

HPLC 同时测定骨愈注射液中三七总皂苷和淫羊藿苷含量

盛华刚*

(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:建立骨愈注射液中三七总皂苷和淫羊藿苷的含量测定方法。方法:Diomonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm),流动相乙腈-水,梯度洗脱,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 25 °C。结果:淫羊藿苷线性范围 1.06 ~ 10.60 μg,平均回收率为 100.2%,RSD 1.54%,三七皂苷 R₁ 线性范围 0.42 ~ 4.20 μg,平均回收率 100.6%,RSD 1.89%,人参皂苷 R_{g1} 线性范围 1.90 ~ 18.97 μg,平均回收率 99.9%,RSD 1.09%,人参皂苷 R_e 线性范围 0.18 ~ 1.78 μg,平均回收率 100.8%,RSD 1.96%,人参皂苷 R_{b1} 线性范围 2.23 ~ 22.34 μg,平均回收率 101.4%,RSD 1.83%,人参皂苷 R_d 线性范围 0.45 ~ 4.53 μg,平均回收率 101.2%,RSD 2.37%。结论:方法准确可靠,适用于同时测定骨愈注射液中三七总皂苷和淫羊藿苷含量。

[关键词] 骨愈注射液;三七总皂苷;淫羊藿苷;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)13-0078-04

[doi] 10.11653/syfy2013130078

Simultaneous Determination of Panax Notoginseng Saponins and Icaritin in Guyu Injection by HPLC

SHENG Hua-gang*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[收稿日期] 20121224(021)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-013)

[通讯作者] * 盛华刚,讲师,博士,从事中药新制剂的研究,Tel:0531-89628590, E-mail:shenghuagang@sina.com

表 2 益智温肾十味丸中胡椒碱的含量和转移率

批号	胡椒碱/mg·g ⁻¹		转移率 /%
	制剂	药材	
100402	1.541	27	68.5
100444	2.018	33	73.4
100418	2.072	33	75.4
090311	1.834	30	73.4
090310	1.799	30	72.0
090616	1.577	30	63.1

中 6 味重要药材(益智、萆薢、苦石莲、冬葵果、方海、白矾砂)进行定性鉴别和含量测定。其中薄层鉴别和理化鉴别方法简单易行,胡椒碱含量测定方法稳定、准确、可靠,该方法可有效地控制益智温肾十味丸的质量,并适合推广运用。

[参考文献]

[1] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书·

蒙医学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1992:271.

[2] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准蒙药分册[S]. 北京:人民卫生出版社,1998:155.

[3] 吴红彦,攀秦,纪兰菊. 藏药石榴健胃片质量控制方法的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):70.

[4] 王艳,陈咏梅. 国家药品质量标准执行中存在的问题及对策[J]. 安徽医药,2007,11(4):371.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 63.

[6] 林国钡,谢燕,李国文,等. 地黄益智颗粒中挥发油提取及包合工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):32.

[7] 白音夫,陈广荣,阿拉坦其其格. HPLC 法测定哈日嘎日迪-5 胶囊胡椒碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(4):78.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: To establish a method for the determination of *Panax notoginseng* saponins and icariin in Guyu Injection. **Method:** Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm) was used with acetonitrile and water as mobile phase with gradient elution; the flow rate was 1 mL · min⁻¹; detection wavelength was set at 203 nm; the column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** The linear range of icariin was within 1.06-10.60 μg and the average recovery of assay was 100.2% (RSD 1.54%); the linear range of notoginsenoside R₁ was within 0.42-4.20 μg and the average recovery of assay was 100.6% (RSD 1.89%); the linear range of ginsenoside Rg₁ was within 1.90-18.97 μg and the average recovery of assay was 99.9% (RSD 1.09%); the linear range of ginsenoside Re was within 0.18-1.78 μg and the average recovery of assay was 100.8% (RSD 1.96%); the linear range of ginsenoside Rb₁ was within 2.23-22.34 μg and the average recovery of assay was 101.4% (RSD 1.83%); the linear range of ginsenoside Rd was within 0.45-4.53 μg and the average recovery of assay was 101.2% (RSD 2.37%). **Conclusion:** The method is accurate and reproducible. It can be used for determination of *Panax notoginseng* saponins and icariin in Guyu Injection.

