

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.10.008

高效液相色谱法同时测定肿痛安胶囊中3种皂苷类成分含量

姜燕,戴丽娜

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心,江苏 连云港 222006)

摘要:目的 建立测定肿痛安胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 $^{\circ}$ C,检测波长 203 nm,进样量为 10 μ L。结果 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 质量浓度线性范围分别为 15.25~487.80 μ g/mL, 11.57~370.30 μ g/mL, 11.44~366.20 μ g/mL, $r > 0.9994$ ($n=5$),精密度、重复性和稳定性试验结果的 RSD 均小于 3%,加样回收率为 99.28%~100.22%, RSD 为 0.98%~1.49% ($n=6$)。结论 该方法简便、快速、准确、可靠,专属性较强,可用于肿痛安胶囊的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 肿痛安胶囊; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_{g1} ; 人参皂苷 R_{b1} ; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)10-0023-03

Simultaneous Determination of Three Kinds of Saponins in Zhongtong'an Capsules by HPLC

JIANG Yan, DAI Lina

(Lianyungang Food and Drug Inspection Center, Lianyungang, Jiangsu, China 222006)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g1} , ginsenoside R_{b1} in Zhongtong'an Capsules. **Methods** The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column(150mm×4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was acetonitrile-water (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, the detection wavelength was 203 nm and the sample size was 10 μ L. **Results** The notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g1} , ginsenoside R_{b1} showed good linearity in the ranges of 15.25~487.80 μ g/mL, 11.57~370.30 μ g/mL, 11.44~366.20 μ g/mL, $r > 0.9994$ ($n=5$). The RSDs of the precision, repeatability and stability tests were less than 3%, the average recovery rates were in the range of 99.28%~100.22%, RSDs were in the range of 0.98%~1.49% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reliable, and has strong specificity. It can be used for the quality control of Zhongtong'an Capsules.

Key words: HPLC; Zhongtong'an Capsules; notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_{g1} ; ginsenoside R_{b1} ; content determination

肿痛安胶囊由三七、天麻、僵蚕、白附子(制)、防风、羌活、天南星(制)、白芷 8 味中药组方,有祛风化痰、行瘀散结、消肿定痛功效,临床用于治疗风痰瘀阻引起的牙痛、咽喉肿痛、口腔溃疡、痹病(症见关节肿胀疼痛、筋脉拘挛、屈伸不利),以及破伤风的辅助治疗。现行质量标准仅有对三七中人参皂苷 R_{g1} 的含量测定,而无其他有效成分的定量分析^[1]。中药复方制剂成分复杂,成分间相互干扰明显。为进一步控制肿痛安胶囊的质量,本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定制剂中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);BP211D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);超纯水仪(美国 Milli-Q 公司);KQ-500TDB 型高频数控超声波清洗器(上海星尧科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

三七皂苷 R_1 对照品、人参皂苷 R_{g1} 对照品、人参皂苷 R_{b1} 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110745-201820, 110703-201832, 110704-201726, 纯度分别为 93.1%, 92.4%, 91.1%);肿痛安胶囊(河北奥星集团药业有限公司,批号分别为 161044, 161103, 161121);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

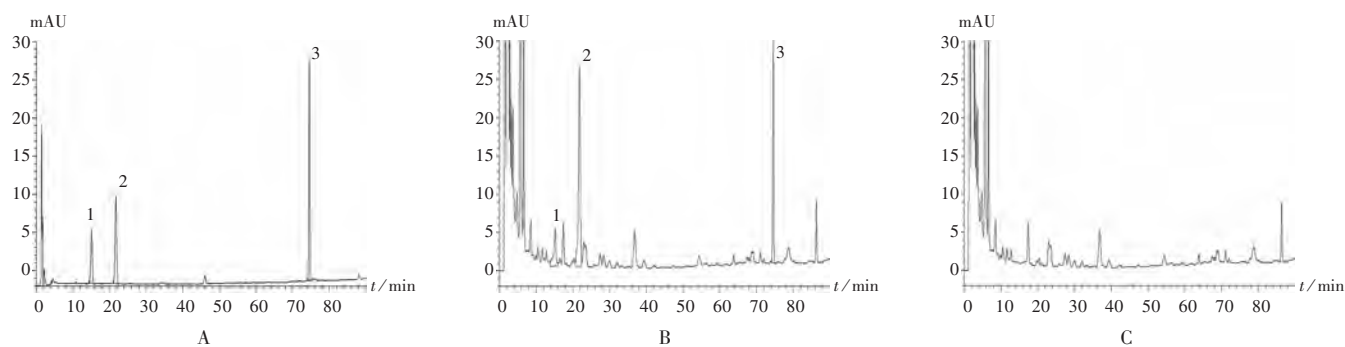
2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:以乙腈为流动相 A,水为流动相 B,按表 1 程序梯度洗脱;流速:1.0 mL/min;柱

