

HPLC 法测定参苓白术颗粒中人参皂苷的含量

周 芳*

(石家庄市糖尿病研究院, 河北 石家庄 050011)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 法测定参苓白术颗粒中人参皂苷的含量。方法: 采用色谱柱: J'sphere ODS-H80, 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸溶液 (19.5: 80.5), 以人参皂苷为对照品, 检测波长 203nm。结果: 人参皂苷 R_{g1} 在 1.04~ 5.24 μ g、人参皂苷 Re 在 0.48~ 2.44 μ g 范围内线性良好。人参皂苷 R_{g1} 平均回收率 98.29%, RSD 为 2.63%; 人参皂苷 Re 平均回收率 98.17%, RSD 为 1.82%。结论: 该方法准确、灵敏, 可用于参苓白术颗粒的质量控制。

[关键词] 人参皂苷; 参苓白术颗粒; HPLC; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)02-0016-02

参苓白术颗粒是由人参、白术(炒)、茯苓等中药组成, 具有补脾胃, 益肺气的功效, 用于脾胃虚弱, 食少便溏, 气短咳嗽, 肢倦乏力。人参为本方中君药, 人参皂苷 R_{g1}、Re 为其所含主要活性成分之一, 故选择测定人参皂苷 R_{g1} 和 Re 的总量作为参苓白术颗粒的质量控制指标。参照 2000 年版药典一部第 6 页人参[含量测定]项下的方法^[1], 进行了方法学的研究, 从而制定了正文中高效液相色谱法的含量测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 HP1100 高效液相色谱仪, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315A 二极管矩阵检测器, HPCHEM 色谱工作站。

色谱柱: J'sphere ODS-H80 (4.6mm \times 150mm), 4 μ m。

1.2 试剂 甲醇: 色谱纯(天津四友); 乙醇: 分析纯(北京化工厂); 对照品: 人参皂苷 R_{g1} (Ginsenoside R_{g1} 703-9408), Re (Ginsenoside Re 0754-9809) 均由中国药品生物制品检定所提供, 纯度为 98% 以上。

样品来源: 参苓白术颗粒自制, 批号 030912、030915、030917。

2 实验方法与结果

2.1 色谱分析条件选择

2.1.1 流动相 参考文献^[1]曾选用色谱条件为乙腈-0.05% 磷酸溶液 (99: 400)、(20: 80), 最后选定乙

腈-0.05% 磷酸溶液 (19.5: 80.5) 为流动相, 分离效果好, 与其它成分无干扰。波长: 203nm, 流速: 1.0mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 理论板数按人参皂苷 R_{g1} 峰计算应不低于 3000。

2.1.2 检测波长的选择 取人参皂苷 R_{g1}、Re 对照品溶液, 在 200~ 375nm 范围内扫描, 结果在 203nm 处有最大吸收, 故选择 203nm 为检测波长。

2.1.3 样品溶液的净化 本制剂为复方制剂, 样品经甲醇提取, 正丁醇萃取后直接进行高效液相层析, 干扰成分较多, 因此采用大孔树脂柱进行净化。净化时先用水洗脱, 每 30mL 收集一份; 再用 70% 乙醇洗脱, 每 50mL 收集一份, 用高效液相色谱仪检查, 结果用水 100mL 可将大部分干扰杂质除去, 用 70% 乙醇 100mL 可将人参皂苷 R_{g1}、Re 洗脱完全。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 110 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的人参皂苷 R_{g1}、Re 对照品适量, 加甲醇制成每 1mL 含人参皂苷 R_{g1} 0.5mg、人参皂苷 Re 0.2mg 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 14g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 100mL, 密塞, 称定重量, 加热回流提取 3 小时, 放置至室温, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 50mL, 蒸干, 残渣加 10% 氢氧化钠溶液 5mL 使溶解, 加水 25mL, 并转移至分液漏斗中, 用水饱和正丁醇提取 4 次, 每次 30mL, 合并正丁醇, 以水反洗 2 次, 每次 50mL, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加水 2mL 使溶解, 通过 D101 型大孔吸附树脂柱 (内径 1.5cm, 长 10cm) 上。先以水 100mL 洗脱, 弃去水液,