[Key words] Guyu Injection; *Panax notoginseng* saponins; icariin; HPLC

骨愈注射液由三七、淫羊藿中提取的有效成分三七总皂苷、淫羊藿苷等制备而成,具有消肿定痛、散瘀强筋之功。研究表明,三七总皂苷可以缩短骨折愈合时间,提高骨痂质量,具有促进骨折愈合的作用^[1]。淫羊藿苷可显著提高体外培养大鼠股骨组织中骨代谢相关基因的表达水平、增加钙盐沉积量以及ALP活性^[2]。淫羊藿也有促进骨折愈合的作用^[3-4]。将三七总皂苷和淫羊藿苷配伍可明显促进成骨细胞增殖并有明显的钙化作用($P < 0.01$)^[5],药效学表明能明显促进大鼠骨折愈合。以此为基础,现将三七总皂苷和淫羊藿苷配伍制成中药注射剂新药。为了控制骨愈注射液的质量,采用HPLC同时测定了制剂中三七总皂苷含有的5种皂苷类成分和淫羊藿苷的含量。

1 材料

日立L-2000型高效液相色谱仪(日本日立公司),XS105DU型电子天平(梅特勒公司)。淫羊藿苷对照品(批号10737-200415),三七皂苷R₁对照品(批号110745-200617),人参皂苷Rg₁对照品(批号110703-201027),人参皂苷Re对照品(批号110754-201123),人参皂苷Rb₁对照品(批号110703-201027),人参皂苷Rd对照品(批号111818-201001)皆购自中国药品生物制品检定所。骨愈注射液(自制,批号20111108,20111110,20111112)。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈液相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm),流动相乙腈A,水B,梯度洗脱(0~20 min, 20% A; 20~47 min, 20%~46% A; 47~52 min, 46%~55% A; 52~55 min, 55% A),体

积流量1.0 mL · min⁻¹,检测波长203 nm,柱温25 °C。人参皂苷Rg₁与人参皂苷Re的分离度应>1.5。理论板数按人参皂苷Rg₁峰计算不低于6 000。

2.2 供试品溶液的制备 精密吸取注射液25 mL,蒸干,残渣加甲醇溶解,定量转移至2 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 对照品溶液的制备

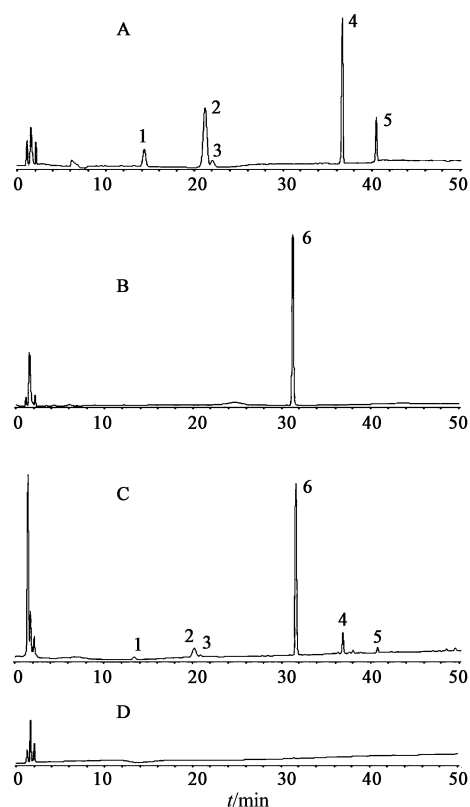
2.3.1 淫羊藿苷对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成每1 mL含0.212 mg的溶液,即得。

2.3.2 三七总皂苷混合对照品溶液 精密称取三七皂苷R₁,人参皂苷Rg₁,人参皂苷Re,人参皂苷Rb₁,人参皂苷Rd对照品适量,加甲醇制成至每1 mL含三七皂苷R₁ 0.084 mg,人参皂苷Rg₁ 0.394 mg,人参皂苷Re 0.040 mg,人参皂苷Rb₁ 0.482 mg,人参皂苷Rd 0.096 mg的混合溶液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 制备缺少淫羊藿苷和三七总皂苷的空白制剂,按照供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.5 专属性考察 吸取供试品,对照品和阴性对照溶液20 μL分别进样,记录色谱图。结果供试品溶液的色谱图在与对照品相对应的保留时间处有相同的色谱峰,而阴性对照溶液在此处无色谱峰,说明阴性对照对三七总皂苷和淫羊藿苷的测定无干扰。见图1。

2.6 标准曲线的绘制 取2.3项下对照品溶液分别进样5, 10, 20, 30, 40, 50 μL,以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{淫羊藿苷}} = 812\ 667X + 61\ 334$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围1.06~10.6 μg; $Y_{\text{三七皂苷R}_1} = 179\ 186X - 13\ 725$



1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g_1} ; 3. 人参皂苷 R_e ;
4. 人参皂苷 R_{b_1} ; 5. 人参皂苷 R_d ; 6. 淫羊藿苷

