

高效液相色谱法测定黄七胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 的含量

彭修娟¹ 杜志德¹ 顿宝生¹ 杨新杰²

(1 陕西国际商贸学院, 咸阳, 712046; 2 陕西中医学院, 咸阳, 712046)

摘要 目的: 优选流动相参数, 建立高效液相色谱法(HPLC)测定复方制剂黄七胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 含量的方法。方法: 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以乙腈为流动相 A, 以水为流动相 B, 考察最佳梯度洗脱参数。结果: 最佳梯度为 0~30 min, 乙腈 19→40, 水 81→60。在此条件下, 人参皂苷 R_{g_1} 进样量在 0.849 6~7.646 4 μg , R_{b_1} 在 0.853 8~8.853 8 μg , 三七皂苷 R_1 在 0.202 0~2.020 0 μg 范围内皆与峰面积呈良好的线性关系。结论: 该流动相梯度洗脱比例提高了峰面积和理论塔板数, 并节省了 time。

关键词 黄七胶囊; 高效液相色谱法; 人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} ; 三七皂苷 R_1

Content Determination of Ginsenoside R_{g_1} , R_{b_1} and Notoginsenoside R_1 in HuangQi Capsules by HPLC

Peng Xiujuan¹, Du Zhide¹, Dun Baosheng¹, Yang Xinjie²

(1 Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China;

2 Shaanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

Abstract Objective: To choose optimal flow phase parameters and establish a content determining of ginsenoside R_{g_1} , R_b and notoginsenoside R_1 in HuangQi Capsules by HPLC. **Methods:** The octadecyl silane chemically bonded silica was used as filler, acetonitrile as mobile phase A and water as mobile phase B. **Results:** The optimum gradient: 0~30 min, acetonitrile: 19→40, and water: 81→60. On this condition, the sample size of ginsenoside R_{g_1} : 0.8496~7.6464 μg , R_{b_1} : 0.8538~8.8538 μg , and notoginsenoside R_1 : 0.2020~2.0200 μg , were all in good liner relation with peak area. **Conclusion:** The mobile phase gradient elution scale improved peak area and number of theoretical plates, and saves time.

Key Words HuangQi Capsules; HPLC; Ginsenoside R_{g_1} and R_{b_1} ; Notoginsenoside R_1

中图分类号: R284 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.01.051

中风又名卒中, 其基本病机为阴阳失调、气血逆乱、上犯于脑, 导致脑脉痹阻或血溢脑脉之外, 临床以卒然昏仆、不省人事、半身不遂、口舌歪斜、语言不利、偏身麻木为主症的一种疾病^[1]。因本病起病急剧, 变化迅速, 与自然界善行而数变之风邪特性相似, 故古人以此类比, 名为中风^[2]。中风是中医学中的 4 大顽疾之一, 具有发病率高、复发率高、致残率高、病死率高的特点, 严重危害人民健康的疾病^[3]。中风初发时以风证为主; 发病 1~2 周时, 以痰湿证、血瘀证为多; 恢复期以血瘀证、气虚证为多^[4]。现代血液流变学研究表明, 中风患者血液存在着“浓”(红细胞比容增高)、“黏”(全血黏度比、血浆黏度比和纤维蛋白原增高)、“聚”(红细胞时间性泳时间长)的情况^[5]。故益气活血法为中风、特别是中风恢复期的重要治疗法则。

黄七胶囊是在黄七汤的基础上研制而成, 由黄

芪、土鳖虫、三七、葛根四味药材组成, 具有益气活血, 化瘀通络之功效。用于气虚血瘀, 脉络瘀阻所致的中风恢复期, 对半身不遂, 肢体麻木, 口眼歪斜, 言语不清或不语, 感觉减退或消失治疗效果良好^[6]。方中佐药三七具有散瘀止血、消肿止痛之功效, 《医学衷中参西录》谓之: “化瘀血而不伤新血, 允为理血妙品”^[7]。现代研究证明, 三七具有明显的脑组织保护作用且能改善脑部血液循环^[8,9]; 三七所含的人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 等有效成分能明显扩张脑血管、降低脑血管阻力、增加脑血管血流量, 对颈部动脉亦有扩张作用, 对颅脑损伤有保护作用^[10-11]; 可改善脑缺血再灌注损伤后脑组织能量代谢, 促进缺血脑组织对能量物质的利用^[12]; 能减轻缺血脑组织的炎性反应, 保护缺血脑组织^[13]; 能保护神经元, 降低脑缺血后梗死体积及水肿体积^[14]; 能改善血管内皮功能, 降低血液黏度, 抑制血小板活

