

HPLC 测定田七痛经胶囊中人参皂苷 Rg_1 、 Rb_1 及三七皂苷 R_1 含量

陈亮, 钱一帆

南京中科药业有限公司, 江苏 南京 210008

摘要:目的 建立田七痛经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), 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为水, 梯度洗脱(0~20 min, 19%→21%A; 20~50 min, 21%A→36%A), 检测波长 203 nm, 流速 1.0 mg/mL, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 测定田七痛经胶囊中人参皂苷 Rg_1 、 Rb_1 和三七皂苷 R_1 的含量。结果 人参皂苷 Rg_1 、 Rb_1 和三七皂苷 R_1 的线性范围分别为 0.442 4~3.981 6 μ g ($r^2=1.000$ 0)、0.524 8~3.673 6 μ g ($r^2=0.999$ 4) 和 0.203 2~1.016 μ g ($r^2=0.999$ 2), 平均回收率分别为 99.49%(RSD=2.44%)、99.02%(RSD=2.45%) 和 99.98%(RSD=2.14%)。结论 本研究所建立的方法分离效果好、简便、快捷, 重复性好, 可有效控制田七痛经胶囊的质量。

关键词: 田七痛经胶囊; 高效液相色谱法; 人参皂苷 Rg_1 ; 人参皂苷 Rb_1 ; 三七皂苷 R_1

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2015.10.022

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2015)10-0077-04

Content Determination of Ginsenoside Rg_1 , Ginsenoside Rb_1 and Notoginsenoside R_1 in Tianqi Tongjing Capsule by HPLC CHEN Liang, QIAN Yi-fan (Nanjing Zhongke Pharmaceutical Co., Ltd, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for content determination of Ginsenoside Rg_1 , Ginsenoside Rb_1 and Notoginsenoside R_1 in Tianqi Tongjing 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 (0-20 min, 19%→21%A; 20-50min, 21%→36%A) at a flow rate of 1.0 mg/mL; the wavelength of detector was 203 nm; the temperature of the column was 25 $^{\circ}$ C. **Results** The calibration curves of Ginsenoside Rg_1 , Ginsenoside Rb_1 and Notoginsenoside R_1 showed good linearity within the range of 0.442 4-3.981 6 μ g ($r^2=1.000$ 0), 0.524 8-3.673 6 μ g ($r^2=0.999$ 4) and 0.203 2-1.016 μ g ($r^2=0.999$ 2), respectively. The average recoveries ($n=9$) were 99.49%, 99.02% and 99.98%, and RSD were 2.44%, 2.45% and 2.14%, respectively. **Conclusion** The method is simple, reliable, rapid and with good repeatability, and can effectively control the quality of Tianqi Tongjing Capsule.

Key words: Tianqi Tongjing Capsule; HPLC; Ginsenoside Rg_1 ; Ginsenoside Rb_1 ; Notoginsenoside R_1

田七痛经胶囊由三七、五灵脂、蒲黄、延胡索、川芎、木香、小茴香、冰片 8 味中药组成, 具有调通气血、止痛调经功效, 临床多用于经期腹痛及因寒所致的月经失调, 其标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》^[1]。该标准包括 1 项显微鉴别、2 项理化鉴别及 1 项气相色谱鉴别, 无含量测定项, 未能对本品起到有效的质量控制作用。为了提

高本品的质量控制标准, 保证其药效, 需要对制剂中的有效成分进行含量测定。目前, 关于测定田七痛经胶囊剂或散剂中人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Rb_1 及三七皂苷 R_1 的含量研究已有报道^[2-6], 但尚需进一步研究, 我们参考上述文献及 2010 年版《中华人民共和国药典》三七含量测定项下方法^[7], 选取人参皂苷 Rg_1 、 Rb_1 和三七皂苷 R_1 为含量测定的指标成分, 采用高效液相色谱法(HPLC)建立田七痛经胶囊有效成分的含量测定方法, 以保证该制剂的质量及临床疗效。

1 仪器与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪(包括 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。

田七痛经胶囊 3 批(批号 20100601、20100602、20100603),南京中科药业有限公司;对照品人参皂苷 R_{g_1} (批号 110703-200726)、人参皂苷 R_{b_1} (批号 110704-200921)、三七皂苷 R_1 (批号 110745-200617),中国食品药品检定研究院;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 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_1} 11.06 mg、 R_{b_1} 13.12 mg 和三七皂苷 R_1 10.16 mg,分别置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品贮备液,浓度分别为人参皂苷 R_{g_1} 1.106 mg/mL、人参皂苷 R_{b_1} 1.312 mg/mL、三七皂苷 R_1 1.016 mg/mL。

