

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.12.011

高效液相色谱法测定心可宁胶囊中4种皂苷含量

赵袁丰¹, 龚竹青¹, 赵义雄^{2△}, 吴杰²

(1. 贵州省黔东南苗族侗族自治州人民医院, 贵州 黔东南 556000; 2. 贵州飞云岭药业股份有限公司, 贵州 黔东南 556000)

摘要:目的 建立测定心可宁胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 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, 检测波长为 203 nm, 进样量为 20 μ L。结果 4 种皂苷成分的质量浓度分别在 0.020 8~0.104 0 g/L($r=0.999\ 9$), 0.201 2~1.006 0 g/L($r=0.999\ 8$), 0.180 2~0.901 0 g/L($r=0.999\ 9$), 0.050 4~0.252 0 g/L($r=0.999\ 9$) 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 99.57%, 100.46%, 100.12%, 100.61%, RSD 分别为 1.52%, 1.51%, 1.33%, 1.37% ($n=9$)。结论 该方法简便, 结果可靠, 可用于测定心可宁胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 心可宁胶囊; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 Rb_1 ; 人参皂苷 Rg_1 ; 人参皂苷 Re ; 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)12-0037-03

Content Determination of Four Triterpene Saponins in Xinkening Capsules by HPLC

ZHAO Yuanfeng¹, GONG Zhuqing¹, ZHAO Yixiong², WU Jie²

(1. Qiongdongnan People's Hospital, Qiongdongnan, Guizhou, China 556000; 2. Guizhou Feiyunling Pharmaceutical Co., Ltd., Qiongdongnan, Guizhou, China 556000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determine of notoginsenoside R_1 , ginsenoside Rb_1 , ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Re in Xinkening Capsules. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil C_{18} column(250 mm $\times$ 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 20 μ L. **Results** Notoginsenoside R_1 , ginsenoside Rb_1 , ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Re showed good linear relationship in the ranges of 0.020 8~0.104 0 g/L($r=0.999\ 9$), 0.201 2~1.006 0 g/L($r=0.999\ 8$), 0.180 2~0.901 0 g/L($r=0.999\ 9$), 0.050 4~0.252 0 g/L($r=0.999\ 9$), the average recovery rates were 99.57%, 100.46%, 100.12% and 100.61%, RSD s were 1.52%, 1.51%, 1.33% and 1.37% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple and reliable, which can be used for the content determination of notoginsenoside R_1 , ginsenoside Rb_1 , ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Re in Xinkening Capsules.

Key words: HPLC; Xinkening Capsules; notoginsenoside R_1 ; ginsenoside Rb_1 ; ginsenoside Rg_1 ; ginsenoside Re ; content determination

心可宁胶囊是由丹参、三七、冰片、人参须等 8 味中药材组方, 收载于卫生部药品标准^[1], 具有活血化瘀、开窍止痛功效, 临床主要用于治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)、心绞痛、胸闷等疾病。原质量标准仅对方中成分丹参、牛黄和蟾酥进行了定性鉴别。近年来对心可宁胶囊质量标准报道较多^[2-5], 含量测定的报道多集中于丹参的有效成分丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 等^[6-10]。该药中三七、人参须为贵细药材, 均含皂苷成分, 但有关皂苷含量测定方面的研究较少^[11-12]。为有效地控制心可宁胶囊的质量, 本研究中建立了测定心可宁胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rg_1 及人参皂苷 Re 含量的高效液相色谱法, 现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2030C3D 型高效液相色谱仪(包括二极管阵列检测器、LC-Solution 色谱工作站)、AUW220D 型电子分析天平(日本岛津公司); KQ220B 型超声波清洗器

(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品三七皂苷 R_1 (批号为 110704-201424, 纯度 94.04%), 人参皂苷 Rb_1 (批号为 2014424, 纯度 93.70%), 人参皂苷 Re (批号为 110754-201324, 纯度 92.70%), 人参皂苷 Rg_1 (批号为 110703-201530, 纯度 91.70%), 均购自中国食品药品检定研究院; 心可宁胶囊(贵州飞云岭药业股份有限公司, 批号分别为 160901, 160902, 160903, 160904, 160905, 160906, 规格为每粒 0.4 g); 甲醇及乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

