

高效液相色谱法测定人参补气胶囊中 人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 含量

李红琴¹, 齐莉莎², 钱一帆³

1. 南京医药产业(集团)有限责任公司, 江苏 南京 210008; 2. 南京中山制药有限公司, 江苏 南京 210046;

3. 南京中科药业有限公司, 江苏 南京 210008

摘要:目的 建立人参补气胶囊的含量测定方法。方法 采用安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 以乙腈为流动相 A, 以水为流动相 B, 梯度洗脱(0~35 min, 19%A; 35~55 min, 19%~29%A; 55~70 min, 29%A; 70~100 min, 29%~40%A), 检测波长 203 nm, 流速 1.0 mg/mL, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 对制剂中的人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 进行定量测定。结果 人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb_1 的线性范围分别为 0.452~4.068 μ g ($r^2=0.9996$)、0.4676~4.2084 μ g ($r=0.9995$) 和 1.0832~9.7488 μ g ($r=0.9998$), 平均回收率分别为 99.96% (RSD=2.24%)、99.95% (RSD=2.14%) 和 99.06% (RSD=2.94%)。结论 本试验所建立的方法分离效果好、简便、快捷, 重复性好, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 人参补气胶囊; 高效液相色谱法; 人参皂苷 Rg_1 ; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb_1

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2013.02.023

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2013)02-0062-03

Determination of Ginsenoside Rg_1 , Ginsenoside Re and Ginsenoside Rb_1 in Renshen Buqi Capsule by HPLC LI Hong-qin¹, QI Li-sha², QIAN Yi-fan³ (1.Nanjing Medical Group Co., Ltd, Nanjing 210008, China; 2.Nanjing Zhongshan Pharmacy Co., Ltd., Nanjing 210046, China; 3.Zhongke Pharmacy Co., Ltd, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the determination of ginsenoside Rg_1 , ginsenoside Re and ginsenoside Rb_1 in Renshen Buqi Capsule. **Methods** An Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) was used. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and water (B) with gradient elution (0–35 min, 19%A; 35–55 min, 19%–29%A; 55–70 min, 29%A; 70–100 min, 29%–40%A) at a flow rate of 1.0 mg/mL. The wavelength of detector was 203 nm, and the temperature of the column was 30 $^{\circ}$ C. **Results** The calibration curves showed good linearity in the range of 0.452–4.068 μ g (ginsenoside Rg_1), 0.4676–4.2084 μ g (ginsenoside Re) and 1.0832–9.7488 μ g (ginsenoside Rb_1). The average recovery ($n=9$) was 99.96%, 99.95% and 99.06%, and RSD was 2.44%, 2.14% and 2.94%, respectively. **Conclusion** The method is simple, reliable and rapid with good repeatability. It can be applied to the quality control of Renshen Buqi Capsule.

Key words: Renshen Buqi Capsule; HPLC; ginsenoside Rg_1 ; ginsenoside Re; ginsenoside Rb_1

人参补气胶囊由人参、红参、红参须 3 味中药组成, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津、安神的功效^[1]。临床多用于体虚欲脱、肢冷脉微、脾虚食少、肺虚喘咳、津伤口渴、内热消渴、久病虚羸、惊悸失眠、阳痿宫冷、心力衰竭、心源性休克等症。方中 3 味中药均以人参皂苷为其主要活性成分^[2], 原标准中含量测定是通过称量提取纯化制剂中的总皂苷的重量来测定, 由于总皂苷的纯化方法复杂, 重复性较差, 试验结果误差较大, 且有效成分不明确。采用高效液相色谱法(HPLC)测定处方药材中人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 的含量研究则多有报道^[3-8], 我们参考上述相关文献, 同时参考 2005 年版《中华人民共和国药典》人参含量测定项下方法^[9], 选取人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 为含量测定的指标成分, 采用 HPLC 建立人参补气胶囊有效成分含量测定的方法, 以保证本制剂的质量

及临床疗效。

1 仪器与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪(G1311A QUATPUMP 泵, G1314A VWD 检测器, G1322 DEGASSER 脱气机, TC-120 柱温箱, 上海市精密科学仪器有限公司), 色谱软件系统 Rev.A.10.02, KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