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

t (min)	A	B	t (min)	A	B
12.00	81.0	19.0	90.50	81.0	19.0
40.00	78.5	21.5	105.00	81.0	19.0
90.00	66.0	34.0			



1. 三七皂苷 R_1 2. 人参皂苷 R_{g1} 3. 人参皂苷 R_{b1}
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

温: 30 ℃; 检测波长: 203 nm; 进样量: 10 μL ^[2-5]。

2.2 溶液制备

取三七皂苷 R_1 对照品 26.20 mg, 人参皂苷 R_{g1} 对照品 20.04 mg, 人参皂苷 R_{b1} 对照品 20.10 mg, 精密称定, 置同一 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制成混合对照品溶液, 备用。取本品 9 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声(功率 250 W, 频率 50 kHz)处理 40 min, 放冷, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。按肿痛安胶囊的处方比例和生产工艺制备三七药材的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验: 分别精密量取混合对照品溶液与供试品溶液各 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 按拟订色谱条件进样测定(见图1), 结果3种成分与相邻色谱峰的分度度均不低于 1.5。

专属性试验: 取混合对照品溶液和阴性对照品溶液各适量, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱图(见图1)。结果表明, 阴性对照无干扰。

线性关系考察: 分别精密移取混合对照品适量, 用甲醇稀释, 配制成三七皂苷 R_1 质量浓度分别为 487.80, 243.90, 122.00, 60.98, 15.25 $\mu\text{g/mL}$, 人参皂苷 R_{g1} 质量浓度为 370.30, 185.20, 92.58, 46.29, 11.57 $\mu\text{g/mL}$, 人参皂苷 R_{b1} 质量浓度为 366.20, 183.10, 91.56, 45.78, 11.44 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合对照品溶液; 进样测定, 以峰面积比值(Y)为纵坐标、待测成分质量浓度(X)为横坐标进行线性回归, 回归方程及线性范围见表2。

表2 回归方程和线性范围($n=5$)

待测成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
三七皂苷 R_1	$Y=2.1655X+2.5122$	0.9997	15.25~487.80
人参皂苷 R_{g1}	$Y=4.6115X+0.3095$	0.9999	11.57~370.30
人参皂苷 R_{b1}	$Y=2.383X-6.4866$	0.9995	11.44~366.20

精密密度试验: 精密量取混合对照品溶液适量, 制成三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 质量浓度分别为 97.59, 74.07, 219.73 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 峰面积积分值的 RSD 分别为 0.92%, 0.88%, 0.86% ($n=6$), 表明仪器精密密度良好。

稳定性试验: 室温下取供试品(批号为 161044)溶液, 24 h 内每隔 2 h 进样考察。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 峰面积积分值的 RSD 分别为 1.88%, 2.16%, 1.92% ($n=13$), 表明室温下供试品溶液放置 24 h 内稳定。

重复性试验: 取样品(批号为 161044)6 份, 依法制备供试品溶液, 进样测定。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 平均含量分别为 276.9, 530.6, 617.4 $\mu\text{g/g}$, RSD 分别为 1.76%, 1.96%, 2.08% ($n=6$), 表明本方法重复性好。

加样回收试验: 取样品(批号为 161044)约 4.5 g, 精密称定, 共 6 份, 分别精密加入各对照品溶液适量, 依法制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率。结果见表3。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样, 测定含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 检测波长选择

三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 均为皂苷类, 理化性质相似, 也有相似的色谱行为。2015 年版《中国药典(一部)》三七中这