化和聚集从而具有抗血栓形成的作用^[15]。在新药研制过程中,对黄七胶囊中三七的3种功效成分—人参皂苷R_{g₁}、R_{b₁}及三七皂苷R₁进行方法学研究,建立科学合理、专属性强的高效液相含量测定方法。所建方法专属性强、重现性好、样品检测结果稳定,可用于本制剂的质量控制。此外,按不同的比例的乙腈-水进行梯度洗脱,以峰面积为筛选指标,优选出3种成分的最佳流动相比比例完全相同,即:0~30 min,乙腈19→40,水81→60。该流动相梯度洗脱比例同《中华人民共和国药典》2010年版一部^[16]比较,提高了峰面积和理论塔板数,并节省了时间。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 P3000型高效液相色谱仪,P3000型紫外检测器;CXTH-3000色谱工作站,7725i进样器;UV-755B紫外可见分光光度计。

1.2 试药 10批样品由杨凌无为制药集团有限公司自制;人参皂苷R_{g₁}对照品(批号:110703-200726)、人参皂苷R_{b₁}对照品(批号:110704-200420)、三七皂苷R₁对照品(批号:110745-200617),皆为供含量测定用,由中国药品生物制品检定所提供。3批研究用中试样品由该公司胶囊剂车间生产;乙腈和甲醇皆为色谱纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

2.1.1 色谱条件 以十八烷基硅烷合硅胶为填充剂,柱压:11.0 MPa,流速:1.0 mL/min;柱温:45℃。理论板数按三七皂苷R₁峰计算应不低于4 000。拖尾因子为1.03。

2.1.2 流动相的选择比例 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈为流动相A,以水为流动相B,按表1中的规定进行梯度洗脱,按正文方法用对照品溶液作图,以峰面积为筛选指标,找出最佳流动相比比例。三七皂苷R₁对照品、人参皂苷R_{g₁}对照品、人参皂苷R_{b₁}对照品流动相结果见表2~4。

表 1 流动相梯度设置			
比例	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
1	0~12	19	81
	12~60	19→36	81→64
2	0~15	19→40	81→60
	15~25	40→20	60→80
3	0~20	19→40	81→60
	20~26	40→20	60→80
4	0~25	19→42	81→58
	25~30	42→20	58→80
5	0~30	19→40	81→60

表 2 三七皂苷 R ₁ 对照品流动相选择结果							
	第一时间	乙腈	第二时间	乙腈	峰面积 1	峰面积 2	平均峰面积
1	0~12	19	12~60	19→36	253 931	257 277	255 604
2	0~15	19→40	15~25	40→20	264 262	267 027	265 644
3	0~20	19→40	20~26	40→20	291 416	298 301	294 858
4	0~25	19→42	—	—	297 219	298 403	297 811
5	0~30	19→40	—	—	300 541	295 489	298 015

注:—为无数据

表 3 人参皂苷 R _{g₁} 对照品流动相选择结果							
	第一时间	乙腈	第二时间	乙腈	峰面积 1	峰面积 2	平均峰面积
1	0~12	19	12~60	19→36	1 500 580	1 513 032	1 506 806
2	0~15	19→40	15~25	40→20	1 460 491	1 479 046	1 469 768
3	0~20	19→40	20~26	40→20	1 554 658	1 593 346	1 574 002
4	0~25	19→42	—	—	1 592 267	1 621 954	1 607 110
5	0~30	19→40	—	—	1 645 210	1 669 714	1 657 462

注:—为无数据

表 4 人参皂苷 R _{b₁} 对照品流动相选择结果							
	第一时间	乙腈	第二时间	乙腈	峰面积 1	峰面积 2	平均峰面积
1	0~12	19	12~60	19→36	1 002 355	972 279	987 317
2	0~15	19→40	15~25	40→20	951 565	947 023	949 294
3	0~20	19→40	20~26	40→20	1 009 793	1 042 445	1 026 119
4	0~25	19→42	—	—	1 040 186	1 077 414	1 058 800
5	0~30	19→40	—	—	1 075 357	1 094 745	1 085 051

