

HPLC 测定冠心丹参胶囊中人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、三七皂苷 R₁

王建国, 万慧杰*, 朱贺年

(包头中药有限责任公司, 内蒙古 包头 014040)

[摘要] 目的: 建立冠心丹参胶囊中三七的含量测定方法。方法: 采用 RP-HPLC 梯度洗脱法对制剂中人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 三七皂苷 R₁ 进行定量测定, 波长 203 nm。结果: 人参皂苷 Rg₁ 线性范围 5.359 ~37.641 μg; 平均加样回收率 99.51%; RSD 为 0.46%。人参皂苷 Rb₁ 线性范围 5.401 ~35.732 μg; 平均加样回收率 100.06%; RSD 为 0.39%。三七皂苷 R₁ 线性范围 2.867 ~16.631 μg; 平均加样回收率 99.78%; RSD 为 0.36%。结论: 所建立的方法简便、重复性好、准确度高, 可作为该产品的质量的控制方法。

[关键词] 冠心丹参胶囊; 高效液相色谱法; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rg₁; 三七皂苷 R₁

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2011)03-0098-03

冠心丹参胶囊由三七、丹参、降香油 3 味药组成, 具有活血化瘀、理气止痛的功效。临床用于气滞血瘀所导致的胸闷、胸痹等。其中三七为该方的君药, 具有化瘀止血、消肿定痛、补血强壮等作用。现代研究表明, 三七总皂苷是三七中有效活性部位, 具有强心、扩张冠状动脉、增加冠状血流量、抗动脉粥样硬化等药理作用^[1]。

根据国家新药的有关规定, 对冠心丹参胶囊的二次开发, 需要对其有效部位建立测定方法。为综合评价冠心丹参胶囊的质量, 本文采用高效液相色谱

法测定冠心丹参胶囊中人参皂苷 Rg₁, Rb₁; 及三七皂苷 R₁ 的含量测定方法。

1 材料

1.1 仪器 日立高效液相色谱仪(L-2200 进样器, L-2300 柱温箱, L-2400 检测器, L-2100HPLC 泵)。

1.2 试药 冠心丹参胶囊由包头中药厂提供(批号 080110, 080111, 080112)。三七皂苷 R₁ (110745-200313)、人参皂苷 Rb₁ (10703-200322) 人参皂苷 Rg₁ (110704-200318), 由包头中药厂提供。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

[收稿日期] 2010-07-13

[第一作者] 王建国, 工程师, 研究方向: 中药制剂, Tel: 0475-4919311; E-mail: w_jianguo@ sina. com

[通讯作者] * 万慧杰, 工程师, 硕士, 研究方向: 缓控释制剂, Tel: 0472-4616324, E-mail: whj_wjg@ sohu. com

从海桐叶挥发油中鉴定了 10 个化合物, 已鉴定成分峰面积占色谱总馏出峰面积的 100%。主要成分为绿花白千层醇(40.09%)、十六烷(15.13%)。从海桐花挥发油中鉴定了 6 个化合物, 已鉴定成分峰面积占色谱总馏出峰面积的 100%, 主要成分为绿花白千层醇(60.33%)、肉豆蔻醚(17.40%)、喇叭茶醇(5.69%)。

广西产新鲜海桐叶、花挥发油主要成分为绿花白千层醇, 广西产新鲜海桐花挥发油含量及成分与河南产的差异很大。广西产新鲜海桐花挥发油含量较高, 得油率为 5.10%, 主要成分为绿花白千层醇(60.33%)、肉豆蔻醚(17.40%)、喇叭茶醇

(5.69%); 而河南产的新鲜海桐花挥发油含量较低, 得油率为 0.18%, 主要成分为 1R-蒎烯(22.16%)、壬烷(12.55%)、十一烷(8.25%)^[2]。这是由于挥发油成分与产地有关, 应加强对药物资源的研究, 建立统一质量控制标准。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 35(2): 6.
- [2] 李彩芳, 李昌勤, 袁王俊, 等. 海桐花蕾挥发油的 GC-MS 分析[J]. 河南大学学报: 医学版, 2006, 25(3): 13.