人参补气胶囊 3 批(批号 20090901、20090902、20090903), 南京中科药业有限公司提供。人参皂苷 Rg_1 (批号 110703-200726)、人参皂苷 Re(批号 110754-200822)、人参皂苷 Rb_1 (批号 110704-200420)对照品, 中国药品生物制品检定所提供。乙腈为色谱纯, 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱(0~35 min, 19%A;

通讯作者: 钱一帆, E-mail: qyfzhongke@126.com

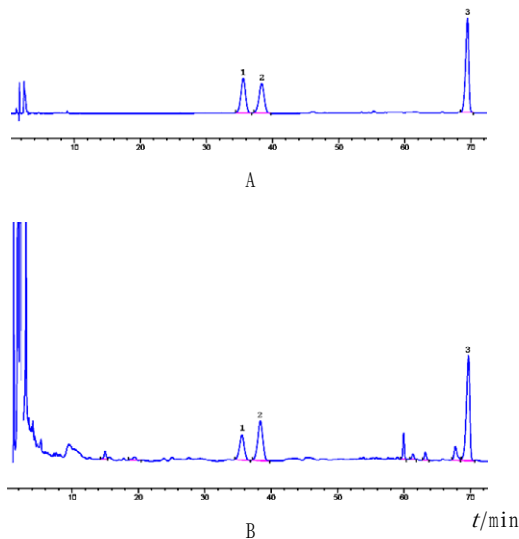
35~55 min,19%~29%A;55~70 min,29%A;70~100 min,29%~40%A);柱温:30℃;检测波长:203 nm;流速:1.0 mg/mL;进样量:20 μL。理论塔板数应不低于 6 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取置五氧化二磷干燥器干燥 12 h 以上的对照品人参皂苷 R_{g_i} 11.30 mg、人参皂苷 Re 11.69 mg、人参皂苷 R_{b₁} 13.54 mg,分别置 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品储备液,浓度分别为 1.130、1.169、1.354 mg/mL。

2.3 供试品溶液的制备

取人参补气胶囊(批号 20090901)内容物(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置索氏提取器中,加适量二氯甲烷加热回流 3 h,弃去二氯甲烷液,药渣挥干溶剂,连同滤纸筒移入 100 mL 锥形瓶中,精密加水饱和正丁醇 50 mL,密塞,放置过夜,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)30 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 25 mL,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,精密量取续滤液 1 mL 置入 2 mL 量瓶中,20%甲醇-水稀释至刻度,摇匀,备用。见图 2。



注:A.对照品;B.供试品;1.人参皂苷 R_{g_i};2.人参皂苷 Re;3.人参皂苷 R_{b₁}

图1 人参补气胶囊 HPLC 图

2.4 标准曲线的绘制

精密吸取人参皂苷 R_{g_i}、人参皂苷 Re 对照品储备液 0.10、0.30、0.50、0.70、0.90 mL 和人参皂苷 R_{b₁} 对照品储备液 0.20、0.60、1.00、1.40、1.80 mL,依次将吸取的上述对照品储备液置 5 mL 的量瓶中,加入 20%甲醇-水稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,测定。以峰面积值为纵坐标、以对照品浓度为横坐标,绘制标准曲线,经线性回归计算,分别得线性回归方程和相关系数。人参皂苷 R_{g_i}: $Y=6.029 2X-2.620 0$, $r^2=0.999 6$; 人参皂苷 Re: $Y=5.579 4X-9.617 5$, $r^2=0.999 5$; 人参皂苷 R_{b₁}: $Y=4.707 3X+30.790 0$, $r^2=0.999 8$ 。三者分别在 0.452~4.068 μg、0.467 6~4.208 4 μg、1.083 2~9.748 8 μg

范围内呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液(人参皂苷 R_{g_i} 113 μg/mL、人参皂苷 Re 116.9 μg/mL、人参皂苷 R_{b₁} 270.8 μg/mL)20 μL,连续进样 6 次,计算平均峰面积值,三者 RSD 分别为 1.26%、1.29%、1.27%,结果表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取人参补气胶囊(批号 20090901)粉末约 0.5 g,共 6 份,精密称定,按“2.3”项下方法依法制备,每份连续进样 2 次,每次 20 μL,测得峰面积并计算含量。结果 RSD 值分别为人参皂苷 R_{g_i} 2.55%、人参皂苷 Re 2.24%、人参皂苷 R_{b₁} 2.94%。

