

HPLC法同时测定生脉散中4种人参皂苷类成分的含量

平 华*(杭州市江干区人民医院药剂科,杭州 310000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1702-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.39

摘要 目的:建立同时测定生脉散中人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rc、人参皂苷Rb₂、人参皂苷Rd含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为ZORBAX Extend-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为203 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rc、人参皂苷Rb₂、人参皂苷Rd的检测进样量线性范围分别为0.78~38.75、0.51~25.50、0.43~21.50、0.20~10.00 μg (*r*分别为0.999 6、0.999 6、0.999 7、0.999 7);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD≤2%;加样回收率分别为96.6%~101.2%、97.0%~102.1%、99.1%~102.8%、96.3%~101.1%,RSD分别为1.6%、1.7%、1.3%、1.6% (*n*=6)。结论:该方法简便、快速、稳定性和重复性好、精密度高,可用于生脉散的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;生脉散;人参皂苷Rb₁;人参皂苷Rc;人参皂苷Rb₂;人参皂苷Rd

Simultaneous Determination of 4 Ginsenosides in Shengmai Powder by HPLC

PING Hua (Dept. of Pharmacy, Hangzhou Jianggan District People's Hospital, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination for ginsenoside Rb₁, ginsenosides Rc, ginsenosides Rb₂ and ginsenosides Rd in Shengmai powder. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent ZORBAX Extend-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, wavelength was 203 nm, column temperature was 30 ℃ and the volume injection was 10 ml. RESULTS: The linear was 0.78-38.75 μg for ginsenoside Rb₁ (*r*=0.999 6), 0.51-25.50 μg for ginsenosides Rc (*r*=0.999 6), 0.43-21.50 μg for ginsenosides Rb₂ (*r*=0.999 7) and 0.20-10.00 μg for ginsenosides Rd (*r*=0.999 7); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 96.6%-101.2% (RSD=1.6%, *n*=6), 97.0%-102.1% (RSD=1.7%, *n*=6), 99.1%-102.8% (RSD=1.3%, *n*=6) and 96.3%-101.1% (RSD=1.6%, *n*=6). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid with good stability, reproducibility and high precision, and can be used for quality control of Shengmai powder.

KEYWORDS HPLC; Shengmai powder; Ginsenoside Rb₁; Ginsenosides Rc; Ginsenosides Rb₂; Ginsenosides Rd

生脉散是由人参、麦冬和五味子3味药材组成的中药方剂。本方以人参甘平补肺、大扶元气为君,以麦冬甘寒养阴生津、清虚热而除烦为臣,五味子收敛肺气止汗为佐使,全方以补肺、养心、滋阴着力而获得益气、生津之效,故对夏日汗出过多、损气伤津之证甚宜^[1-2]。现代药理研究表明,生脉散具有强心作用,可增加冠状动脉血流量,降低心肌耗氧量,改善心肌代谢;此外,多年的临床应用也证实其抗休克、调节血压的作用明显^[9-10]。人参为本方中君药,其活性成分主要为人参皂苷类。据2015年版《中国药典》(一部)规定,以高效液相色谱(HPLC)法测定生脉散中人参皂苷类成分的含量,每粒(规格:0.3 g/粒或0.35 g/粒)以人参皂苷Rg₁和人参皂苷Re的总量计不得少于0.45 mg^[9],但对其他人参皂苷类成分却没有规定。且目前尚未见同时测定生脉散中人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rc、人参皂苷Rb₂、人参皂苷Rd这4种成分含量的报道。为提高生脉散产品质量控制标准,进一步保证药物疗效,本试验采用HPLC法对生脉散中人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rc、人参皂苷Rb₂、人参皂苷Rd的含量进行了同时测定。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1376A Micro型泵、G1367B型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1315A型检测器(美国Agilent公司);CPA225D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius

公司);Centrifuge 5430R型高速离心机(美国Eppendorf公司,功率:450 W,频率:50 kHz);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

