

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.037

超高效液相色谱法测定参杞通脉胶囊中人参皂苷 Rg_1 、Re 和 Rb_1 含量

郭社民¹, 马向东¹, 韦灵杰²

(1. 河南省濮阳市食品药品检验检测中心, 河南 濮阳 457000; 2. 河南省濮阳市中医医院, 河南 濮阳 457000)

摘要:目的 建立测定参杞通脉胶囊中人参皂苷 Rg_1 、Re 和 Rb_1 含量的超高效液相色谱(UPLC)法。方法 色谱柱为 Acquity UPLC HSS T₃ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 28 $^{\circ}$ C, 检测波长为 203 nm, 进样量为 5 μ L。结果 人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 进样量分别在 0.075 4~0.603 2 μ g, 0.052 3~0.418 4 μ g, 0.076 0~0.608 4 μ g 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 97.90%, 97.41%, 98.02%, RSD 分别为 1.06%, 1.73%, 0.91% ($n=6$)。结论 该方法操作简单, 分离度高, 回收率高, 可用于参杞通脉胶囊的质量控制。

关键词: 参杞通脉胶囊; 人参皂苷 Rg_1 ; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb_1 ; 超高效液相色谱法; 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(2020)07-0127-03

Determination of Ginsenoside Rg_1 , Re and Rb_1 in Shenqi Tongmai Capsules by UPLC

GUO Shemin¹, MA Xiangdong¹, WEI Lingjie²

(1. Puyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Puyang, Henan, China, 457000; 2. Puyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Puyang, Henan, China, 457000)

Abstract: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography(UPLC) method for the determination of ginsenoside Rg_1 ,

第一作者: 郭社民, 男, 大学本科, 主任技师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)guoshemin2005@sohu.com。

订色谱条件进样测定, 按外标法以峰面积计算各样品中维生素 B₂ 的含量。结果见表 2。

表 2 样品含量及含量均匀度测定结果

批号	标示量(%, $n=3$)	含量均匀度($n=10$)	
		A+2.2S	A+S
20180103	88.11	20.89	15.98
20180709	87.69	28.11	19.49
20180114	99.89	35.22	16.07
20181011	88.02	30.20	20.26
20181108	87.90	31.92	21.11
20181206	89.17	27.64	18.47

含量均匀度测定: 取 6 批样品各 10 片, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加盐酸溶液(1→2)0.2 mL 振摇使溶解, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 按拟订色谱条件进样测定, 按外标法以峰面积计算每片的标示量, 按 2015 年版《中国药典(四部)》(通则 0941)含量均匀度检查法^[7], 计算 A+2.2S 和 A+S。结果见表 2。

3 讨论

在流动相组分考察时, 分别试用水-甲醇、水-乙腈-甲醇、0.5%冰醋酸溶液-甲醇及 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠的 0.5%冰醋酸溶液-乙腈-甲醇流动相系统, 结果表明, 加入离子对试剂庚烷磺酸钠可有效改善主峰的峰形、保留时间; 通过调整各组分的比例, 使流动相呈酸性, 被测组分维生素 B₂ 在测定过程中处于酸性环境中, 性质更稳定。故选用 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠的 0.5%冰醋酸溶液-乙腈-甲醇(80:13:7, V/V/V)为流动相。

维生素 B₂ 性质不稳定, 遇光变质更快, 试验需在避

光条件下进行, 采用棕色容量瓶配制对照品溶液和供试品溶液, 且尽快测定, 尽量缩短放置时间。

6 批样品中, 维生素 B₂ 的含量测定结果中有 5 批低于标示量的 90%; 含量均匀度 A+2.2S 和 A+S 均大于 15.0, 按 2015 年版《中国药典(四部)》(通则 0941)含量均匀度检查法^[7]判断含量结果偏低, 不符合规定。其原因一是由于该产品现行标准中无维生素 B₂ 的含量控制方法, 厂家无法准确测定制剂中间品与成品的含量; 二是维生素 B₂ 对光极不稳定, 在生产过程中, 含量会降低。建议在产品的标准中增加维生素 B₂ 的含量测定及含量均匀度项目, 以更好地进行质量控制。