[收稿日期] 2005-03-16

[通讯作者] 周芳, Tel: (0311) 83090610

再以 70% 乙醇 100mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣以甲醇溶解并转移至 5mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μ m) 滤过, 即得。

2.4 空白试验 空白溶液的制备: 按处方中药味比例, 自配不含人参的群药, 按其工艺制成空白制剂, 再按供试品溶液制备方法制备并测定, 结果空白溶液在与人参皂苷 R_{g1}、Re 对照品相同保留时间处未见明显色谱峰, 故认为无干扰。

2.5 线性关系考察 取干燥至恒重的人参皂苷 R_{g1}、Re 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1mL 含人参皂苷 R_{g1} 0.52mg、人参皂苷 Re 0.24 的混合溶液。分别精密吸取 2、4、6、8、10 μ L 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以对照品进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 人参皂苷 R_{g1} 在 1.04~5.2 μ g、人参皂苷 Re 在 0.48~2.4 μ g 范围内线性良好。其回归方程为人参皂苷 R_{g1} $Y = -0.649 + 346.856X$, $r = 0.9996$; 人参皂苷 Re $Y = -10.542 + 341.266X$, $r = 0.9997$ 。

2.6 精密度试验 取同一批样品(批号 030912) 按

正文方法制成供试品溶液, 精密吸取同一供试品溶液, 在所确定的 HPLC 条件下, 进样 10 μ L, 重复进样 5 次, 求得人参皂苷 R_{g1}、Re 峰面积相对标准偏差 < 3%, 分别为 1.95%、2.65%。

2.7 稳定性试验 取同一批样品(批号 030912) 按正文方法制成供试品溶液, 精密吸取同一供试品溶液 10 μ L, 分别于配制后 0、1、2、4、6、24h, 依法测定, 结果人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re 的 RSD 分别为 1.80%、2.83%, 表明供试品溶液在 24h 内基本稳定。

2.8 重复性试验 按上述方法, 对同一批样品(批号 030912) 5 份, 在所确定的 HPLC 条件下进行测定, 结果人参皂苷 R_{g1}、Re 的相对标准偏差为 1.77%, 说明方法重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法, 精密称取已知含量同一批号的样品(批号 030912, 人参皂苷 R_{g1} 含量 0.20mg/g、人参皂苷 Re 含量 0.07mg/g), 分别精密加入人参皂苷 R_{g1} 对照品、人参皂苷 Re 对照品, 按正文供试品溶液的制备方法制备并按上述色谱条件, 测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 人参皂苷 R_{g1}、Re 回收率试验

人参皂苷	样品取样量 (g)	样品中人参皂苷的含量(mg)	加入人参皂苷的量(mg)	测出人参皂苷的量(mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
Re	7.5326	0.5275	0.80	1.2889	95.21	98.17	1.82
	7.5215	0.5265	0.65	1.1756	99.86		
	8.7215	0.6105	0.95	1.5518	99.08		
	8.6825	0.6077	0.95	1.5452	98.68		
	8.6325	0.6042	0.85	1.4373	98.01		
R _{g1}	7.5326	1.5065	1.80	3.2222	95.31	98.29	2.63
	7.5215	1.5043	1.60	3.0797	98.46		
	8.7215	1.7443	2.20	3.9307	99.38		
	8.6825	1.7365	2.20	3.9789	101.92		
	8.6325	1.7265	2.20	3.8472	96.39		

3 样品测定结果

分别精密称取不同批号的参苓白术颗粒, 按供试品溶液制备法制备。分别精密吸取对照品溶液 5 μ L, 供试品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 结果三批样品中人参皂苷 R_{g1}、Re 总量平均值分别为 269.85、273.12、283.45 μ g/g。

4 讨论

参考文献^[1]曾选用色谱条件为乙腈-0.05% 磷酸溶液(99:400)、(20:80), 最后选定乙腈-0.05% 磷酸溶液(19.5:80.5)为流动相, 分离效果好, 而与其它

成分无干扰。

本制剂为复方制剂, 样品经甲醇提取, 正丁醇萃取后直接进行高效液相层析, 干扰成分较多, 因此采用大孔树脂柱进行净化。

上述分析方法精确度高, 重现性好, 简便, 准确, 可作为该制剂的含量测定方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2000. 6-7.