生脉散(宁波立华制药有限公司,批号:S201206、S201207、S201208);人参皂苷Rb₁对照品(批号:110704-200420,纯度:99.2%)、人参皂苷Rc对照品(批号:111686-200501,纯度:96.3%)、人参皂苷Rb₂对照品(批号:111752-200501,纯度:97.2%)、人参皂苷Rd对照品(批号:111818-201001,纯度:97.3%)均购自中国食品药品检定研究院,使用前均经五氧化二磷真空干燥24 h;乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:203 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %
0	15	85
15	15	85
30	50	50
45	50	50

2.2 溶液的制备

* 主管中药师。研究方向:中成药中有效成分含量。E-mail: 410570851@qq.com

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取经五氧化二磷减压干燥 12 h 的人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd 对照品适量,置于同一 25 ml 棕色量瓶中,加甲醇制成每 1 ml 分别含人参皂苷 Rb₁ 1.55 mg、人参皂苷 Rc 1.02 mg、人参皂苷 Rb₂ 0.86 mg、人参皂苷 Rd 0.40 mg 的混合溶液,作为混合对照品贮备液。精密量取上述贮备液 10 ml,置于 20 ml 棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,研钵研细后,精密称取 5 g,置于 100 ml 具塞烧瓶中,精密加入甲醇 50 ml,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,放冷至室温,再次称定质量并用甲醇补足减失的质量,摇匀,用干燥漏斗滤过,取 30 ml 续滤液置于 80 °C 水浴上蒸干,残渣加蒸馏水洗涤 3 次(3 次蒸馏水分别量取 15、10、10 ml),合并洗涤液至分液漏斗,用石油醚提取 2 次,每次 30 ml,弃去石油醚,在石油醚提取之后的水溶液中加入 3% 的氨溶液振摇后,用水饱和的正丁醇提取 5 次(提取溶剂体积分别为 30、30、30、20、20 ml),合并正丁醇液,置于蒸发皿中蒸干,加 3 ml 甲醇溶解残渣并转移至 10 ml 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照生脉散配方比例和制备工艺,制备缺人参的阴性样品,再按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,待测的 4 个组分色谱峰与其他峰均能达到基线分离,分离度 > 1.5,理论板数以人参皂苷 Rb₂ 峰计 > 6 000,保留时间分别为 9.1、17.2、23.5、30.2 min。

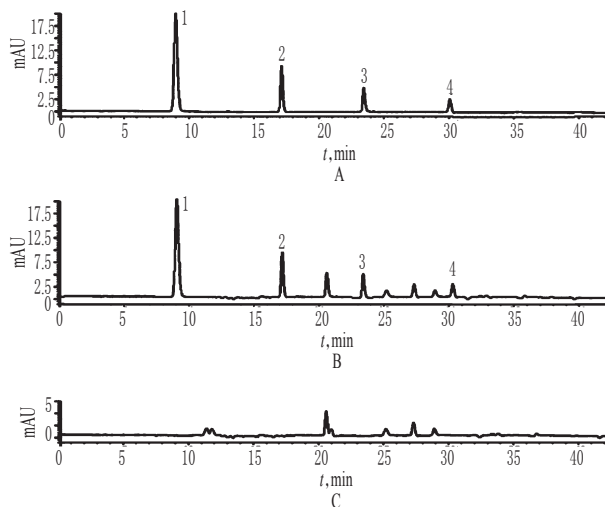


图 1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.人参皂苷 Rb₁;2.人参皂苷 Rc;3.人参皂苷 Rb₂;4.人参皂苷 Rd

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.ginsenoside Rb₁; 2.ginsenoside Rc; 3.ginsenoside Rb₂; 4.ginsenoside Rd