参考文献:

- [1] 白靖, 向柏, 申磊, 等. HPLC 法同时测定复合维生素口服液中 4 种水溶性维生素的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(29): 2748-2749.
- [2] 刘元欢, 彭建, 梅罗燕, 等. 高效液相色谱法测定五维葡钙口服溶液中维生素 B₁、维生素 B₂ 的含量[J]. 现代医院, 2008, 6(8): 85-86.
- [3] 陈桂红, 黄清松. HPLC 法测定多维铁口服溶液中维生素 B₁、维生素 B₂ 的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(10): 776-777.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1232-1234.
- [5] 谢子立, 阙家义, 吴小英, 等. HPLC 法测定维生素 B₂ 注射液的含量及有关物质[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(4): 694-697.
- [6] 刘羽, 刘燕, 王贺, 等. HPLC 法测定复方维生素注射液(4)中 4 种成分的含量[J]. 安徽医药, 2009, 13(8): 895-897.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 124-125.

(收稿日期: 2019-12-26)

Re 和 Rb₁ 在 Shenqi Tongmai Capsules. **Methods** The chromatographic column was ACQUITY UPLC HSS T₃ (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); the mobile phase was acetonitrile – water, and gradient elution was performed; the flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 28℃, the detection wavelength was 203 nm, and the injection volume was 5 μL. **Results** The linear relationship of ginsenoside Rg₁ in the range of 0.075 4 – 0.603 2 μg, ginsenoside Re in the range of 0.052 3 – 0.418 4 μg, ginsenoside Rb₁ in the range of 0.076 0 – 0.608 4 μg was good. The average recoveries were 97.90%, 97.41%, 98.02%, RSDs were 1.06%, 1.73% and 0.91%, respectively (n = 6). **Conclusion** The method is simple in operation, high in separation and good in recovery. It is suitable for the quality control of Shenqi Tongmai Capsules.

Key words: Shenqi Tongmai Capsules; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; ultra performance liquid chromatography; content determination

参杞通脉胶囊[豫药制字 Z20120343(濮)]是濮阳市中医医院在临床实践基础上总结研制的纯中药制剂,由人参、黄芪、枸杞子、当归、川芎、丹参、地龙、茯苓、桑白皮、香加皮等中药组方,具有益气养阴、活血利水功效,可用于气虚血瘀所致心悸、胸痹、喘证、水肿、虚劳等症。原质量标准中只有黄芪的薄层鉴别及显微鉴别,为更好地控制产品质量,本研究中参考文献[1-9],建立了对方中主药人参中的人参皂苷 Rg₁、Re 和 Rb₁ 含量测定的超高效液相色谱(UPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity H Class 型超高效液相色谱仪(美国沃特世公司),配 Empower 数据工作站; Sartorius CPA 225D 型分析天平(德国赛多利斯公司,精度为 0.01 mg)。

1.2 试剂

人参皂苷 Rg₁、Re 和 Rb₁ 对照品(批号分别为 110703-201832, 110754-201827, 110704-201827, 纯度分别为 92.4%, 93.4%, 91.2%),均购自中国食品药品检定研究院;参杞通脉胶囊(批号分别为 20180923, 20181015, 20181105, 规格为每粒 0.35 g)及阴性对照品均由濮阳市中医医院制剂室提供;乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司);水为一级水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Acquity UPLC HSS T₃ 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流动相: 乙腈(A) – 水(B), 梯度洗脱(0~6.5 min 时 19% A, 6.5~10.8 min 时 19%~29% A, 10.8~13.8 min 时 29% A, 13.8~20 min 时 29%~40% A);流速: 0.4 mL/min;柱温: 28℃;检测波长:

203 nm;进样量: 5 μL。在此色谱条件下,各待测成分峰形良好,分离度均大于 1.5,理论板数按人参皂苷 Rg₁、Re 和 Rb₁ 峰计均大于 3 000。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 分别取人参皂苷 Rg₁ 对照品 16.32 mg、Re 对照品 11.20 mg 和 Rb₁ 对照品 16.68 mg, 精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取混合对照品贮备液 2 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

