

HPLC-ELSD 法测定疲王颗粒中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁

涂 禾¹, 李 希², 冯建安², 冯光富¹

1. 四川省骨科医院, 四川 成都 610041

2. 四川省中医药科学院中医研究所, 四川 成都 610041

摘要: 目的 建立疲王颗粒中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的定量测定方法。方法 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测 (HPLC-ELSD) 法, 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~20 min, 20% 乙腈; 20~35 min, 20%~30% 乙腈; 35~55 min, 30% 乙腈; 55~56 min, 30%~45% 乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25 ℃; ELSD 漂移管温度 100 ℃, 气体流量 3 L/min。结果 人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的线性范围分别为 125.44~470.40 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、88.96~333.60 μg/mL ($r=0.999\ 2$)、157.12~589.20 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 其平均加样回收率分别为 100.27% (RSD 为 1.713%, $n=9$)、101.29% (RSD 为 1.220%, $n=9$)、101.00% (RSD 为 1.668%, $n=9$)。结论 该方法测定简便、快速、重复性好, 可作为疲王颗粒的质量控制方法。

关键词: 疲王颗粒; 高效液相色谱-蒸发光散射检测法; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)17-2487-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.012

Determination of ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁ in Piwang Granules by HPLC-ELSD

TU He¹, LI Xi², FENG Jian-an², FENG Guang-fu¹

1. Sichuan Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicines, Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish a method for the content determination of ginsenoside Rg₁, Re, and Rb₁ in Piwang Granules. **Methods** HPLC-ELSD was used. The analysis was carried on Shim-pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water, and the gradient elution (0—20 min, acetonitrile 20%, 20—35 min, acetonitrile 20%→30%, 35—55 min, acetonitrile 30%, 55—56 min, acetonitrile 30%→45%) was used. The flow rate was 0.8 mL/min. The column temperature was 25 ℃. The drift tube temperature was 100 ℃. The flow rate of gas was 3 L/min. **Results** The responses of ginsenoside Rg₁, Re, and Rb₁ were liner in the ranges of 125.44—470.40 ($r=0.999\ 6$), 88.96—333.60 ($r=0.999\ 2$), and 157.12—589.20 μg/mL ($r=0.999\ 5$), respectively. The average recoveries were 100.27% (RSD = 1.713%, $n=9$), 101.29% (RSD = 1.220%, $n=9$), and 101.00% (RSD = 1.668%, $n=9$). **Conclusion** The method is simple, rapid, and with good repeatability. It can be used for the quality control of Piwang Granules.

Key words: Piwang Granules; HPLC-ELSD; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁

疲王颗粒具有健脾益气、生血的功效, 主要用人参、黄芪、葛根、延胡索、白芍、川芎、川牛膝等 11 味中药组成, 用于运动员连续大运动量训练后引起的气、血虚的运动性疲劳症。人参为方中君药, 在质量标准研究中需对人参中指标成分人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 进行定量测定。由于人参定量测定常用的高效液相色谱-紫外检测 (HPLC-UV) 法^[1-3],

样品中黄芪和人参同时存在时会相互干扰, 故本实验选择高效液相色谱-蒸发光散射检测 (HPLC-ELSD) 法测定疲王颗粒中的 3 种人参皂苷的量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; BP211D 电子天平, 德国赛多利斯集团; ELSD—500 蒸发光散射检测器, 美国奥泰公司; CQ—250 超声

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (奥运专项 中药消除运动性疲劳的应用研究 2002BA904B03)

作者简介: 涂 禾 (1965—), 男, 副主任中药师, 研究方向为中药制剂、医院药事管理和临床药学。

Tel/Fax: (028)87050716 E-mail: 297983480@qq.com

液清洗器, 中国船舶重工集团公司七院第七二六研究所。

人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 对照品 (供定量测定用, 由中国食品药品检定研究院提供, 人参皂苷 Rg_1 批号为 110703-201027, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$; 人参皂苷 Re 批号为 110754-201123, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$; 人参皂苷 Rb_1 批号为 110704-200921, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$); 乙腈为色谱纯、水为超纯水 (自制), 其他试剂均为分析纯。

