

回归方程: $Y = 5\,708\,662X - 22\,727$, $r = 0.999\,8$ 。结果表明异秦皮啶在 $0.040\,8 \sim 0.408\,0\,\mu\text{g}$ 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验: 精密吸取同一份 $0.024\,\text{mg/mL}$ 异秦皮啶对照品溶液 $10\,\mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 测定异秦皮啶峰面积, 结果其 RSD 为 0.89% ($n = 6$)。

2.6 重现性试验: 精密称取同一批号 (批号 20000102) 样品 5 份, 按上述方法制成供试品溶液, 分别进样, 测定异秦皮啶峰面积, 结果其 RSD 为 2.4% ($n = 5$)。

2.7 稳定性试验: 取同一份 $0.024\,\text{mg/mL}$ 异秦皮啶对照品溶液, 放置 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h 后测定异秦皮啶峰面积, 结果其 RSD 为 1.46% ($n = 9$)。

2.8 回收率试验: 取同一批号 (批号 20000102) 样品 5 份适量, 精密加入 $0.4\,\text{mg/mL}$ 异秦皮啶对照品溶液 $1.0\,\text{mL}$, 制备供试品溶液, 分别进样测定, 计算回收率。结果平均回收率为 100.6% , RSD 为 2.89% ($n = 5$)。

2.9 样品测定: 取 10 个批号的样品依 2.3 项下方法制成供试品溶液, 精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 $10\,\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 按外标法计算异秦皮啶的含量, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 异秦皮啶即 7-羟基-6, 8-二甲氧基香豆素, 其本身具有一定的升华性。因此, 本实验在对样品处理过程中, 温度尽可能低, 将误差减少至最小。

表 1 强力宁片中异秦皮啶的含量测定结果 ($n = 3$)

批号	异秦皮啶含量 /($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$)	批号	异秦皮啶含量 /($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$)
20000101	0.245	20000106	0.243
20000102	0.224	20000107	0.235
20000103	0.216	20000108	0.210
20000104	0.258	20000109	0.232
20000105	0.205	20000110	0.229

3.2 本实验分别对提取溶剂 (甲醇、氯仿、乙醚)、提取方式 (索氏提取、超声提取) 和提取时间 (15, 30, 45, 60 min) 进行优选, 结果用氯仿作溶剂, 超声提取 45 min 效果最佳。

3.3 本实验以甲酸作为扫尾剂, 比较了加入不同浓度的甲酸 (0.01% , 0.02% , 0.05% , 0.1% , 0.5% , 1%) 对色谱峰形的影响。结果当甲酸浓度为 0.02% 和 0.05% 时, 得到了峰形很好的色谱峰, 以后随着甲酸浓度的再增加, 色谱峰形没有太大改变, 为保护色谱柱, 延长其使用寿命, 使用 0.02% 甲酸。

References

- [1] Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Health, P. R. China (中华人民共和国卫生部药品标准) [S]. WS3-B-2052-95. 1995.
- [2] Wang JM, Wang HP, Song J, et al. Determination of isofraxidin in Lian Oral Liquid by TLC scanning [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 1996, 2(4): 5-6.
- [3] Zhao XJ, Wang LM, Zhang M, et al. Determination of isofraxidin in Ciwujia extract by HPLC [J]. Chin J Food Health (中国食品卫生杂志), 1998, 10(5): 16-17.
- [4] Qiao F, Zhao QB, Lu SQ, et al. Determination of isofraxidin in Ciwujia preparation by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2000, 20(3): 168-169.

HPLC 法分离与检测 20(S)-人参皂苷 Rg_3 和 20(R)-人参皂苷 Rg_3

汤明辉^{1,2}, 姜志宏², 赵中振², 张钧寿^{1*}

(1. 中国药科大学 药剂教研室, 江苏 南京 210009; 2. 香港浸会大学中医药学院, 香港)

20(R)-人参皂苷 Rg_3 是我国 21 世纪批准的第一个中药单体新药, 拥有完全自主知识产权。实验与临床研究表明, 人参皂苷 Rg_3 具有抑制肿瘤细胞的增殖、浸润, 对抗肿瘤细胞的转移, 促进肿瘤细胞凋亡, 提高机体免疫能力等作用^[1]。目前对于 20(S)-人参皂苷 Rg_3 和 20(R)-人参皂苷 Rg_3 的抗肿瘤作用和两种构型的效价差别, 尚没有进行系统的比较和研究。因此, 能同时检测和分离 20(S)-人参皂苷

Rg_3 和 20(R)-人参皂苷 Rg_3 的分析方法, 对保证和稳定药品的质量具有重要意义。通过反复的试验和摸索, 本实验建立了 HPLC 法梯度洗脱分离样品中的 20(S)-人参皂苷 Rg_3 和 20(R)-人参皂苷 Rg_3 , 同时以二极管阵列检测器定量测定其含量。