2.2 供试品溶液的制备

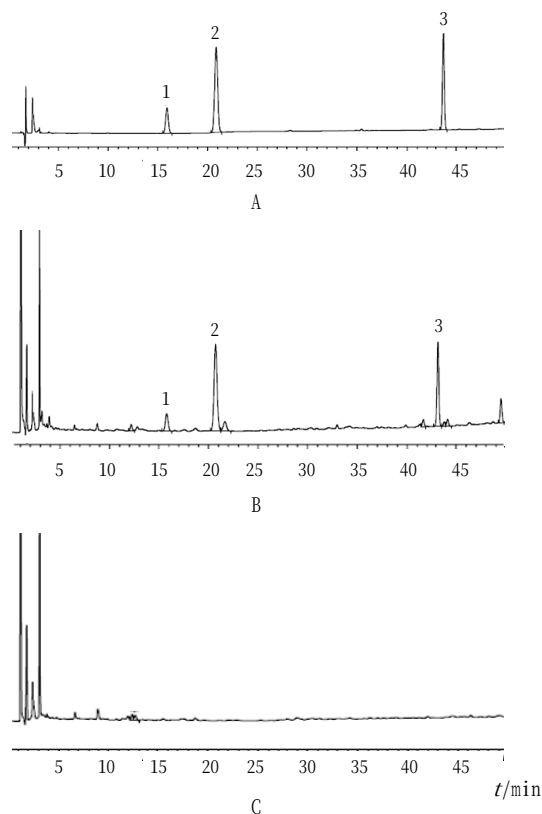
取田七痛经胶囊(批号 20100601)内容物粉末约 2.0 g,精密称定,置索氏提取器中,加石油醚(60~90 °C)适量,提取至近无色,弃去石油醚,药渣挥干,倾入具塞锥形瓶中,滤纸筒一并移入,加水饱和的正丁醇 50 mL,超声提取(功率 200 W,频率 40 kHz)40 min,取出,放至室温,摇匀,过滤,精密量取续滤液 25 mL,置分液漏斗中,用氨试液 15 mL 洗涤 1 次,弃去氨试液,再用正丁醇饱和的水 15 mL 洗涤 1 次,静置分层,分取正丁醇层,置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL,加 20%甲醇-水稀释至 5 mL,摇匀,过滤,即得。

2.3 阴性对照溶液的制备

取缺三七的供试品粉末,按“2.2”项下方法制备,即得。

2.4 色谱条件

色谱柱:安捷伦 ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:流动相 A 为乙腈,流动相 B 为水,梯度洗脱(0~20 min,乙腈 19%→21%,20~50 min,乙腈 21%→36%);柱温:25 °C;检测波长:203 nm;流速:1.0 mg/mL;进样量 20 μL;理论塔板数按人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 峰计应分别不低于 3000。对照品、供试品、阴性对照色谱图见图 1。



注:A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;

1.三七皂苷 R_1 ; 2.人参皂苷 R_{g_1} ; 3.人参皂苷 R_{b_1}

图1 田七痛经胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 HPLC 图

2.5 线性关系考察

精密吸取人参皂苷 R_{g_1} 对照品贮备液(1.106 mg/mL) 0.20、0.60、1.00、1.40、1.80 mL,人参皂苷 R_{b_1} 对照品贮备液(1.312 mg/mL) 0.20、0.50、0.80、1.10、1.40 mL,三七皂苷 R_1 对照品贮备液(1.016 mg/mL) 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL,分别置入 10 mL 量瓶中,加 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,注入色谱仪测定。以峰面积值为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线,经线性回归计算,得线性回归方程分别为:人参皂苷 R_{g_1} $Y=5.8647X+2.3827$, $r^2=1.0000$;人参皂苷 R_{b_1} $Y=4.1990X-6.9063$, $r^2=0.9994$;三七皂苷 R_1 $Y=5.6043X+3.0025$, $r^2=0.9992$ 。结果表明,人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 分别在 0.4424~3.9816 μg、0.5248~3.6736 μg 和 0.2032~1.016 μg 范围内呈良好线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液(人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 含量分别为 110.60、104.96、30.48 μg/mL)