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、2、5、10、20、

30、50 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程和线性范围见表 2。

表 2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and linear and range

待测成分	回归方程	线性范围, μg	r
人参皂苷 Rb ₁	y=221.24x-22.65	0.78~38.75	0.999 6
人参皂苷 Rc	y=239.99x-18.02	0.51~25.50	0.999 6
人参皂苷 Rb ₂	y=250.31x-10.01	0.43~21.50	0.999 7
人参皂苷 Rd	y=294.45x-7.09	0.20~10.00	0.999 7

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,分别按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 3:1 时,得检测限(LOD);当信噪比为 10:1 时,得定量限(LOQ),结果见表 3。

表 3 检测限与定量限考察结果

Tab 3 Determination results of detection limit and quantitation limit

待测成分	LOD, ng	LOQ, ng
人参皂苷 Rb ₁	25.1	84.2
人参皂苷 Rc	20.2	67.1
人参皂苷 Rb ₂	19.2	64.0
人参皂苷 Rd	23.1	77.5

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,连续 6 次,记录峰面积。结果,人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd 峰面积的 RSD 分别为 0.8%、0.5%、0.9%、1.0%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下同一批供试品溶液(批号:S201206)适量,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、16、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd 峰面积的 RSD 分别为 0.9%、1.2%、1.5%、2.0%(n=7),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:S201206)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd 峰面积的 RSD 分别为 1.8%、1.9%、1.9%、2.0%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:S201206)适量,研细,精密称取 5 g,分别精密加入人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd 对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 4。

2.10 样品含量测定

精密称取 3 批样品各适量,每批共 3 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并以外标法计算 4 种人参皂苷类成分的含量,结果见表 5。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery test (n=6)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
人参皂苷Rb ₁	1.025 5	1.022 8	2.060 2	101.2	98.7	1.6
	1.011 8	1.022 8	2.000 0	96.6		
	1.008 2	1.022 8	2.025 1	99.4		
	1.031 4	1.022 8	2.027 7	97.4		
	0.999 8	1.022 8	2.005 8	98.4		
	1.118 8	1.022 8	2.134 3	99.3		
人参皂苷Rc	0.530 6	0.558 5	1.072 1	97.0	99.4	1.7
	0.527 8	0.558 5	1.075 7	98.1		
	0.530 1	0.558 5	1.085 1	99.4		
	0.529 5	0.558 5	1.086 8	99.8		
	0.524 3	0.558 5	1.094 5	102.1		
	0.529 9	0.558 5	1.087 1	99.8		
人参皂苷Rb ₂	0.447 1	0.418 4	0.861 7	99.1	100.7	1.3
	0.441 4	0.418 4	0.862 2	100.6		
	0.442 2	0.418 4	0.865 2	101.1		
	0.439 2	0.418 4	0.869 4	102.8		
	0.439 8	0.418 4	0.856 2	99.5		
	0.440 1	0.418 4	0.864 3	101.4		
人参皂苷Rd	0.299 8	0.291 9	0.588 7	99.0	98.8	1.6
	0.300 1	0.291 9	0.586 4	98.1		
	0.288 7	0.291 9	0.577 7	99.0		
	0.310 1	0.291 9	0.605 2	101.1		
	0.299 5	0.291 9	0.590 3	99.6		
	0.290 1	0.291 9	0.571 2	96.3		

表5 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 5 Content Determination of samples (n=3, mg/g)

批号	人参皂苷Rb ₁	人参皂苷Rc	人参皂苷Rb ₂	人参皂苷Rd
S201206	0.205 1	0.111 4	0.088 6	0.059 9
S201207	0.211 2	0.107 0	0.081 5	0.060 2
S201208	0.200 3	0.103 6	0.080 8	0.058 0

3 讨论

3.1 前处理方法的选择

本试验曾将甲醇、70%甲醇、纯水分别作为提取溶剂,同时也考察了提取方式(超声提取与沸腾回流)和提取时间(20、30、40 min)对4种成分的提取效率的影响。正交试验结果表明,甲醇超声30 min可以保证4种活性成分被最大限度地提取出来,因此本试验的提取方法确定为:甲醇超声提取30 min。

