.2	4.689	0.8	1.069	1.4	6.183	0.4
050413	1.004	0.9	4.727	1.2	1.084	1.3	6.241	0.6

3 讨论

3.1 测定结果表明,该方法操作简便,测定结果准确、稳定,重复性好,为人参、三七颗粒质量控制提供了一种有效的分析方法。

3.2 在供试品溶液制备条件探索中,比较了不同提取溶剂量 25mL、50mL、100mL 的提取效果,并考察了超声 60min 及回流 1h、2h、3h 的提取方法及提取时间,最后确定文中的制备方法。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:7.
- [2] 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:10.

(2009-08-04 收稿)□