20 μL,连续进样 6 次,计算平均峰面积值,结果人参皂苷 R_{g1}、R_{b1}和三七皂苷 R₁峰面积的 RSD 分别为 0.51%、0.51%、0.58%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取田七痛经胶囊(批号 20100601)粉末约 2.0 g,共 6 份,精密称定,按“2.2”项下方法制备,每份连续进样 2 次,每次 20 μL,测定峰面积并计算含量。其 RSD 分别为人参皂苷 R_{g1} 1.71%、人参皂苷 R_{b1} 1.99%、三七皂苷 R₁ 2.64%,表明本方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取“2.7”项下样品溶液,分别于 0、4、8、10、12 h 进样测定,每次 20 μL,共 5 次。其 RSD 分别为人参皂苷 R_{g1} 2.28%、人参皂苷 R_{b1} 1.84%、三七皂苷 R₁ 2.15%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

精密称定已知人参皂苷 R_{g1}、R_{b1}和三七皂苷 R₁含量的样品(批号 20100601)约 1.0 g,添加已知含量 80%、100%、120%的对照品。按“2.2”项下方法制备,并按“2.4”项下色谱条件进样测定。其回收率分别为 99.49%、99.02%、99.98%,RSD 分别为 2.44%、2.45%、2.14%,结果见表 1~表 3,表明本法具有良好的加样回收率。

表 1 人参皂苷 R_{g1}加样回收率试验

取样量	样品中	加入量	测得量	回收率	平均回收	RSD
(g)	含量(mg)	(mg)	(mg)	(%)	率(%)	(%)
0.949 72	5.00	3.54	8.56	100.67		
0.949 72	5.00	3.54	8.51	99.11		
0.959 82	5.05	3.54	8.74	104.32		
0.959 82	5.05	3.54	8.49	97.26		
0.995 02	5.24	3.54	8.62	95.68		
0.995 02	5.24	3.54	8.81	100.84		
1.045 06	5.50	4.72	10.34	102.61		
1.045 06	5.50	4.72	10.27	101.13		
1.079 62	5.68	4.72	10.22	96.09	99.49	2.44
1.079 62	5.68	4.72	10.31	98.06		
1.048 08	5.52	4.72	10.06	96.24		
1.048 08	5.52	4.72	10.40	103.47		
1.069 54	5.63	6.37	11.89	98.36		
1.069 54	5.63	6.37	11.97	99.60		
1.089 77	5.74	6.37	12.05	99.15		
1.089 77	5.74	6.37	12.02	98.74		
1.099 98	5.79	6.37	12.13	99.61		
1.099 98	5.79	6.37	12.15	99.90		

表 2 人参皂苷 R_{b1}加样回收率试验

取样量	样品中	加入量	测得量	回收率	平均回收	RSD
(g)	含量(mg)	(mg)	(mg)	(%)	率(%)	(%)
0.949 72	4.21	3.00	7.27	101.88		
0.949 72	4.21	3.00	7.13	97.54		
0.959 82	4.25	3.00	7.40	104.85		
0.959 82	4.25	3.00	7.15	96.50		
0.995 02	4.41	3.00	7.27	95.39		
0.995 02	4.41	3.00	7.42	100.42		
1.045 06	4.63	4.50	9.18	101.10		
1.045 06	4.63	4.50	9.23	102.14		
1.079 62	4.78	4.50	9.15	96.91	99.02	2.45
1.079 62	4.78	4.50	9.27	99.75		
1.048 08	4.64	4.50	8.96	95.98		
1.048 08	4.64	4.50	9.18	100.82		
1.069 54	4.74	6.00	10.63	98.18		
1.069 54	4.74	6.00	10.75	100.19		
1.089 77	4.83	6.00	10.71	97.99		
1.089 77	4.83	6.00	10.69	97.61		
1.099 98	4.87	6.00	10.80	98.81		
1.099 98	4.87	6.00	10.83	99.31		