注:—为无数据

从表1可以看出,比例5为最佳流动相洗脱比例,即:时间0~30 min,流动相A19%→40%,流动相B81%→60%。

该洗脱比例同《中华人民共和国药典》2010年版一部三七含量测定项下的流动相梯度洗脱比例相比较,提高了峰面积和理论板数,并节省了检验时间。在此条件下,三七皂苷R₁及人参皂苷R_{g₁}、R_{b₁}的保留时间分别为:12.865 min、14.647 min、26.714 min。对照品、中试样品、三七的阴性对照色谱图分别见图1~3。

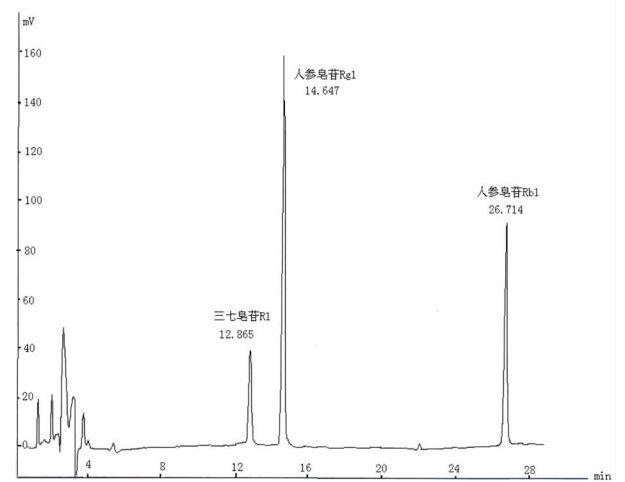


图 1 三七皂苷 R₁ 及人参皂苷 R_{g₁}、R_{b₁} 色谱图

2.2 提取方法

2.2.1 提取溶剂的选择 人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 在甲醇、乙醇和水中均有较好的溶解度,用水、50% 甲醇、100% 甲醇、50% 乙醇和 100% 乙醇提取并进行比较,选择出最佳的提取溶剂。取样品(批号:20140406)5 份(约 1.0 g)精密称定,分别精密加入上述 5 种溶剂 50 mL,称定质量,放置过夜,置 80 ℃ 水浴上保持微沸 2 h、放冷,再称定质量,分别用 5 种溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪测定,结果表明,用甲醇作为提取溶剂 3 种皂苷提取率最高,杂质干扰最少,故选择甲醇作为提取溶剂。

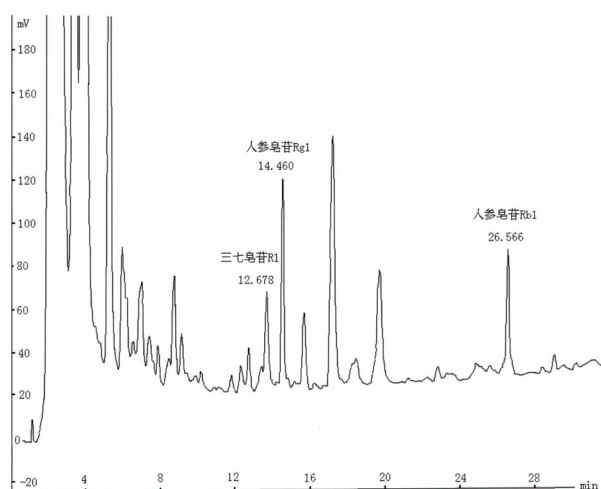


图2 中试样品色谱图

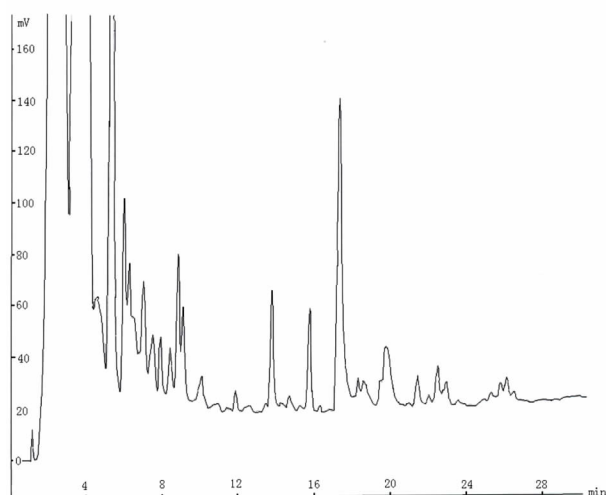


图3 三七的阴性对照色谱图

2.2.2 提取时间的确定 分别称取样品约 1.0 g(批号 20140406)5 份,精密称定,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,放置过夜,置 80 ℃ 水浴上保持微沸 0.5、1、2、3、4 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液。分别精密吸取对