[责任编辑 顾雪竹]

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱 Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相以乙腈为流动相 A, 以水为流动相 B 按表 1 进行梯度洗脱; 柱温 27 (70 min 时降为 20); 检测波长 203 nm 流速 1.0 mL·min⁻¹, 理论塔板数都应不低于 10 000。

表 1 梯度洗脱曲线

时间 /min	水 /%	乙腈 /%
0 ~35	81	19
35 ~55	81 71	19 29
55 ~70	71	29
70 ~100	71 60	29 40

2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取三七皂苷 R₁ 对照品 53.24 mg、人参皂苷 Rg₁ 对照品 53.18 mg、人参皂苷 Rb₁ 对照品 42.61 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 含三七皂苷 R₁ 5.324 mg、人参皂苷 Rb₁ 5.318 mg、人参皂苷 Rg₁

4.261 mg 的混合溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品 1.990 7 g, 定, 置烧瓶中, 加甲醇 50 mL 回流 1 h, 放冷, 滤过, 用甲醇洗涤容器, 滤液并洗涤液至 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 从中精密吸取溶液 10 mL, 蒸干, 残渣加水溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 再从中精密吸取 1 mL, 装入已处理好的 D101 大孔树脂柱 (湿法装柱, 用水 100 mL 预洗, 内径 1.2 cm, 树脂装至高 14 cm), 先用 20% 乙醇 50 mL 洗脱, 洗脱液弃去, 继续用 70% 乙醇洗脱收集 100 mL, 蒸干, 残渣用甲醇转移至 2 mL 量瓶中^[2], 并稀释至刻度, 作为供试品溶液。

2.4 专属性考察试验 按处方比例制成三七阴性样品, 照 2.3 项下方法制备三七阴性对照溶液, 精密吸取 10 μL, 测定, 结果在三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 对照品相同保留时间位置上均未见干扰, 见图 1。

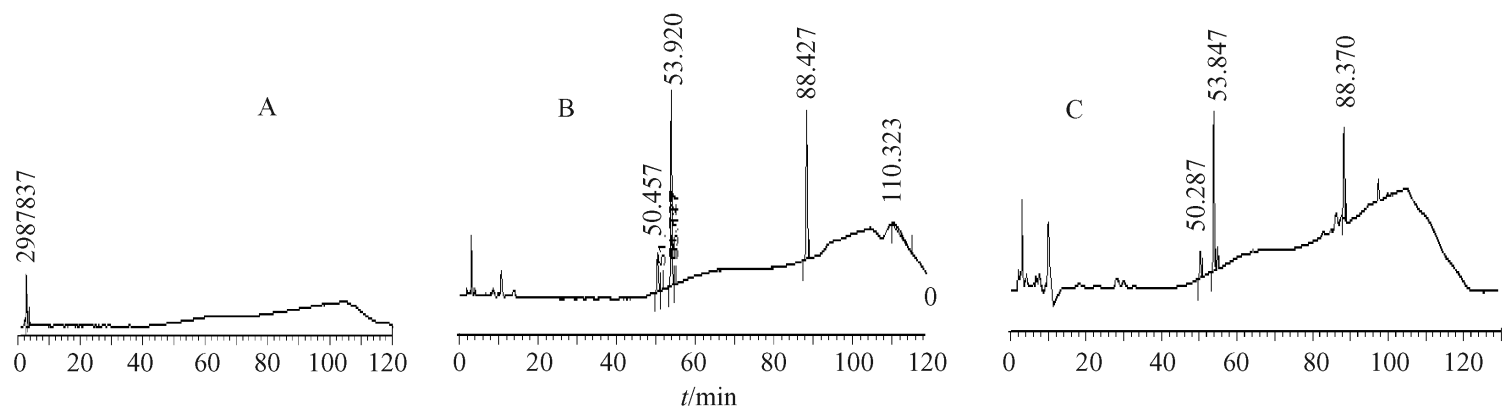


图 1 冠心丹参胶囊高效液相色谱图

A. 阴性样品; B. 对照品; C. 样品

2.5 线性范围的考察 精密吸取对照品溶液 10, 20, 30, 40, 60, 80 μL 进行测定, 按上述色谱条件测定峰面积, 并以峰面积 Y 对进样量 X 进行线性回归, 结果各成分的线性关系良好: 三七皂苷 R₁ 的回归方程为 $Y = 9E + 08X + 19\ 4981$, $r = 0.999\ 5$, 线性范围为 2.867 ~ 16.631 μg; 人参皂苷 Rg₁ 回归方程为 $Y = 1E + 09X + 560\ 483$, $r = 0.999\ 6$ 线性范围为 5.359 ~ 37.641 μg; 人参皂苷 Rb₁ 的回归方程为 $Y = 8E + 08X + 227\ 925$, $r = 0.999\ 8$, 线性范围为 5.401 ~ 35.732 μg。