2.7 稳定性试验

取重复性项下 1 号样品溶液在 12 h 内测定 5 次,每次进样 20 μL。其 RSD 值分别为人参皂苷 R_{g_i} 2.19%、人参皂苷 Re 0.62%、人参皂苷 R_{b₁} 1.29%,结果表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称定已知含量的(批号 20090901)样品 0.25 g,添加已知含量 80%、100%、120%的对照品溶液。按照“2.3”项下方法依法制备样品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果见表 1~表 3,表明本法具有良好的加样回收率。

2.9 样品含量测定

取人参补气胶囊不同批号(20090901、20090902、20090903)的粉末约 0.5 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件测定,含量测定结果见表 4。

表1 人参皂苷 R_{g_i} 加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.235 8	0.782 9	0.653	1.416 8	97.09	99.96	2.44
0.235 8	0.782 9	0.653	1.433 4	99.63		
0.246 1	0.817 0	0.653	1.449 6	96.88		
0.246 1	0.817 0	0.653	1.443 7	95.97		
0.245 8	0.816 0	0.653	1.460 6	98.71		
0.245 8	0.816 0	0.653	1.467 5	99.78		
0.265 4	0.881 1	0.914	1.765 1	96.72		
0.265 4	0.881 1	0.914	1.782 3	98.60		
0.259 8	0.862 5	0.914	1.772 1	99.51		
0.259 8	0.862 5	0.914	1.766 8	98.93		
0.264 5	0.878 1	0.914	1.791 6	99.95		
0.264 5	0.878 1	0.914	1.804 6	101.37		
0.260 4	0.864 5	1.175	2.091 2	104.40		
0.260 4	0.864 5	1.175	2.073 3	102.86		
0.262 8	0.872 5	1.175	2.066 0	101.58		
0.262 8	0.872 5	1.175	2.085 9	103.27		
0.261 5	0.861 8	1.175	2.068 3	102.14		
0.261 5	0.861 8	1.175	2.066 3	101.97		

表2 人参皂苷 Re 加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.235 8	1.424 2	1.152	2.586 0	100.85	99.95	2.14
0.235 8	1.424 2	1.152	2.617 1	103.56		
0.246 1	1.486 4	1.152	2.622 5	98.62		
0.246 1	1.486 4	1.152	2.601 4	96.79		
0.245 8	1.484 6	1.152	2.616 1	98.22		
0.245 8	1.484 6	1.152	2.613 9	98.03		
0.265 4	1.603 0	1.613	3.186 4	98.17		
0.265 4	1.603 0	1.613	3.203 6	99.23		
0.259 8	1.569 1	1.613	3.198 2	100.99		
0.259 8	1.569 1	1.613	3.199 6	101.08		
0.264 5	1.597 6	1.613	3.220 1	100.59		
0.264 5	1.597 6	1.613	3.264 5	103.34		
0.260 4	1.572 8	2.074	3.667 1	100.98		
0.260 4	1.572 8	2.074	3.635 9	99.48		
0.262 8	1.587 3	2.074	3.649 2	99.42		
0.262 8	1.587 3	2.074	3.668 5	100.35		
0.261 5	1.579 5	2.074	3.653 8	100.02		
0.261 5	1.579 5	2.074	3.659 2	100.29		

表3 人参皂苷 Rb₁ 加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.235 8	2.985 2	2.024	4.954 0	97.27	99.06	2.94
0.235 8	2.985 2	2.024	5.059 4	102.47		
0.246 1	3.115 6	2.024	5.166 0	101.31		
0.246 1	3.115 6	2.024	5.171 1	101.56		
0.245 8	3.111 8	2.024	5.235 7	104.93		
0.245 8	3.111 8	2.024	5.223 2	104.31		
0.265 4	3.359 9	3.036	6.290 2	96.51		
0.265 4	3.359 9	3.036	6.346 3	98.36		
0.259 8	3.289 0	3.036	6.333 1	100.26		
0.259 8	3.289 0	3.036	6.339 1	100.46		
0.264 5	3.348 6	3.036	6.354 8	99.02		
0.264 5	3.348 6	3.036	6.238 0	95.17		
0.260 4	3.296 6	4.048	7.189 3	96.16		
0.260 4	3.296 6	4.048	7.176 1	95.83		
0.262 8	3.327 0	4.048	7.239 0	96.63		
0.262 8	3.327 0	4.048	7.278 9	97.62		
0.261 5	3.310 5	4.048	7.253 4	97.40		
0.261 5	3.310 5	4.048	7.270 8	97.83		