表 3 三七皂苷 R₁加样回收率试验

取样量	样品中	加入量	测得量	回收率	平均回收	RSD
(g)	含量(mg)	(mg)	(mg)	(%)	率(%)	(%)
0.949 72	0.95	0.74	1.68	98.67		
0.949 72	0.95	0.74	1.66	96.07		
0.959 82	0.96	0.74	1.69	99.60		
0.959 82	0.96	0.74	1.67	96.11		
0.995 02	1.00	0.74	1.72	98.31		
0.995 02	1.00	0.74	1.75	103.11		
1.045 06	1.05	1.16	2.19	99.35		
1.045 06	1.05	1.16	2.24	103.24		
1.079 62	1.07	1.16	2.23	99.17	99.98	2.14
1.079 62	1.07	1.16	2.26	102.27		
1.048 08	1.05	1.16	2.19	98.87		
1.048 08	1.05	1.16	2.24	103.08		
1.069 54	1.07	1.58	2.63	99.16		
1.069 54	1.07	1.58	2.67	101.48		
1.089 77	1.09	1.58	2.68	100.72		
1.089 77	1.09	1.58	2.65	99.03		
1.099 98	1.10	1.58	2.68	100.23		
1.099 98	1.10	1.58	2.70	101.26		

2.10 样品含量测定

取不同批号(20100601、20100602、20100603)田七痛经胶囊粉末约 2.0 g,精密称定,按“2.2”项下方法依法制备,按“2.4”项下色谱条件测定,每批平行测定 2 份,结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果(mg/粒)

批号	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_{b_1}	三七皂苷 R_1	总皂苷
20100601	2.15	1.85	0.40	4.40
20100602	2.16	1.79	0.40	4.35
20100603	2.16	1.81	0.41	4.37

3 讨论

本试验考察了样品的不同提取方法,分别采用甲醇水浴提取法、索氏提取法及甲醇超声提取法对样品进行提取。结果表明,采用索氏提取法阴性对照无干扰,且杂质峰较少。索氏提取中用乙醚作为脱脂溶剂,但由于乙醚属于易制毒类化学品,所以,我们选择与乙醚极性接近的石油醚为脱脂溶剂,结果表明,石油醚脱脂效果与乙醚相当,可以代替乙醚。在萃取除杂预试验中,开始对提取的样品溶液用氨试液和正丁醇饱和的水依次各萃取 2 次,发现在 2 次萃取后人参皂苷及三七皂苷含量损失严重,故萃取次数改为各 1 次,结果既可减少含量损失,又能达到分离效果;萃取时由于正丁醇与水的极性相似,易发生乳化现象,故采用静置片刻,必要时需要微热来解决乳化问题。

目前多数报道均以测定单一成分或某 2 种成分为主^[8-9],同时测定 3 种皂苷类成分者较少,主要由于同时测定 3 种皂苷难度较大,分离度很难符合要求;此外,文献中均未提及色谱柱温度^[4]。对于同时测定人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 的含量,色谱柱温度要在 25 °C 以下,分离效果较好,这点尤为重要。

样品测定结果表明,3 批样品平均总含量分别为

10.90、10.72、10.82 mg/g,其转移率为 95.55%,平均每粒胶囊的含量为 4.32 mg。根据平均含量,并考虑大生产药材来源及其他因素的变化,由于本品工艺为药材粉碎入药,并无提取步骤,故按照本研究的转移率及 2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)三七项下含量限度要求,含人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 总量不得少于 5.0%,因此将样品含量进行折算,得每粒胶囊以 2.87 mg 作为含量限度。故成品含量限度确定为:本品每粒胶囊含人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 总量计,不得少于 2.87 mg。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂 第十册[M].1995:38.
- [2] 冯毅凡,孟青,梁汉明.田七痛经胶囊质量标准研究[J].中成药,2010,27(10):1146-1149.
- [3] 李长新,史红波,吕晓霞,等.HPLC-ELSD 法测定田七痛经胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 含量[J].中医药学报,2009,37(1):44-45.
- [4] 赵德华,杨德智.HPLC 测定田七痛经胶囊中人参皂苷 R_{b_1} 、 R_{g_1} 的含量[J].中成药,2010,27(5):532-534.
- [5] 刘莉兰,毕灿华,刘敏珊.HPLC 测定田七痛经胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 的含量[J].中成药,2010,27(4):481-483.
- [6] 李怀斌,刘茵.薄层扫描法测定田七痛经胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 的含量[J].陕西中医学院学报 2009,32(3):63-64.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2010:10-11.
- [8] 来国防,杨冬,杜江,等.HPLC 法测定田七痛经散中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 的含量[J].中国药师,2010,13(1):28-29.
- [9] 周芳芳,孟庆红.HPLC 法测定田七痛经胶囊中人参皂苷 R_{g_1} 的含量[J].航空航天医学杂志,2011,22(1):120-121.

(收稿日期:2014-11-13)

(修回日期:2015-03-25;编辑:陈静)