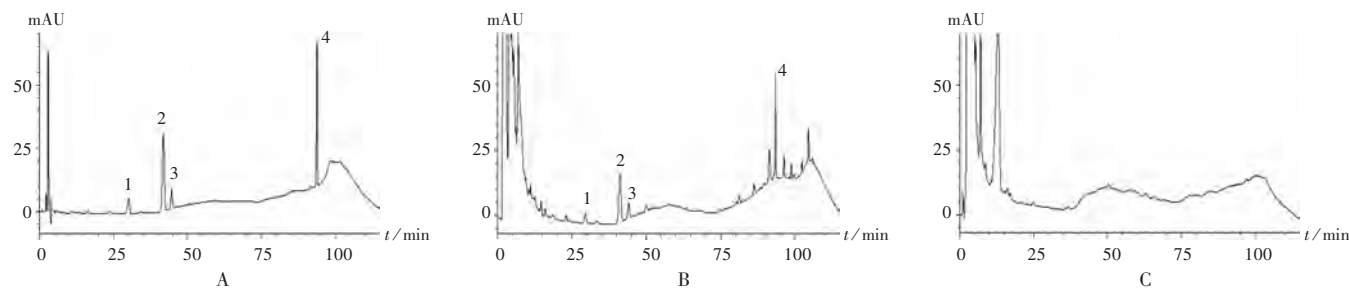
色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(见表 1); 检测波长: 203 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μ L。在此条件下, 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 及人参皂苷 Rb_1 的色谱峰与其他杂质成分的分离

第一作者: 赵袁丰, 男, 侗族, 在读在职硕士研究生, 研究方向为医院药学, (电话)0855-3860556(电子信箱)121073345@qq.com。

△通信作者: 赵义雄, 男, 大学本科, 高级技师, 研究方向为中药质量控制, (电子信箱)479862305@qq.com。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~35	19	81
35~55	19→29	81→71
55~70	29	71
70~100	29→40	71→60



1. 三七皂苷 R₁ 2. 人参皂苷 R_{g1} 3. 人参皂苷 R_e 4. 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

人参皂苷 R_{g1} 0.901 mg、人参皂苷 R_e 0.252 mg 的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品内容物,研细,精密称定,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定质量,超声(功率 250 W,频率 33 kHz)处理 30 min,放冷,再次称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:照现行质量标准中规定的处方工艺^[1],制备不含三七和人参须药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取混合对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL,分别置 5 mL 容量瓶中,加 70% 甲醇稀释至刻度摇匀,得混合对照品系列溶液。按 2.1 项下色谱条件进样分析,以待测成分的进样量(X , mg)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程及线性范围。结果见表 2。

表2 回归方程、相关系数及线性范围($n=5$)

待测成分	回归方程	r	线性范围(g/L)
三七皂苷 R ₁	$Y=5.229 \times 10^6 X - 1.338 \times 10^4$	0.999 9	0.020 8~0.104 0
人参皂苷 R _{b1}	$Y=6.215 \times 10^6 X - 1.414 \times 10^4$	0.999 8	0.201 2~1.006 0
人参皂苷 R _e	$Y=5.543 \times 10^6 X - 3.542 \times 10^4$	0.999 9	0.050 4~0.252 0
人参皂苷 R _{g1}	$Y=5.484 \times 10^6 X - 7.790 \times 10^4$	0.999 9	0.180 2~0.901 0

精密度试验:取 2.2 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次。结果三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_{g1}、三七皂苷 R_e 峰面积的 RSD 分别为 0.56%, 0.87%, 0.68%, 0.72% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:室温下取新制备的同一供试品(批号为 160901)溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 时按 2.1