照品与供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,结果表明,保持微沸 3 h,即可使样品中 3 种皂苷提取率最高,故保持微沸时间确定为 3 h。

2.3 测定方法的选择

2.3.1 最大吸收波长的选择 分别吸取人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 对照品溶液(浓度分别为:0.424 8 mg/mL、0.426 9 mg/mL、0.101 0 mg/mL)在 200 ~ 250 nm 范围内进行光谱扫描,结果表明,3 种皂苷在 203 nm 处皆有最大吸收。

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 对照品溶液(浓度分别为:0.424 8 mg/mL、0.426 9 mg/mL、0.101 0 mg/mL)2、4、8、12、18 μ L,HPLC 测定峰面积,三者的回归方程分别为 $Y = 377341X + 31058.2$ ($r = 0.999\ 9, n = 6$)、 $Y = 285\ 201X + 461\ 3.9$ ($r = 0.999\ 9, n = 6$)、 $Y = 398\ 066X - 159\ 9.4$ ($r = 0.999\ 9, n = 6$)。

研究结果表明,人参皂苷 R_{g_1} 进样量在 0.849 6 ~ 7.646 4 μ g, R_{b_1} 在 0.853 8 ~ 8.853 8 μ g,三七皂苷 R_1 在 0.202 0 ~ 2.020 0 μ g 范围内皆与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 稳定性试验 取本品(批号 20140406)精密称定,按优选的提取方法制备供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24 h 进行测定,即得。结果上述 3 种皂苷的 RSD 分别为 1.51%、1.21%、1.30%,表明本品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 精密度试验 取人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 以及三七皂苷 R_1 对照品溶液,重复测定 5 次,记录峰面积,结果上述 3 种皂苷的 RSD 分别为 0.93%、0.69%、0.42%,结果表明本方法精密度较好。

2.3.5 重复性试验 取批号为 20140406 的样品 6 份,按优选的提取方法制备供试品溶液,测定含量,结果上述 3 种皂苷的 RSD 分别为 1.89%、1.59%、1.37%,表明本方法重复性良好。

2.3.6 回收率试验 取已知含量的样品(批号 20140406,人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 以及三七皂苷 R_1 的含量分别为 5.490 7 mg/粒、4.342 8 mg/粒、1.057 7 mg/粒)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 以及三七皂苷 R_1 对照品溶液(浓度分别为 0.335 8 mg/mL、 R_{b_1} 0.329 3 mg/mL、0.168 1 mg/mL)25 mL,再精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,放置过夜,置 80 ℃ 水浴上保持微沸 3 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,依法测定,结果三者的平均回收率分别为 99.60% ($RSD = 1.53\%$)、100.10% (RSD

= 1.68%)、99.04% ($RSD = 1.40\%$)。结果表明,三者的回收率均良好。

2.4 样品测定 按处方量的1/10,分别制备7批样品,连同成型工艺研究试验的3批样品,依据正文中含量测定方法,进行含量测定。见表5。经对10批样品中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 的总量的测定,平均值为11.04 mg/粒,考虑到药材来源及大工业生产等因素,暂定每粒含三七以人参皂苷 R_{g_1} ($C_{42}H_{72}O_{14}$)、人参皂苷 R_{b_1} ($C_{54}H_{92}O_{23}$) 和三七皂苷 R_1 ($C_{47}H_{80}O_{18}$) 三者的总量计,不得少于8.8 mg。

表5 样品中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 总量测定结果

序号	批号	测得值(mg/粒)		平均测得值 (mg/粒)
		1	2	
1	20140402	10.81	10.80	10.8
2	20140404	11.05	11.15	11.1
3	20140406	10.91	10.87	10.9
4	20140409	11.03	11.41	11.2
5	20140411	10.97	11.11	11.0
6	20140414	10.48	10.67	10.6
7	20140419	10.65	10.55	10.6
8	20140423	10.99	10.97	11.0
9	20140425	11.57	11.65	11.6
10	20140428	11.58	11.62	11.6

