

HPLC 测定复方丹参胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b_1} 的含量

许勇, 诸艳蓉, 王柯, 季申*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法测定复方丹参胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b_1} 的含量。方法: 样品经 70% 甲醇超声处理, 采用色谱柱 Thermo ODS-HYPERSIL (4.6 mm × 200 mm, 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流动相乙腈-水, 梯度洗脱, 检测波长 203 nm。结果: 三七皂苷 R_1 在 0.053 45 ~ 5.345 μ g, 人参皂苷 R_{g_1} 在 0.224 25 ~ 7.475 μ g, 人参皂苷 Re 在 0.044 05 ~ 4.405 μ g, 人参皂苷 R_{b_1} 在 0.225 15 ~ 7.505 μ g 线性关系良好 ($r=0.999, n=6$)。三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b_1} 的平均加样回收率 ($n=9$) 分别为 96.2%, 95.6%, 105.6%, 100.4%。结论: 该方法灵敏度高、专属性好、操作简便、重复性好。

[关键词] 高效液相色谱法; 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b_1} ; 复方丹参胶囊

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0148-04

HPLC Determination of Notoginsenoside R_1 and Ginsenoside R_{g_1} , Re and R_{b_1} in Compound Salvia miltiorrhiza Capsule

XU Yong, ZHU Yan-rong, WANG Ke, JI Shen*

(Shanghai Institute of Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g_1} , Re and R_{b_1} in Compound Salvia miltiorrhiza Capsule. **Method:** The column was Thermo ODS-HYPERSIL (4.6 mm × 200 mm, 5 μ m). The gradient elution mixture mobile phase consisted of acetonitrile and water. The determination wavelength was set at 203 nm. **Result:** Linear ranges were 0.053 45-5.345 μ g for notoginsenoside R_1 , 0.224 25-7.475 μ g for ginsenoside R_{g_1} , 0.044 05-4.405 μ g for ginsenoside Re, 0.225 15-7.505 μ g for ginsenoside R_{b_1} . The average recovery was 96.2% ($n=9$) for notoginsenoside R_1 , 95.6% ($n=9$) for ginsenoside R_{g_1} , 105.6% ($n=9$) for ginsenoside Re, 100.4% ($n=9$) for ginsenoside R_{b_1} . **Conclusion:** The method is simple, sensitive, accurate, specific and reproducible in the quality control of Compound Salvia miltiorrhiza Capsule.

[Key words] HPLC; notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_{g_1} ; ginsenoside Re; ginsenoside R_{b_1} ; Compound Salvia miltiorrhiza Capsule

复方丹参胶囊是由丹参、三七、冰片 3 味药制成的胶囊剂, 具有活血化瘀、理气止痛等作用。研究表明, 三药组分, 丹参活血定痛, 三七活血补气, 冰片引

经报使, 相辅相成, 对心血管疾病具有很好的强心、活血、调脂、降压、止痛等多靶点的功效^[1]。复方丹参胶囊处方中的三七以三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b_1} 为代表的主要活性成分, 具有止血、保护心肌细胞、保护脑组织、降血脂及抗血栓等作用^[2]; 三七总皂苷具有抑制兔血小板聚集的作用, 可以抑制胶原诱导的大鼠血小板聚集^[3]。为控制药品质量, 保证临床用药的安全性和有效性, 我们采用高效液相色谱法对制剂中三七皂

[收稿日期] 20120725(006)

[第一作者] 许勇, 硕士, 主管药师, 从事中药质量标准研究,
Tel: 13916180916, E-mail: xuyongice2003@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 季申, Tel: 021-50798195, E-mail: ji_shen@sohu.com.cn

苷 R₁ (批号 110745-200312)、人参皂苷 R_{g₁} (批号 110703-201027)、人参皂苷 Re (批号 110754-200822)、人参皂苷 R_{b₁} (批号 110704-20092) 进行了测定,建立的定性、定量方法均简便、准确、专属性强,可有效地控制本品的质量。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪,Agilent1100 紫外-可见光检测器,Agilent1100 色谱工作站;三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} (批号分别为 110745-200312, 110703-201027, 110754-200822,110704-20092) 对照品购自中国药品生物制品检定所;乙腈为色谱纯(MERCK 公司),其余试剂均为分析纯(中国医药(集团)上海化学试剂公司)。复方丹参胶囊样品 15 批分别由云南个旧生物药业有限公司、云南特安呐制药股份有限公司、张家港市永仁药业有限公司、云南维和药业股份有限公司、云南白药集团大理药业有限责任公司提供;阴性样品均由云南白药集团大理药业有限责任公司提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇溶液制成每 1 mL 含三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 分别为 0.05,0.2,0.04,0.2 mg 的溶液,即得。