图 1 三七总皂苷混合对照品(A)、淫羊藿苷对照品(B)、
供试品(C)、阴性对照品(D)HPLC

($r = 0.9999$), 线性范围 $0.42 \sim 4.2 \mu\text{g}$; $Y_{\text{人参皂苷}R_{g_1}} = 80803X + 33875$ ($r = 0.9999$), 线性范围 $1.90 \sim 18.97 \mu\text{g}$; $Y_{\text{人参皂苷}R_e} = 74570X + 4256$ ($r = 0.9999$), 线性范围 $0.18 \sim 1.78 \mu\text{g}$; $Y_{\text{人参皂苷}R_{b_1}} = 78091X - 148256$ ($r = 0.9999$), 线性范围 $2.23 \sim 22.34 \mu\text{g}$; $Y_{\text{人参皂苷}R_d} = 116245X - 3693$ ($r = 0.9999$), 线性范围 $0.45 \sim 4.53 \mu\text{g}$ 。

2.7 精密度试验 对照品溶液连续进样 6 次, 每次进样 $20 \mu\text{L}$, 测定峰面积, 计算 RSD。结果淫羊藿苷 RSD 0.42%, 三七皂苷 R_1 RSD 1.45%, 人参皂苷 R_{g_1} RSD 0.25%, 人参皂苷 R_e RSD 0.47%, 人参皂苷 R_{b_1} RSD 0.26%, 人参皂苷 R_d RSD 1.26%。表明测定方法的精密度较高, 符合含量测定的要求。

2.8 稳定性考察 取样品(批号 20111112)按供试品溶液制备方法制成供试品溶液, 0, 2, 4, 8, 12 h 进样 1 次, 每次进样 $20 \mu\text{L}$, 测定峰面积, 计算 RSD。淫羊藿苷 RSD 0.28%, 三七皂苷 R_1 RSD 1.50%, 人参皂苷 R_{g_1} RSD 0.47%, 人参皂苷 R_e RSD 1.08%, 人参皂苷 R_{b_1} RSD 1.39%, 人参皂苷 R_d RSD 1.99%。结果表明, 供试品中成分在 12 h 内均较稳定, 符合含量测定的要求。

2.9 重复性试验 平行取同批样品(批号 20111108)6 份, 按供试品制备方法处理, 并测定含量, 计算 RSD。结果淫羊藿苷 RSD 1.27%, 三七总皂苷(含量以三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_d 总量计) RSD 1.57%。说明测定方法的重复性良好。

2.10 加样回收试验 精密吸取已知含量的同批样品(批号 20111110, 淫羊藿苷 $76.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 三七总皂苷 $197.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中含三七皂苷 R_1 6.87%、人参皂苷 R_{g_1} 38.72%、人参皂苷 R_e 4.25%、人参皂苷 R_{b_1} 36.20%、人参皂苷 R_d 5.78%, 且三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_d 总量为 91.82%) 10 mL , 6 份, 各加入对照品适量, 按供试品溶液的制备方法测定各成分含量, 计算加样回收率和 RSD。结果见表 1。

2.11 样品的含量测定 用确定的方法对连续 3 批样品进行含量测定。结果 3 批样品中淫羊藿苷的含量为 $77.48, 76.20, 77.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 三七总皂苷(以三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_d 总量计)的含量为 $177.00, 178.80, 175.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

三七总皂苷的相关成分没有双键, 选择 203 nm 的末端吸收作为检测波长, 淫羊藿苷在 270 nm 处有最大吸收, 在 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 扫描光谱图, 发现其在 203 nm 附近也有一个较大的吸收峰, 因此三七总皂苷和淫羊藿苷的波长确定为 203 nm 。

三七总皂苷和淫羊藿苷同为苷类成分, 在 2010 年版《中国药典》三七总皂苷的含量测定是以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱^[6]。淫羊藿苷的含量测定也可以乙腈-水为流动相^[6-7], 二者的分离条件相似。制剂中三七总皂苷的含量多测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 3 种皂苷成分^[8-9]。2010 年版《中国药典》一部收录的三七总皂苷的 HPLC 含量测定方法能同时测定 5 种皂苷的含量, 但要求流动相的流速为 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。参考相关文献^[10], 本实验对流动相的梯度进一步优化, 表明体积流量为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时可使三七总皂苷中各成分和淫羊藿苷基线分离, 且与其相邻色谱峰的分度度 > 1.5 。