本栏目由
重庆赢英康医疗器械有限公司
协办

表3 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(μg)			加入量(μg)			测得量(μg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1 263	2 421	2 816	1 220	2 407	2 747	2 466	4 800	5 507	98.61	98.84	97.96	99.28	100.22	99.66	0.98	1.13	1.94
1 247	2 389	2 778	1 220	2 407	2 747	2 443	4 806	5 538	98.03	100.42	100.47						
1 255	2 404	2 796	1 220	2 407	2 747	2 471	4 799	5 486	99.67	99.50	97.93						
1 251	2 397	2 788	1 220	2 407	2 747	2 476	4 821	5 620	100.41	100.71	103.09						
1 254	2 402	2 795	1 220	2 407	2 747	2 458	4 803	5 517	98.69	99.75	99.09						
1 261	2 416	2 810	1 220	2 407	2 747	2 484	4 873	5 541	100.25	102.08	99.42						

注:A为三七皂苷 R_1 , B为人参皂苷 R_{g1} , C为人参皂苷 R_{b1} 。

表4 样品含量测定结果($n=6$)

成分	批号 161044		批号 161103		批号 161121	
	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)	含量($\mu\text{g/g}$)	RSD(%)
三七皂苷 R_1	276.9	0.8	277.2	0.9	276.6	0.8
人参皂苷 R_{g1}	530.6	0.8	530.2	0.6	530.9	0.7
人参皂苷 R_{b1}	617.4	1.1	617.0	0.8	618.1	1.0

3种成分的检测波长均为203 nm^[2,6-10]。本试验中,在200~400 nm波长范围内对3种对照品进行扫描,结果3种对照品均有较好吸收,故最终确定检测波长为203 nm。

3.2 流动相选择

本试验中对甲醇-水、甲醇-0.2%磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.2%磷酸溶液4种流动相系统^[11-15]进行了考察,结果显示,人参皂苷 R_{b1} 色谱峰保留时间较长,为缩短检测时间,故采用梯度洗脱。比较发现,以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱时,各色谱峰分离度达到要求,基线平稳,各成分分离较好且峰形明显,故被选择。

3.3 提取溶剂和提取方法选择

分别以甲醇、50%甲醇作为提取溶剂,采用超声(15,40,60 min)、加热回流(15,40,60 min)提取,结果显示,以甲醇作为提取溶剂、超声40 min的提取方法最简便,提取完全,且待测成分峰峰形较好。

综上所述,采用本研究中建立的HPLC法可同时测定肿痛安胶囊中3种皂苷成分的含量,该方法简便快速,重复性好,专属性强,可用于肿痛安胶囊的质量控制。

参考文献:

[1] WS₃-B-3872-98-2005,国家食品药品监督管理局药品标准[S].
[2] 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,2015:11-12.
[3] 杨辉,劳广耀,唐德智. HPLC法测定复方黄根颗粒中人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 [J]. 中国药师,2015,18(1):55-57.
[4] 陈洪岩,姚晨旭,张小龙. 高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱法测定启脾丸中7种人参皂苷的含量[J]. 中国药师,2017,20(3):460-462.

[5] 郭小红,冷静,徐冲,等. 柔肝宝颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2018,27(3):7-11.
[6] 张凯,尹子郡,张跃进,等. HPLC法测定复方乌骨藤胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的含量[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):250-253.
[7] 顾武军,陈宗良,吴海霞. HPLC法测定肿痛安胶囊中欧前胡素的含量[J]. 中国药师,2012,15(10):1511-1513.
[8] 李伟,张文生,魏峰. RP-HPLC法测定复方丹参滴丸中三七皂苷 R_1 的含量[J]. 药物分析杂志,2004,24(6):642-643.
[9] 崔翰明,张春光,林海,等. HPLC法测定三七不同药用部位中有效成分含量[J]. 中药材,2009,32(12):1810-1813.
[10] 武国顺,丁艳芬,杨冬,等. HPLC测定调经养颜胶囊中人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 、三七皂苷 R_1 的含量[J]. 中成药,2006,28(12):1734-1736.
[11] 耿燕娜,张文鑫. 一测多评法同时测定复方丹参片中人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(1):69-72.
[12] 林苏娜,余楚钦,林华庆,等. UPLC测定参麦注射液中人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(8):48-50.
[13] 姚荣成,董媛,张雯洁. HPLC法同时测定参七心疏胶囊中3种成分的含量[J]. 中国药房,2016,27(15):2141-2144.
[14] 刁保忠,冯家龙,赵文法. 高效液相色谱法测定芪麦苓口服液中原儿茶醛含量[J]. 中国药业,2016,25(15):74-76.
[15] 张治军,钟名诚,黄秋华. HPLC法测定含三七类保健食品中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 含量[J]. 海峡药学,2016,28(12):48-50.

(收稿日期:2018-08-28)