表4 样品含量测定结果(mg/粒)

批号	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	总皂苷
20090901	1.646 4	3.074 4	6.397 7	11.118 5
20090902	1.696 1	2.946 4	6.343 8	10.986 3
20090903	1.668 8	2.951 0	6.415 8	11.035 6

3 讨论

本试验考察了样品的不同的提取方法,分别采用超声提取

法、直接回流提取法、索氏提取法对样品进行提取。结果表明,采用索氏提取的方法对样品进行 3 h 提取,样品提取率最高。

2005 年版《中华人民共和国药典》人参的含量测定以氯仿作为脱脂溶剂,但由于氯仿毒性较大,所以,我们选择与氯仿极性接近的二氯甲烷、乙醚进行脱脂溶剂的考察,结果发现,乙醚不能完全将人参皂苷提取出来,而氯仿和二氯甲烷在提取时没有明显差别,考虑到毒性,所以,确定二氯甲烷作为脱脂溶剂。

在人参皂苷提取方法上,本研究采用常用的二氯甲烷脱酯后正丁醇萃取方法相结合,由于正丁醇与水的极性相似,易发生乳化现象,在试验中采用静置片刻、必要时微热来解决乳化问题。

在人参皂苷测定中,多有文献报道采用纯化总皂苷的方法来测定人参总皂苷的含量,本试验采用 HPLC 分离人参皂苷,尤其对比较难分离的人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 也实现了很好的分离,表明本试验所建立的分析方法分离效果好,而且简便、重复性好,可有效用于人参补气胶囊制剂的质量控制。

检测3批样品中人参皂苷(Rg₁+Re)平均含量分别为4.7208、4.642 5、4.619 8 mg/粒;人参皂苷 Rb₁ 6.397 7、6.343 8、6.415 8 mg/粒。人参皂苷(Rg₁+Re)平均为 4.661 1 mg/粒,其转移率为 93.73%;人参皂苷 Rb₁ 平均为 6.385 8 mg/粒,其转移率为 76.32%。根据平均含量,并考虑原药材来源不同导致的含量浮动等因素,确立成品含量限度确定为:本品每粒胶囊含人参皂苷 Rg₁+Re、人参皂苷 Rb₁ 计,不得少于 3.7、4.5 mg。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部.WS3-B-3741-98 卫生部药品标准:中药成方制剂(第二十册)[S].北京:人民卫生出版社,1998:Z20-6.

[2] 顾茂瑜.人參中抗肿瘤作用的有效成分——人參皂苷[J].国外医药:植物药分册,1981,2(4):17.

[3] 宿延丽,宿艳霞,宿武林.人參有效成分及其复方研究进展[J].人參研究,2008,20(2):7-11.

[4] 冯中,李晓燕,刘波,等.HPLC 测定不同厂家复方丹参片中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁ 含量[J].中成药,2009,31(1):71-74.

[5] 胡海波,史道芬,潘文,等.HPLC 测定颐和春口服液中人參皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的含量[J].南京医科大学学报:自然科学版,2009,29(2):200-204.

[6] 黎玉翠,陈志维,暴梅佳,等.HPLC 法测定灵芝降糖胶囊中人參皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 及三七皂苷 R₁ 的含量[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(7):9-11.

[7] 周兰.HPLC 法测定人參须中人參皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 及人参皂苷 Rb₁ 的含量[J].中国民族民间医药,2009,18(3):1-2.

[8] 代龙.HPLC 法测定血塞通分散片中三七皂苷 R₁ 及人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 的含量[J].齐鲁药事,2009,28(6):333-335.

[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:化学工业出版社,2005:7-8.

(收稿日期:2012-07-03,编辑:陈静)