经文献调研得知,人参皂苷在酸性条件下不稳定,与麦冬、五味子配伍可使提取物的酸性变强,更易发生皂苷水解^[9-10]。因此,制备供试品溶液过程中,进行水饱和的正丁醇提取步骤时,加入少量稀氨溶液就可以防止人参皂苷类成分的水解,进而保证提取效率^[11-15]。

3.2 流动相的选择

在预试验阶段,笔者以甲醇-磷酸、甲醇-甲酸、乙腈-磷酸和乙腈-甲酸分别作为流动相进行了考察,并以4种皂苷类成分的分离效果作为评判指标。结果,甲醇-磷酸、甲醇-甲酸作为流动相时,4种成分的色谱峰出现了部分重叠,而乙腈-磷酸和乙腈-甲酸作为流动相时,各化合物对应的色谱峰无重叠,显示出较好的分离度。最后,综合考虑分离度、理论板数、保留时间等因素,确定乙腈-0.1%甲酸为流动相进行梯度洗脱。

3.3 色谱柱的选择

在预试验阶段,笔者分别对ZORBAX Extend-C₁₈、Eclipse-C₁₈、Hypersil-C₁₈、Welch Material XB-C₁₈和Kromasil-100 C₁₈几种色谱柱进行了考察,从分离度、分离效率等方面优化选择色谱柱。因为本研究测定的4种人参皂苷类成分均含有一定量的醇羟基,导致其具有一定的酸性,所以选择的色谱柱应该稍偏酸性以减少色谱峰的拖尾现象,提高分离度。综合考虑4种成分的分离度、理论板数和保留时间等因素,最后选定ZORBAX Extend-C₁₈进行分离。

综上所述,本方法简便、快速、稳定性和重复性好、精密度高,可用于生脉散的质量控制。

参考文献

- [1] 彭明勇,李艳.生脉散的临床应用及药理研究[J].中医中药,2012,10(1):224.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2010:654.
- [3] 徐淑华,刘生友.生脉注射液的药理作用研究进展[J].中国药事,2010,24(4):405.
- [4] 王亚萍,年莉.生脉散在心血管疾病中的应用[J].山西中医学院学报,2012,13(6):64.
- [5] 冯凯,祝兴超.加味生脉散治疗舒张性心功能不全[J].光明中医,2014,29(2):301.
- [6] Tribouilhy C, Rusinam D, Mahjoub H, et al. Prognosis of heart failure with preserved ejection fraction: a 5 year prospective population-based study [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(3):339.
- [7] 郭艳华,金栋.黄芪生脉散加味治疗病毒性心肌炎60例[J].中国中医急症,2011,20(11):1840.
- [8] 江巍,阮新民,林宇,等.生脉散改善不停跳冠脉搭桥手术患者临床疗效观察[J].辽宁中医杂志,2005,32(9):869.
- [9] 任钧国,马晓斌,林成仁,等.加味生脉散对进行性心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):78.
- [10] 齐瑞霞.加味生脉散治疗病毒性心肌炎30例疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2004,13(18):55.
- [11] 陈木洲,刘延辉,黄姬.酸碱度对人参皂苷提取率及其稳定性影响分析[J].中国实用医药,2011,6(20):146.
- [12] 曹站霞.人参与麦冬配伍后人参皂苷含量变化的研究[J].中国现代药物应用,2009,3(8):34.
- [13] 邱新建,李守信,刘武占,等.生脉超微粉中3种人参皂苷含量测定方法学研究[J].世界科学技术:中医药现代化&中药研究,2013,15(8):1801.
- [14] 刘振丽,宋志前,贾宏伟,等.四君子汤和理中丸方中人参皂苷的含量测定[J].中国医院药学杂志,2007,27(9):1326.
- [15] 丁涛.参苓白术散中人参皂苷的含量测定[J].中国中医基础学杂志,2012,18(10):1134.

(收稿日期:2015-06-10 修回日期:2016-01-03)

(编辑:刘柳)