1 仪器与试剂

Hewlett Packard Agilent 1100 HPLC 系统, 含在线真空脱气机, 高压四元梯度泵, 二极管阵列检测

器(DAD), HP Chem station for LC Rev. A. 06 03 (509); Themolyne DriBath with Techne Sample Concentrato (USA)。

20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 和 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 对照品(自制, 经光谱学鉴定), 红参(经香港浸会大学赵中振博士鉴定), 参一胶囊(吉林亚泰制药有限公司, 批号: 20020915, 20020718)。甲醇(色谱纯), 蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备: 取 105 °C 干燥至恒重的 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 对照品约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 微热使溶解, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 模拟供试品溶液的制备: 取 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 和 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 对照品适量, 置同一量瓶中, 加甲醇溶解, 并稀释至刻度, 备用。

2.3 红参供试品溶液的制备^[2]: 称取红参粉末 2 g, 精密称定, 加甲醇适量, 加热回流 6 h, 滤过, 挥干溶剂, 残渣溶解于 10 mL 蒸馏水中, 用 6 mL 二氯甲烷萃取, 水层继续用水饱和的正丁醇萃取 3 次(8, 5, 3 mL), 合并正丁醇层, 氮气吹干溶剂, 加甲醇溶解, 并定容至 2 mL, 备用。

2.4 参一胶囊供试品溶液的制备: 取参一胶囊内容

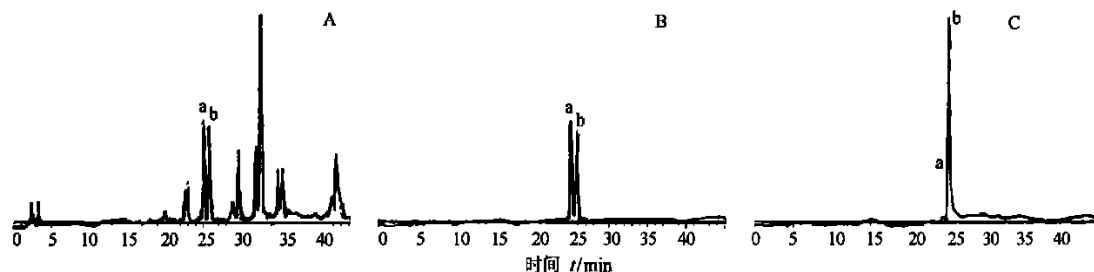
物约 10 mg, 精密称定, 加甲醇 10 mL, 超声波提取 3 次, 每次 15 min, 合并滤液, 挥干溶剂, 加甲醇溶解, 并定容至 5 mL, 备用。

2.5 液相色谱条件及分析方法^[2~4]: 色谱柱: Zorbax LC-18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 检测波长: 203 nm; 检测器: DAD 检测器; 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL/min; 流动相: 乙腈(A)-0.01% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~10 min, A:B (15:85), 10~25 min, A:B (35:65), 25~40 min, A:B (50:50), 40 min 以后, A:B (85:15)。取供试品溶液 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 进行测定。

2.6 线性关系的考察: 精密吸取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别用甲醇稀释至 1 mL, 摇匀, 得不同浓度的对照品溶液。依次进样 20 μ L, 以对照品量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y = -66.6 + 393.05X$, $r = 0.9998$ 。20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 在 4~20 μ g 峰面积与进样量呈良好线性关系。

2.7 试验结果: 模拟供试品溶液、红参供试品溶液及参一胶囊供试品溶液的高效液相色谱图见图 1。

2.8 精密度试验: 取同一供试品溶液, 连续进样 7 次, 每次 20 μ L, 依法测定, 结果人参皂苷 R_{g_3} 峰面积值 RSD 为 1.44% ($n = 7$)。



a-20(S)-人参皂苷 R_{g_3} b-20(R)-人参皂苷 R_{g_3}
a-20(S)-ginsenoside R_{g_3} b-20(R)-ginsenoside R_{g_3}

图1 红参(A)、模拟供试品(B)和参一胶囊(C)的HPLC图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of Hongshen (A), simulated solution (B), and Shenyi Capsula (C)

2.9 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 每隔 4 h 进样, 依法测定, 人参皂苷 R_{g_3} 峰面积值的 RSD 为 1.39% ($n = 7$)。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 重现性试验: 精密称取同一批号样品 5 份, 依法制备供试品溶液, 并测定样品中 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 含量。结果 5 次测定的 RSD 为 1.49%, 表明方法重现性良好。