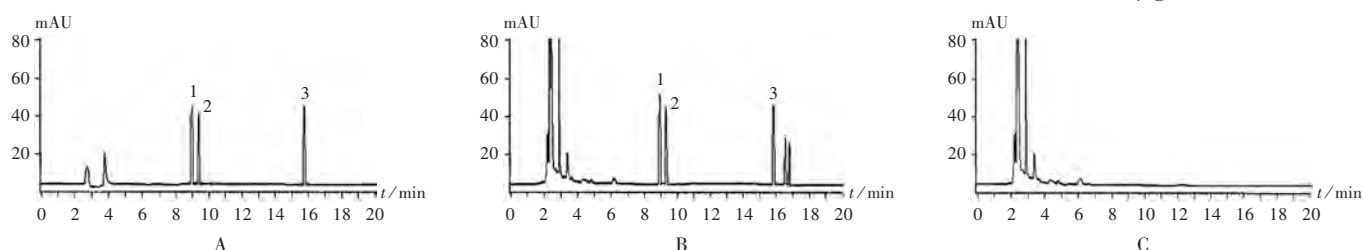
供试品溶液: 取样品内容物,研细,取约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,加入三氯甲烷 – 乙醚(1:1, V/V) 适量,加热回流 2 h,药渣挥干溶剂,连同滤纸筒移入具塞锥形瓶中,加入 80% 甲醇 25 mL,回流提取 2 h,过滤,滤液蒸干,残渣加水 15 mL,溶解,用水饱和的正丁醇 20, 20, 15 mL 萃取 3 次,合并正丁醇萃取液,分别用氨试液、水饱和的正丁醇各 40 mL 洗涤,弃去洗涤液,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

阴性对照品溶液: 取不含人参药材的阴性对照样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别精密吸取 2.2 项下 3 种溶液各 5 μL,注入超高效液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定。结果显示,阴性对照无干扰。详见图 1。

线性关系考察: 分别精密量取混合对照品贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为系列混合对照品溶液。按拟订色谱条件进样测定,以进样量(X, μg)为横坐标、峰面



1. 人参皂苷 Rg₁ 2. 人参皂苷 Re 3. 人参皂苷 Rb₁
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 超高效液相色谱图

表1 加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.501 8	0.501 8	0.501 8	0.308 0	0.179 8	0.315 4	0.301 6	0.209 2	0.304 2	0.605 6	0.381 0	0.612 6	98.67	96.18	97.70						
0.507 1	0.507 1	0.507 1	0.311 2	0.181 7	0.318 8	0.301 6	0.209 2	0.304 2	0.606 8	0.386 9	0.621 0	98.01	98.09	99.34						
0.513 6	0.513 6	0.513 6	0.315 2	0.184 0	0.322 8	0.301 6	0.209 2	0.304 2	0.613 4	0.388 2	0.621 0	98.87	97.61	98.03	97.90	97.41	98.02	1.06	1.73	0.91
0.527 4	0.527 4	0.527 4	0.323 7	0.189 0	0.331 5	0.301 6	0.209 2	0.304 2	0.615 3	0.388 2	0.625 7	96.68	95.22	96.71						
0.521 8	0.521 8	0.521 8	0.320 2	0.187 0	0.328 0	0.301 6	0.209 2	0.304 2	0.611 2	0.390 2	0.625 0	96.49	97.13	97.63						
0.517 7	0.517 7	0.517 7	0.317 7	0.185 5	0.325 4	0.301 6	0.209 2	0.304 2	0.615 3	0.395 2	0.625 6	98.67	100.24	98.68						