2.5 验证实验 采用云南文山产的三七投料,制得的3批中试样品,批号:20140602、20140605、20140608,对三七所含人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 及三七皂苷 R_1 的总量进行了测定。另外在该处方中取掉三七,按正文生产工艺投料制作,制成阴性对照品,分别进行含量测定。见表6。

表6 中试样品含量测定结果

批号	测得值(mg/粒)		平均测得值 (mg/粒)
	1 #	2 #	
20100602	10.92	10.88	10.9
20100605	11.11	11.09	11.1
20100608	10.98	11.02	11.0

以上3批中试样品含量均符合规定,平均测得值为11.0 mg/粒,含量测定成分的转移率为80.0%,证明该标准所制定的三七含量限度可行,阴性对照品在相应部位未出峰,证明处方中其他药材对本含量测定无干扰。

3 讨论

在流动相选择比例试验中,以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈为流动相A,以水为流动相B,这和中华人民共和国药典2010年版一部三七含量测定项下一致^[5]。按不同的A与B的比例进行

梯度洗脱,以峰面积为筛选指标,优选出的流动相梯度洗脱比例同中华人民共和国药典比较,提高了峰面积和理论塔板数,并节省了时间。经分别筛选,3种成分的最佳流动相比比例完全相同。

虽然提取溶剂与中华人民共和国药典相同皆用甲醇,但提取时间由中华人民共和国药典的2 h 优选成了3 h,在这样的时间条件下,3种皂苷的提取率皆最高。

在本实验条件下,稳定性、精密度、重复性、线性关系良好。3种功效成分的回收率皆在99%以上,经10批样品及3批中试样品的验证实验,证明该标准所制定的三七含量限度可行,阴性对照品在相应部位未出峰,证明处方中其他药材对本含量测定无干扰。

参考文献

[1]肖丽,张志花,韩立民. 中风的古代文献及现代医学研究综述[J]. 赣南医学院学报,2011,31(1):160-161.

[2]黄小波,胡杰. 回天再造丸在中风病中的辨证应用[J]. 首都医药,1998,5(8):32.

[3]马正宏. 益气活血化痰法治疗缺血性中风48例[J]. 河南中医学院学报,2006,21(5):48.

[4]王顺道,任占立,杜梦华,等. 中风病始发态证候发生与组合规律的临床研究[J]. 中国医药学报,1996,11(3):17-20.

[5]张宁兴. 中医活血化瘀治疗脑卒中研究概况[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2003,1(5):292-293.

[6]赵乃平,符金荣. 黄七汤治疗中风恢复期的临床研究[J]. 现代中医药,2010,30(6):14-15.

[7]张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 山西:山西科学技术出版社,2009:46.

[8]韩吉安,匡永勤,周虎田,等. 三七总皂甙对家兔脑损伤后脑组织中丙二醛含量变化的影响[J]. 中国病理生理杂志,2000,16(3):269-271.

[9]伍杰雄,孙家钧. 三七总皂甙对 Sprague-Dawley 种系大鼠脑循环的影响[J]. 现代应用药学,1995,12(1):1-3.

[10]韩吉安,胡威夷,孙增会. 颅脑损伤后钙、钙调蛋白的变化及三七总皂甙的治疗作用[J]. 中国中西医结合杂志,1999,19(4):227-229.

[11]苏萍,王蕾,杜仕静,等. 三七皂苷对神经系统疾病药理作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(23):4516-4521.

[12]黄小平,王蓓,邱咏园,等. 黄芪甲苷和三七的主要有效成分伍对小鼠脑缺血再灌注后脑组织能量代谢的影响[J]. 中草药,2014,45(2):220-226.

[13]何蔚,朱遵平. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤血清 IL-8 的影响[J]. 放射免疫学杂志,2002,15(5):267-268.

[14]张丽君,耿志辉. 三七总皂苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护研究[J]. 吉林医学,2007,28(11):1261-1262.

[15]苏雅,赵益桂,张宗鹏,等. 三七三醇皂甙对动物血小板功能及血栓形成的影响[J]. 中草药,1996,27(11):666-669.

[16]国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:11.