疲王颗粒样品 (四川省骨科医院自制), 批号分别为 110201、110401、110402、110403、120301、120302、120303。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack VP-ODS 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 保护柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (12.5 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱: 0~20 min, 20%乙腈; 20~35 min, 20%~30%乙腈; 35~55 min, 30%乙腈; 55~56 min, 30%~45%乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; ELSD 漂移管温度 100 $^{\circ}$ C, 气体流量 3 L/min。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 取本品约 4.5 g, 精密称定, 加入甲醇 100 mL, 超声处理 45 min, 滤过, 用甲醇 50 mL 分次洗涤滤纸和容器, 合并滤液与洗液, 蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用水饱和的正丁醇强烈振摇提取 4 次 (30、30、30、20 mL), 合并正丁醇提取液, 用 40%氨水洗涤 3 次, 每次 30 mL, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得^[4-8]。

2.2.2 阴性对照溶液 按本品制法, 去处方中人参, 制成缺人参的阴性样品, 按“供试品溶液”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.3 对照品溶液 精密称取人参皂苷 Rg_1 对照品 7.84 mg、人参皂苷 Re 对照品 5.56 mg、人参皂苷 Rb_1 对照品 9.82 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并加甲醇至刻度, 即得含人参皂苷 Rg_1 0.784 mg/mL、人参皂苷 Re 0.556 mg/mL、人参皂苷 Rb_1 0.982 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 专属性试验

分别取混合对照品、供试品及阴性对照溶液,

注入高效液相色谱仪, 按照“2.1”项色谱条件, 在同一条件下测定, 结果见图 1。阴性对照在人参皂苷出峰区间未出现相应色谱峰, 表明该测定方法具有较好的专属性, 测定无干扰。

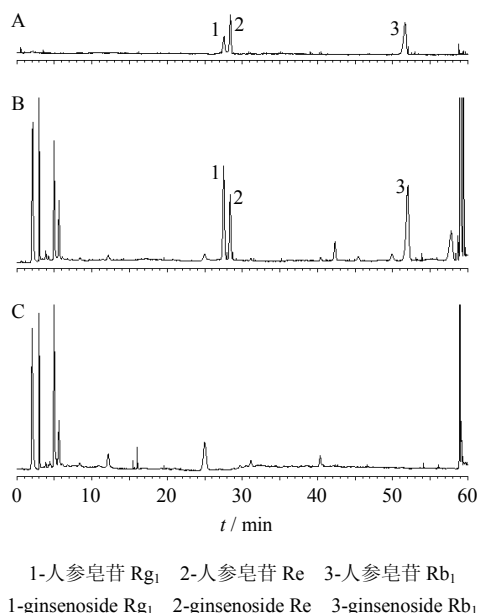


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性对照 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), sample (B), and negative control (C)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.3”项下的对照品溶液 0.8、1.2、1.6、2.0、3.0 mL 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 各精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪, 按照“2.1”项色谱条件, 测定峰面积, 以进样浓度的常用对数为横坐标 (X), 峰面积的常用对数为纵坐标 (Y) 进行线性回归处理, 得到人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的回归方程分别为 $Y=1.7225X+5.0828$, $r=0.9996$; $Y=1.5512X+5.1312$, $r=0.9992$; $Y=1.9635X+4.9533$, $r=0.9995$ 。结果表明, 人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的进样浓度分别在 125.44~470.40 μ g/mL、88.96~333.60 μ g/mL、157.12~589.20 μ g/mL 对数值与峰面积的对数值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μ L, 连续重复进样 6 次, 测定峰面积。结果人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的峰面积的 RSD 值分别为 1.608%、1.882%、1.135%。

精密吸取供试品溶液 10 μL ，连续重复进样 6 次，测定峰面积。结果人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 的峰面积的 RSD 值分别为 1.506%、1.218%、1.762%。