度大于 1.5,阴性对照品溶液对混合对照品溶液出峰无干扰。色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取各对照品适量,经五氧化二磷减压干燥过夜,取适量,精密称定,用 70% 甲醇制成每 1 mL 含三七皂苷 R₁ 0.104 mg、人参皂苷 R_{b1} 1.006 mg、

项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 均小于 1% ($n=7$),表明室温下供试品溶液放置 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批样品(批号为 160901),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样,测定峰面积。结果三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_e 峰面积的 RSD 分别 1.32%, 1.17%, 0.98%, 1.22% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批已知含量(含三七皂苷 R₁ 1.72 mg/g, 人参皂苷 R_{b1} 6.24 mg/g, 人参皂苷 R_{g1} 7.18 mg/g, 人参皂苷 R_e 1.94 mg/g)的样品 9 份,每份约 0.5 g,精密称定,每 3 份为 1 组,分别加入一定量低、中、高浓度的对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果见表 3。

2.4 样品含量测定

分别取 6 批样品内容物约 1 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,计算样品含量。结果见表 4。

3 讨论

提取方法选择:曾比较了药典中加热回流提取、超声提取等方法的提取效果,考察了不同提取时间及不同体积分数甲醇溶液对样品测定结果的影响。结果表明,选用 70% 甲醇,超声提取(功率 250 W,频率 33 kHz)30 min,可充分提取样品中的皂苷成分,简便,且提取率较高。

色谱条件选择:本研究中采用梯度洗脱法分离皂苷成分,100 min 内完成分离,4 种皂苷成分分离效果良好,符合含量测定要求。本研究中通过二极管阵列检测器考察所测物质紫外吸收度,结果在 203 nm 波长处有

表3 加样回收试验结果($n=9$)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
三七皂苷 R_1	0.503 2	0.865 5	0.412	1.267	97.45	99.57	1.52
	0.501 6	0.862 8	0.412	1.268	98.35		
	0.499 6	0.859 3	0.412	1.272	100.17		
	0.501 2	0.862 1	0.824	1.709	102.78		
	0.499 8	0.859 7	0.824	1.675	98.94		
	0.502 4	0.864 1	0.824	1.681	99.14		
	0.506 8	0.871 7	1.086	1.962	100.40		
	0.508 8	0.875 1	1.086	1.951	99.07		
	0.496 6	0.854 2	1.086	1.938	99.80		
人参皂苷 R_{b1}	0.503 2	3.140 0	1.515	4.632	98.48	100.46	1.51
	0.501 6	3.130 0	1.515	4.642	99.80		
	0.499 6	3.118 0	1.515	4.659	101.72		
	0.501 2	3.127 0	3.030	6.168	100.36		
	0.499 8	3.119 0	3.030	6.219	102.31		
	0.502 4	3.135 0	3.030	6.221	101.85		
	0.506 8	3.162 0	4.545	7.718	100.24		
	0.508 8	3.175 0	4.545	7.628	97.98		
	0.496 6	3.099 0	4.545	7.707	101.39		
人参皂苷 Re	0.503 2	0.976 2	0.504	1.473	98.57	100.61	1.37
	0.501 6	0.973 1	0.504	1.486	101.77		
	0.499 6	0.969 2	0.504	1.471	99.56		
	0.501 2	0.972 3	1.008	1.972	99.18		
	0.499 8	0.969 6	1.008	1.973	99.54		
	0.502 4	0.974 7	1.008	1.996	101.32		
	0.506 8	0.983 2	1.512	2.517	101.44		
	0.508 8	0.987 1	1.512	2.532	102.18		
	0.496 6	0.963 4	1.512	2.504	101.89		
人参皂苷 R_{g1}	0.503 2	3.613 0	1.821	5.431	99.84	100.12	1.33
	0.501 6	3.601 0	1.821	5.446	101.32		
	0.499 6	3.587 0	1.821	5.386	98.79		
	0.501 2	3.599 0	3.642	7.279	101.04		
	0.499 8	3.589 0	3.642	7.201	99.18		
	0.502 4	3.607 0	3.642	7.226	99.37		
	0.506 8	3.639 0	5.463	9.006	98.24		
	0.508 8	3.653 0	5.463	9.185	101.26		
	0.496 6	3.566 0	5.463	9.141	102.05		