注:A为人参皂苷 R_{g1} , B为人参皂苷 R_e , C为人参皂苷 R_{b1} 。

积(Y)为纵坐标进行线性回归,得人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 和 R_{b1} 回归方程分别为 $Y_{R_{g1}} = 942\,081 X + 726.1 (r = 0.999\,5)$, $Y_{R_e} = 893\,530 X - 1\,259.1 (r = 0.999\,3)$, $Y_{R_{b1}} = 728\,564 X - 1\,072.5 (r = 0.999\,1)$ 。结果表明,人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 进样量分别在 $0.075\,4 \sim 0.603\,2\,\mu\text{g}$, $0.052\,3 \sim 0.418\,4\,\mu\text{g}$, $0.076\,0 \sim 0.608\,4\,\mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液 $5\,\mu\text{L}$,按拟订色谱条件重复进样6次,记录色谱图。结果人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 和 R_{b1} 峰面积的 RSD 分别为 0.76% , 0.95% , 0.89% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20180923)样品,依法制备供试品溶液,室温下分别于0,1,2,4,8,12 h时进样 $5\,\mu\text{L}$ 测定。结果人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 和 R_{b1} 峰面积的 RSD 分别为 1.41% , 1.57% , 1.60% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为20180923)样品,依法制备6份供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 和 R_{b1} 平均含量分别为 $0.613\,7\,\text{mg/g}$, $0.358\,3\,\text{mg/g}$, $0.628\,6\,\text{mg/g}$, RSD 分别为 0.85% , 1.25% , 1.05% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品6份,每份约 $0.5\,\text{g}$,精密称定,分别精密加入混合对照品贮备液 $1.0\,\text{mL}$,依法制备供试品溶液,并按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为20180923, 20181015, 20181105)适量,依法制备供试品溶液,分别取供试品溶液和对照品溶液按拟订色谱条件进样测定,以外标法计算含量。结果每粒参杞通脉胶囊中含人参皂苷 R_{g1} $0.214\,8$, $0.203\,5$, $0.247\,1\,\text{mg}$, 人参皂苷 R_e $0.125\,4$, $0.133\,5$, $0.128\,5\,\text{mg}$, 人参皂苷 R_{b1} $0.220\,0$, $0.215\,8$, $0.228\,5\,\text{mg}$ 。

3 讨论

UPLC是在高效液相色谱法基础上采用小颗粒填料,结合超高压输液泵及高灵敏度检测器发展而来的一

种新兴色谱技术,其效率高、流动相试剂消耗少,节约、环保,分离度高,适合同时分析多成分,灵敏度高、进样量少,适合低组分含量分析。参杞通脉胶囊成分复杂、人参皂苷含量低,适合采用UPLC法。

曾采用Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱进行试验,未能将3种人参皂苷分离。而HSS T_3 色谱柱填料为高强度硅胶颗粒, T_3 对极性分子具有较强的反相保留能力,对极性类的皂苷成分有较好的分离效果。

由于UPLC柱容量小,需对样品进行净化处理,因此先用高倍三氯甲烷、乙醚混合液除去脂溶性成分,然后用甲醇提取、蒸干后水溶解、正丁醇萃取,氨试液、水饱和的正丁醇洗涤除去杂质,满足色谱分离要求,阴性对照无干扰。本研究中的方法重复性好,精密度高,稳定性好,回收率符合要求,可用于该制剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 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: 8, 1219, 1400.
- [2] 张青, 罗秋月, 李静, 等. UPLC在中药及其复方分析中的应用和研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 226-233.
- [3] 曹树萍, 聂黎行, 王钢力, 等. HPLC法同时测定参麦注射液中9个人参皂苷含量[J]. 中成药, 2011, 31(3): 476-478.
- [4] 张鹏, 郭兰, 李西文, 等. 人参饮片标准汤剂的评价及应用探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 15(17): 93-95.
- [5] 王京霞, 陈琳, 乔晴, 等. 参麦胶囊中人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 和 R_{b1} 含量的测定[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(1): 82-83.
- [6] 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 和人参皂苷 R_{b1} [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 48-50.
- [7] 张晓旭, 马雪涛, 胡蒙, 等. 超高效液相色谱法检测6种人参皂苷含量[J]. 中国食品学报, 2010, 5(15): 241-246.
- [8] 莫炫永. HPLC测定参松养心胶囊中人参皂苷 R_{b1} 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 112-114.
- [9] 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 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 69-72.

(收稿日期: 2019-06-14; 修回日期: 2019-12-09)