2.6 稳定性考察

精密吸取同一供试品（批号 110201）溶液，分别在 0、4、8、16、24、48 h，测定人参皂苷峰面积，结果人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 的峰面积的 RSD 值分别为 1.595%、1.696%、1.756%。结果表明在 48 h 内供试品溶液中人参皂苷的量基本稳定。

2.7 重复性考察

取同一批号供试品（批号 110201）6 份，分别按“2.2.1”项供试品溶液制备方法平行制备 6 个供试品溶液，在上述色谱条件下分别进样测定。结果人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 质量分数平均值分别为 0.708 3、0.507 9、0.927 9 mg/g，RSD 值分别为 1.171%、1.628%、1.765%，表明测定方法有较好的重复性。

2.8 回收率试验

精密称取已测定的供试品（批号 110201，人参皂苷 Rg_1 0.708 3 mg/g、人参皂苷 Re 0.507 88 mg/g、人参皂苷 Rb_1 0.927 94 mg/g）约 2.5 g，加入人参皂苷对照品适量，分别按“2.2.1”项下平行制备 9 个供试品溶液，在上述色谱条件下分别进样测定。结果平均回收率人参皂苷 Rg_1 为 100.27%，RSD 为 1.713%；人参皂苷 Re 为 101.29%，RSD 为 1.220%；人参皂苷 Rb_1 为 101.00%，RSD 为 1.668%。结果表明，用本法测定供试品中人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 的量，回收率良好。

2.9 样品测定

取 6 批中试产品（批号 110401、110402、110403、120301、120302、120303），按上述定量测定方法测定，结果见表 1。

3 讨论

因疲王颗粒剂组方复杂，若选择 HPLC-UV 法，人参皂苷测定要用较低的紫外检测波长（203 nm）检测，因是紫外末端吸收，黄芪中的黄芪甲苷及杂质会产生干扰。ELSD 检测器对不挥发性的物质进行检测，不存在紫外末端吸收问题，且对流动相的变化不敏感。本法能够进行人参中的 3 种皂苷的定量测定。

表 1 样品中人参皂苷定量测定结果 ($n = 2$)

Table 1 Determination of ginsenoside content in samples ($n = 2$)

批号	质量分数 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb_1
110401	0.718 0	0.541 4	0.934 2
110402	0.715 5	0.560 1	0.917 2
110403	0.682 5	0.533 9	0.897 4
120301	0.700 8	0.519 6	0.929 2
120302	0.690 8	0.506 8	0.926 4
120303	0.717 5	0.531 9	0.936 2

由于组方的复杂性对样品提取方法（超声提取和索氏提取）比较，2 种方法的结果差异不大，故选择了操作简便的超声提取法；在超声时间（30、45、60 min）的选择中，选择了 45 min；同时还对水饱和正丁醇次数（3、4 次）进行考察，振摇提取 3 次与 4 次的结果差异不大，为了确保提取完全，故选用提取 4 次。

参考文献

- [1] 黄秋妹, 曹智启, 丁沐淦. HPLC-ELSD 测定心可舒胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(8): 770-773.
- [2] 潘小华. 气生颗粒中人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 的含量测定 [J]. 中国药业, 2006, 15(12): 12-13.
- [3] 姚 静, 张春椿, 俞 冰. HPLC 同时测定参附汤中人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 含量的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(4): 788-790.
- [4] 苑雅萍, 李云涛, 郭佳超. HPLC 测定参芪颗粒中人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 74-75.
- [5] 陈繁华, 曾玉梅, 邬伟魁, 等. UFLC 法测定复方丹参片中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 及 Rb_1 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 260-262.
- [6] 丘明明. HPLC-ELSD 法测定三七血伤宁胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 629-632.
- [7] 黄海欣. 舒胸片中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 的含量测定 [J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(1): 65-67.
- [8] 曹树萍, 聂黎行. HPLC 法同时测定参麦注射液 9 个人参皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 476-478.