表4 样品含量测定结果(mg/粒, $n=6$)

待测成分	批号						$\bar{X}$
	160901	160902	160903	160904	160905	160906	
三七皂苷 R_1	0.688	0.692	0.682	0.698	0.706	0.712	0.696
人参皂苷 R_{b1}	2.872	2.783	2.826	2.797	2.883	2.876	2.840
人参皂苷 Re	0.776	0.764	0.762	0.754	0.726	0.736	0.753
人参皂苷 R_{g1}	2.496	2.522	2.568	2.726	2.732	2.765	2.635
合计	6.832	6.761	6.838	6.975	7.047	7.089	6.924

较大吸收,故选择 203 nm 作为检测波长。流动相比较了乙腈-水(梯度洗脱)和乙腈-0.05%磷酸溶液(20:89, V:V)系统,结果以乙腈-水为流动相梯度洗脱时各色谱峰均实现基线分离,能达到定量要求。

心可宁胶囊在医院临床使用多年,对治疗冠心病、心绞痛、心肌缺血、血栓症、改善心电图缺血效果极佳,比同类中药制剂疗效更突出、作用更持久。对此,该制剂以丹参为君药,以三七、人参须等为佐药,后两者的有效成分主要为皂苷类成分,如三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 Re 等,药理活性明显,其在神经系统有治疗神经退行性疾病、改善记忆功能、保护脑组织等作用,用于心血管系统有抗心律失常、抗心肌肥厚、抗心肌缺血、抗心肌细胞凋亡等作用,在抗肿瘤方面具有诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、调控信号通路、调节免疫功能等作用。故有必要控制该制剂的质量。本研究中用高效液相色谱法对心可宁胶囊中三七的有效成分三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 Re 进行含量测定,方法简便,结果可靠,可为进一步修订心可宁胶囊的质量标准提供试验依据。

参考文献:

- [1] WS₃-B-1714-94,中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第九册)[S].
- [2] 郝素会,李蕊,刘增娟,等.心可宁胶囊质量控制方法研究[J].临床合理用药杂志,2013,6(35):12-13.
- [3] 党锁凤,苟正军.心可宁胶囊质量标准的研究[J].中国实用医药,2010,5(14):168-169.
- [4] 廖婉,傅超美,贾东艳,等.心可宁胶囊质量标准研究[J].成都医学院学报,2008,3(1):31-34.
- [5] 张景佳,黄奕云.心可宁胶囊薄层色谱质量鉴别改进[J].时珍国医国药,2007,18(7):1730-1731.
- [6] 田静,王健,陈莹洁,等.HPLC法同时测定心可宁胶囊中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B的含量[J].中国药品标准,2012,13(4):251-255.
- [7] 陆瑶,李秀明.一测多评法同时测定心可宁胶囊中5种指标性成分的研究[J].中国药师,2018,21(4):743-746.
- [8] 吕娜.基于高效液相色谱法测定心可宁胶囊中丹参素的含量[J].中国现代药物应用,2010,4(7):81.
- [9] 钟萌,韩杰.HPLC测定心可宁胶囊中丹酚酸B的含量[J].中国药师,2009,12(12):1759-1761.
- [10] 骆红梅,童红,何斌.高效液相色谱法测定心可宁胶囊中原儿茶醛含量[J].中国药业,2007,16(15):32-33.
- [11] 叶国增,黄艳,钟鸣.RP-HPLC法测定心可宁胶囊中人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 的含量[J].中国医药导报,2010,7(35):44-45.
- [12] 武小红,王先友,王亚菲.HPLC法测定心可宁胶囊中人参皂苷 R_{g1} 的含量[J].河南大学学报(医学版),2009,28(4):279-280.

(收稿日期:2018-11-12)