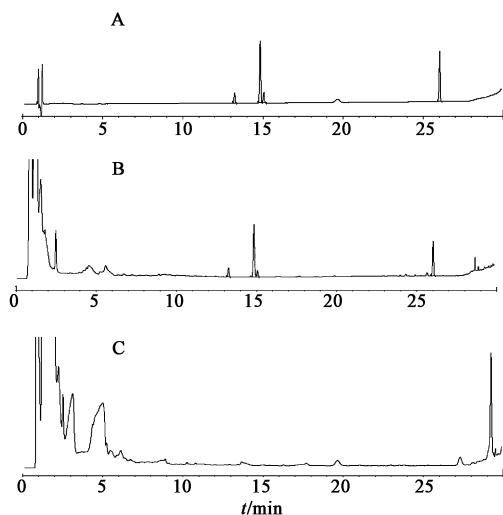
2.1.2 供试品溶液 取装量差异项下内容物,研细,取约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇溶液 20 mL,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方量分别制备缺三七的阴性样品,照 2.1.2 项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱:Thermo ODS-HYPERSIL (4.6 mm × 200 mm, 5 μm),柱温 30 °C,检测波长 203 nm,以乙腈为流动相 A,水为流动相 B,按表 1 中的规定进行梯度洗脱;理论板数按 R_{g₁} 峰计算,不低于 1 万。按上述色谱条件进行测定,结果样品中哈巴俄苷与相邻峰分离度 > 1.8,阴性样品溶液在与哈巴俄苷色谱峰相同位置处无干扰峰,表明样品中其他成分对哈巴俄苷的测定无干扰,见图 1。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 12	19	81
12 ~ 60	19 ~ 3 6	81 ~ 64



A. 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 对照品 (保留时间分别为 13.2,14.8,15.0,26.0 min);B. 样品;C. 阴性样品

图 1 复方丹参胶囊高效液相色谱

2.3 线性关系的考察 精密称取三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 对照品适量,加 70% 甲醇溶液制成 0.053 45,0.224 25,0.044 05,0.225 15 g · L⁻¹ 的对照品溶液①;和 0.534 5,0.747 5,0.440 5,0.750 5 g · L⁻¹ 的对照品溶液②。分别精密吸取对照品溶液①1,2,5,10 μL;对照品溶液②5,10 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,进行回归分析,得三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 的回归方程分别为 Y = 230.323 21X + 3.606 72; Y = 352.681 19X + 6.738 50; Y = 292.610 86X + 3.703 23; Y = 254.203 21X + 4.564 71 (r = 0.999)。

结果表明,三七皂苷 R₁ 在 0.053 45 ~ 5.345 μg、人参皂苷 R_{g₁} 在 0.224 25 ~ 7.475 μg、人参皂苷 Re 在 0.044 05 ~ 4.405 μg、人参皂苷 R_{b₁} 在 0.225 15 ~ 7.505 μg 进样量与峰面积线性关系良好,见表 2 ~ 5。

2.4 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液①10 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 峰面积的 RSD 在 0.21% ~ 0.28%,结果表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 按 2.1.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,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} 总量的含量平均值为 10.1 mg/粒, RSD 2.4%。

表 2 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} 回归方程

	回归方程	相关系数 r
三七皂苷 R_1	$Y = 230.323 21X + 3.606 72$	0.999 87
人参皂苷 R_{g_1}	$Y = 352.681 19X + 6.738 50$	0.999 84
人参皂苷 R_e	$Y = 292.610 86X + 3.703 23$	0.999 86
人参皂苷 R_{b_1}	$Y = 254.203 21X + 4.564 71$	0.999 83

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,在上述色谱条件下,分别于 0, 4, 11, 30 h 进样测定,结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 峰面积的 RSD 在 0.05% ~ 1.81%。表明供试品溶液在 30 h 内基本稳定。

2.7 准确度试验 取人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇溶液制成每 1 ml 含人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 分别为 1.495、1.501 $g \cdot L^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液①。取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_e 、对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇溶液制成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_e 分别为 1.069, 0.881 $g \cdot L^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液②。

取本品粉末(过三号筛)约 0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,一式 9 份,以 3 份为一组,分别精密加入对照品溶液①1.2, 1.5, 1.8 mL, 和对照品溶液②0.4, 0.5, 0.6 mL,精密加入 70% 甲醇溶液 20 mL,称定质量,超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,分别用 70% 甲醇溶液补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,进样分析,记录峰面积,测定,结果见表 3 ~ 6。

表 3 三七皂苷 R_1 准确度试验

样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.578	0.641 4	1.222	100.4		
0.617	0.641 4	1.257	99.7		
0.619	0.641 4	1.223	94.1		
0.601	0.534 5	1.123	97.6	96.1	3.2
0.619	0.534 5	1.125	94.6		
0.597	0.534 5	1.121	98.0		
0.617	0.427 6	1.027	95.8		
0.601	0.427 6	1.005	94.4		
0.629	0.427 6	1.016	90.5		