2.6 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液 10 μL 重复进样 6 次, 测得峰面积积分值, 结果三七皂苷 R₁ 峰面积积分值 RSD 为 0.62%; 人参皂苷 Rg₁ 峰面积积分值 RSD 0.47%; 人参皂苷 Rb₁ 峰面积积分值 RSD 0.73%。结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取上述供试品溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定, 结果三七皂苷 R₁ 含量的 RSD 0.69%; 人参皂苷含量的 RSD 为 0.79%, 人参皂苷 Rb₁ 含量的 RSD 为 0.92%。结果表明样品在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批样品, 平行制备 6 份供试品溶液, 测得峰面积并计算含量, 结果三七皂苷 R₁ 含量的 RSD 为 1.34%; 人参皂苷 Rb₁ 含量的 RSD 为 1.27%; 人参皂苷 Rg₁ 含量的 RSD 为 1.43%。

2.9 回收率试验 精密称取已知含量的同一批样品 1.0 g, 分别精密加入一定量的三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 对照品, 按供试品溶液制备项下操作, 平行操作 6 份, 按 2.1 项下测定含量, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率测定结果

成分	No	取样量 /g	样品中含量 /mg	加入对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
三七皂苷 R ₁	1	0.987 1	5.30	4.24	9.495 8	98.96	99.74	0.46
	2	0.990 7	5.32	4.24	9.538 9	99.50		
	3	0.997 5	5.35	4.24	9.601 1	100.26		
	4	1.004 1	5.39	5.30	10.687 4	99.95		
	5	0.989 6	5.31	5.30	10.597 8	99.77		
	6	1.012 1	5.43	5.30	10.729 3	99.99		
人参皂苷 R _{g₁}	1	0.987 1	2.72	1.70	4.412 9	99.58	99.40	0.45
	2	0.990 7	2.72	1.70	4.408 9	99.34		
	3	0.997 5	2.75	1.70	4.443 7	99.63		
	4	1.004 0	2.76	2.65	5.397 8	99.54		
	5	0.989 6	2.72	2.65	5.364 0	99.77		
	6	1.012 1	2.79	2.65	5.401 2	98.54		
人参皂苷 R _{b₁}	1	0.995 3	2.10	0.29	2.390 2	100.07	101.40	1.03
	2	0.997 0	2.10	0.29	2.393 7	101.28		
	3	0.998 2	2.10	0.29	2.396 2	102.14		
	4	0.994 5	2.10	0.36	2.461 4	100.39		
	5	0.987 3	2.08	0.36	2.446 2	101.72		
	6	0.965 4	2.03	0.36	2.400 1	102.81		

2.10 样品测定 取 3 批样品,按 2.3 项下方法制得供试品溶液。分别吸取上述对照品溶液各 10 μL,依次注入液相色谱仪,按 2.1 项下条件测定,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(n=3) mg/粒

批号	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{b₁}	人参皂苷 R _{g₁}
080110	1.61	0.63	0.83
080111	1.72	0.60	0.79
080112	1.58	0.66	0.78

3 讨论

本实验曾考察过样品的不同提取方法,分别采用超声提取法、直接回流提取法、索氏提取法对样品进行 1,2,3,4 h 的提取。结果表明采用索氏提取的方法对样品进行 2 h 提取,已能将样品中的三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁} 最大程度的提取出来。

用水,20%乙醇,70%乙醇洗脱。20%乙醇溶液能将丹参酚酸全洗脱下来,70%乙醇洗脱液中,丹参酚酸对三七皂苷测定不造成干扰,表明此方法可行,

能将丹参酚酸与三七总皂苷分离。

大孔吸附树脂具有很好的吸附性能,理化性质稳定,不受无机盐类离子低分子化合物存在的影响,对有机物选择性较好,可以通过物理吸附从水溶液中有选择地吸附有机物质。利用大孔树脂的多孔结构和选择性吸附功能,可以从中药提取液中分离精制有效成分或有效部位,最大限度地去粗取精。

本实验通过线性关系、精密度、稳定性、重复性和加样回收率实验及样品测定结果考察,表明本方法可以有效的对其含量进行测定,用高效液相色谱法对处理过的样品进行含量测定,结果杂质峰较少,分离效果较好。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:10.
- [2] 魏惠珍,张洁.冠心丹参片有效部位三七总皂苷的含量测定[J].时珍国医国药,2008,19(12):2859.

[责任编辑 顾雪竹]