3 讨论

3.1 从图 1 可见, 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 和 20(R)-

人参皂苷 R_{g_3} 在本色谱条件下能达到基线分离, 其分离时间在 25~26 min, 且 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 出峰较早, 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 出峰较晚。用梯度洗脱法得到的 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 和 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 的 HPLC 图谱, 分离度好, 重现性高, 可作为鉴别人参皂苷 R_{g_3} 顺反结构和质量控制的依据, 同时也为手性拆分这两种异构体提供了参考。

3.2 红参供试品中检出人参皂苷 R_{g_3} , 其中 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 和 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 峰高和峰面积基本相当, 两者含量接近于 1:1。据文献报道^[1],

20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 抗肿瘤活性强于 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} , 因此可以考虑采用适当的方法和手段, 使 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 构型转化为 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 构型, 以提高活性更强的 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 的产率。

试验结果还显示, 参一胶囊中主要含有 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} , 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 构型含量很低, 主成分含量达标示量的 95% 以上, 能完全保证产品的质量。

3.3 试验中曾使用了乙腈-异丙醇-水, 乙腈-水-醋酸等多种不同的流动相组分和配比, 均未实现 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 和 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} 的基线分离, 最后在乙腈-水系统中加入 0.01% 磷酸, 获得较好的分离效果。

本色谱分离系统采用 DAD 为检测器, 以乙腈-

0.01% 磷酸水溶液作梯度洗脱, 在 203 nm 处测定 20(S)-人参皂苷 R_{g_3} 和 20(R)-人参皂苷 R_{g_3} , 避免了溶剂末端吸收的影响, 但检测限较高; 若能将该分离系统结合通用检测器 ELSD, 则既可提高检测灵敏度, 又可达到基线分离的目的。

References:

- [1] Zhao Y. Advance in studies on anticarcinogenic effects of 20(R)-ginsenoside R_{g_3} [J]. *Chin Clin Oncology* (临床肿瘤学杂志), 2001, 6(1): 81-82.
- [2] Kwon SW, Han SB, Park IH, *et al* Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 921: 335-339.
- [3] Jeong S I, Kim C S, Lee Y G, *et al* Separation of 20(R) and 20(S) prosapogenin isomers of ginsenoside- R_{g_2} and- R_{g_3} from ginseng saponins by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Anal Sci*, 1998, 11(5): 404-408.
- [4] Park M K, Park J H, Han S B, *et al* High-performance liquid-chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light-scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 736(1-2): 77-81.

金芍抗病毒胶囊中绿原酸及总酚酸的含量测定

茅仁刚¹, 林东昊¹, 陶建生², 胡 岗^{1*}

(1. 上海师范大学, 上海 200234; 2. 上海中医药大学, 上海 200032)

金芍抗病毒胶囊由金银花、赤芍、柴胡等组成, 是采用大孔树脂精制工艺制备的现代中药复方制剂, 具有较显著的抗病毒活性, 适用于病毒性感冒的治疗。金银花为方中君药, 绿原酸是其中的主要活性成分。本实验采用 RP-HPLC 和紫外分光光度法分别对制剂中的绿原酸和总酚酸进行了定量分析。

1 仪器与材料

日本岛津 UV-2401PC 紫外-可见分光光度计; 日本岛津 LC-6A 型高效液相色谱仪, SPD-6A V 紫外检测器, CR-4A 数据处理器。

绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0753-200111), 乙腈、甲醇为色谱纯, 盐酸为分析纯。金芍抗病毒胶囊由本实验室自行制备。

2 方法与结果

2.1 绿原酸的 HPLC 法含量测定

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: Luna C₁₈ ODS (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (18:82, 以 H₃PO₄ 调节 pH 2); 检测波长: 327 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备: 精密称取绿原酸对照品 2.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用 0.05 mol/L 盐酸溶解, 定容。临用前过 0.45 μm 滤膜, 续滤液作为绿原酸对照品溶液 (100 μg/mL)。

2.1.3 供试品溶液的制备: 取金芍抗病毒胶囊 10 粒, 倾出内容物, 混匀, 精密称取 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 0.05 mol/L 盐酸, 超声 30 min 使溶解, 定容。临用前过 0.45 μm 滤膜, 续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察: 取绿原酸对照品溶液, 依次配制成浓度为 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg/mL 的溶液, 分别取上述溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 在上述色谱条件下进行色谱分析。以对照品溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制绿原酸的标准工作曲线, 得线性回归方程为 $Y = 1.621 \cdot 1X - 767.3$, $r = 0.9999$ 。绿原酸在 5~100 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验: 精密吸取绿原酸对照品溶液 (60 μg/mL), 连续进样 5 次, 每次 20 μL, 按上述色

* 收稿日期: 2003-05-13

作者简介: 茅仁刚(1968—), 男, 硕士, 工程师, 执业药师, 现任上海师范大学新康制药厂技术副厂长, 主要从事中药、天然产物活性成分和制剂研究。Tel: (021) 64322290 E-mail: rgnao@eastday.com