表 4 人参皂苷 R_{g_1} 准确度试验

样品中 含量/mg	加入量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
2.089	2.691 0	4.790	100.3		
2.230	2.691 0	4.880	98.4		
2.236	2.691 0	4.811	95.6		
2.170	2.242 5	4.337	96.6	95.6	3.2
2.236	2.242 5	4.383	95.7		
2.157	2.242 5	4.322	96.5		
2.228	1.794 0	3.872	91.6		
2.173	1.794 0	3.881	95.2		
2.273	1.794 0	3.895	90.4		

表 5 人参皂苷 R_e 准确度试验

样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.370	0.528 60	0.882	96.8		
0.395	0.528 60	0.910	97.4		
0.396	0.528 60	0.959	106.5		
0.385	0.440 50	0.863	108.5	105.6	4.7
0.396	0.440 50	0.870	107.6		
0.382	0.440 50	0.856	107.6		
0.395	0.352 40	0.774	107.5		
0.385	0.352 40	0.773	110.1		
0.403	0.352 40	0.786	108.6		

表 6 人参皂苷 R_{b_1} 准确度试验

样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.947	2.701 80	4.779	104.8		
2.078	2.701 80	4.849	102.5		
2.084	2.701 80	4.774	99.5		
2.023	2.251 50	4.312	101.6	100.3	3.0
2.084	2.251 50	4.371	101.5		
2.010	2.251 50	4.293	101.3		
2.077	1.801 20	3.824	96.9		
2.026	1.801 20	3.835	100.4		
2.118	1.801 20	3.822	94.6		

2.8 样品测定 按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,测定 15 批样品中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 总量的含量,用外标法计算,结果见表 7。

3 讨论

3.1 测定指标的选择 《中国药典》^[4] 2010 年版一部“三七”项下含量测定方法是以三七皂苷 R_1 、人参

表7 样品测定

No.	批号	含量 (mg/粒)	No.	批号	含量 (mg/粒)
1	101101	10.1	9	100901	5.0
2	101102	9.7	10	S20100901	7.9
3	101103	10.7	11	S20100902	8.0
4	100301	10.2	12	S20100903	8.6
5	100302	9.8	13	101001	7.0
6	100303	8.7	14	101002	6.8
7	091101	5.2	15	101003	6.8
8	100301	5.3			

皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁} 为测定指标,并未对人参皂苷 Re 建立含量测定方法。但人参皂苷 Re 亦是三七中的主要活性成分之一,故我们在选择测定指标时,建立了同时测定三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 的 HPLC 方法。

3.2 检测波长的确定 经二极管阵列检测器进行紫外光谱扫描,样品色谱图中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 色谱峰的紫外光谱与对照品一致,在 203 nm 处有最大吸收,故确定检测波长为 203 nm。

3.3 含量测定提取方法的选择 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 的含量测定方法文献已报道的有高效液相色谱法^[5-10]、薄层扫描法^[11],但复方制剂复方丹参胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 的含量测定方法未见报道。在试验中采取回流提取、超声提取等多种方法进行了试验,结果超声处理提取效率最高,故采用超声处理的提取方式。同时对 50% 甲醇、70% 甲醇、乙醇、乙醇 4 种提取溶剂进行了考察,结果乙醇的提取效率最低,甲醇次之,当采用 70% 甲醇进行提取时,三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参

皂苷 Re、人参皂苷 R_{b₁} 的提取效率最高,故选择用 70% 甲醇作为提取溶剂。

[参考文献]

[1] 周燕霞,李元波,复方丹参研究概况[J]. 江苏中医药,2007,39(7):65.

[2] 牧磊,陈钢,张晓. 丹参、三七有效组分及其复方的药代动力学研究进展[J]. 中成药,2011,33(7):1209.

[3] 杨佳,秦彩玲. 复方丹参方及丹参、三七对血小板功能影响的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(2):59.

[4] 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,2010:11.

[5] 林晓辉,张雪原,林史珍,等. 高效液相色谱法测定心灵丸中三七皂苷 R₁ 的含量[J]. 今日药学,2009,19(1):44.

[6] 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 R₁ 的含量[J]. 中成药,2006,28(12):1734.

[7] 唐云,倪玮焯,束志凌, HPLC 法测定散结镇痛胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b₁}、三七皂苷 R₁ 的含量[J]. 药学进展,2009,33(7):328.

[8] 王建国,万慧杰,朱贺年. HPLC 测定冠心病丹参胶囊中人参皂苷 R_{b₁}、三七皂苷 R_{g₁}、三七皂苷 R₁. [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):98.

[9] 王芳,李雪晴,张星等, HPLC 同时测定薏仁肠肽胶囊中人参皂苷 R_{g₁} 和三七皂苷 R₁ 含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):72.

[10] 黎玉翠,陈志维,暴梅佳,等. HPLC 法测定灵芝降糖胶囊中人参皂苷 R_{g₁}、Re、R_{b₁} 及三七皂苷 R₁ 的含量.[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(7):9.

[11] 杨景红,张启兴,沈德凤,救尔心胶囊中三七皂苷 R₁ 的薄层扫描含量测定[J]. 黑龙江医药科学,2001,24(5):16.

[责任编辑 顾雪竹]