骨愈注射液采用三七总皂苷提取物制备, 按 2010 年版《中国药典》一部三七总皂苷项下规定供注射用的三七总皂苷含三七皂苷 R_1 不得少于 5.0%、人参皂苷 R_{g_1} 不得少于 25.0%、人参皂苷 R_e

表 1 三七总皂苷和淫羊藿苷加样回收率试验

成分	样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	\bar{x}	RSD /%
淫羊藿苷	0.764	0.76	1.516	99.0	100.2	1.54
	0.764	0.76	1.530	100.8		
	0.764	0.76	1.536	101.6		
	0.764	0.76	1.520	99.5		
	0.764	0.76	1.540	102.1		
	0.764	0.76	1.510	98.2		
三七皂苷 R ₁	0.135	0.14	0.274	99.3	100.6	1.89
	0.135	0.14	0.280	103.8		
	0.135	0.14	0.276	100.4		
	0.135	0.14	0.273	98.7		
	0.135	0.14	0.275	99.7		
	0.135	0.14	0.278	101.9		
人参皂苷 R _{g₁}	0.763	0.78	1.533	98.7	99.9	1.09
	0.763	0.78	1.552	101.1		
	0.763	0.78	1.545	100.2		
	0.763	0.78	1.541	99.7		
	0.763	0.78	1.550	100.9		
	0.763	0.78	1.531	98.5		
人参皂苷 Re	0.084	0.088	0.175	102.9	100.8	1.96
	0.084	0.088	0.171	98.5		
	0.084	0.088	0.172	99.5		
	0.084	0.088	0.174	102.2		
	0.084	0.088	0.171	99.1		
	0.084	0.088	0.174	102.5		
人参皂苷 R _{b₁}	0.714	0.73	1.464	102.8	101.4	1.83
	0.714	0.73	1.440	99.4		
	0.714	0.73	1.443	99.9		
	0.714	0.73	1.459	102.1		
	0.714	0.73	1.446	100.3		
	0.714	0.73	1.474	104.1		
人参皂苷 R _d	0.114	0.108	0.227	104.6	101.2	2.37
	0.114	0.108	0.221	99.1		
	0.114	0.108	0.223	100.9		
	0.114	0.108	0.220	98.1		
	0.114	0.108	0.224	101.9		
	0.114	0.108	0.225	102.8		

不得少于 2.5%、人参皂苷 R_{b₁} 不得少于 30.0%、人参皂苷 R_d 不得少于 5.0%，且三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 R_d 总量不得低于 85%。制剂中采用的三七总皂苷中含有三七皂苷 R₁ 6.87%、人参皂苷 R_{g₁} 38.72%、人参皂苷 R_e 4.25%、人参皂苷 R_{b₁} 36.20%、人参皂苷 R_d 5.78%，且三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 R_d 总量为 91.82%，符合注射剂的要求，由于三七总皂苷提取物中的 5 种皂苷成分相对比例难以固定，因此在确保三七总皂苷符合注射用三七总皂苷要求的前提下，在重复性试验和样品的含量测定中三七总皂苷的含量以三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b₁}、人参皂苷 R_d 的总量计。

[参考文献]

[1] 杨军,任婷,李学东. 三七总皂苷促进骨折愈合作用的实验研究[J]. 医学研究杂志, 2010,39(6):69.

[2] 王嘉琪,李雪雁,吴河龙. 淫羊藿苷对体外培养大鼠股骨组织的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(15):196.

[3] 钱卫庆,尹宏. 口服与骨折局部应用淫羊藿对骨质疏松大鼠骨折愈合的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012,32(6):822.

[4] 王德荫,芮钢,李偏,等. 可注射温敏淫羊藿苷壳聚糖水凝胶促进家兔桡骨骨折的愈合[J]. 中国组织工程研究, 2012,16(43):7981.

[5] 盛华刚,李娜,朱立俏,等. 三七总皂苷和淫羊藿苷组分配伍对成骨细胞的增殖和钙化作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(19):183.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:307,369.

[7] 刘元,宋志钊,李星宇. HPLC 测定衍宗育子胶囊中淫羊藿苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(13):65.

[8] 傅秋生,许小红. HPLC 法测定三七总皂苷中 3 种皂苷的含量[J]. 解放军药学报, 2009,25(1):84.

[9] 侯安国,康绍建,刘苏宝,等. HPLC 法测定三七总皂苷分散片中 3 种皂苷的含量[J]. 云南中医学院学报, 2007,30(2):4.

[10] 郑丽华,卢昌均,周志昆,等. HPLC 测定三七总皂苷中 5 种皂苷的含量及稳定性考察[J]. 中医药临床杂志, 2012,24(1):73.

[责任编辑 顾雪竹]