

HPLC法测定健脑补肾丸中人参皂苷Rg₁和Re的含量

冯家龙*(聊城市药品检验所,山东聊城 252000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)04-0374-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.04.29

摘要 目的:建立测定健脑补肾丸中人参皂苷Rg₁和Re含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent C₁₈柱,流动相为乙腈-水梯度洗脱,检测波长为203 nm,柱温为30 ℃,流速为1.0 ml/min,进样量为10 μl。结果:人参皂苷Rg₁和Re进样量分别在0.903~6.02、0.618~4.12 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 6$ 、 $0.999\ 7$);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.3%;人参皂苷Rg₁和Re的平均加样回收率分别为98.3%(RSD=1.63%, $n=6$)和98.1%(RSD=1.27%, $n=6$)。结论:该方法灵敏度高、操作简便、结果准确,可用于健脑补肾丸的质量控制。

关键词 健脑补肾丸;高效液相色谱法;人参皂苷Rg₁;人参皂苷Re

Content Determination of Ginsenoside Rg₁ and Ginsenoside Re in Jiannao Bushen Pills by HPLC

FENG Jia-long(Liaocheng Institute for Drug Control, Shandong Liaocheng 252000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Re in Jiannao bushen pills. METHODS: HPLC method was employed. The chromatographic column was Agilent C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 203 nm, and the column temperature was 30 ℃. The injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range were 0.903-6.02 μg for ginsenoside Rg₁ ($r=0.999\ 6$) and 0.618-4.12 μg for ginsenoside Re ($r=0.999\ 7$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.3%. The average recoveries of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Re were 98.3% (RSD=1.63%, $n=6$) and 98.1% (RSD=1.27%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and accurate, and can be used to control the quality of Jiannao bushen pills.

KEYWORDS Jiannao bushen pills; HPLC; Ginsenoside Rg₁; Ginsenoside Re

3.3 流动相的选择

本试验在对胃苏颗粒成分的研究中发现柚皮苷峰后面还有2个色谱峰,并通过与对照品进行比对发现为橙皮苷和新橙皮苷。进而经分析确认,3个色谱峰的理论板数及分离度均达到了试验要求,柚皮苷峰与前、后色谱峰可完全分离。因此,本方法沿用了原流动相系统,仅对保留时间作了延长。

综上所述,本方法简便、准确、重复性好,适用于测定胃苏颗粒中3种黄酮苷类成分的含量。

参考文献

[1] 马全明.胃苏颗粒治疗胆汁反流性胃炎疗效观察[J].上海中医药杂志,2009,43(11):47.
[2] 唐小宾,邹娅琦.胃苏颗粒+奥美拉唑+阿莫西林用于老年慢性胃炎治疗效果观察[J].中国伤残医学,2013,21(5):197.
[3] 卫永琪.胃苏颗粒治疗幽门螺杆菌相关消化性溃疡临床研究[J].中药药理与临床,2007,23(6):76.
[4] 廖振荣,梁小波.胃苏颗粒治疗消化性溃疡的临床疗效及其机制探讨[J].中国实用医药,2008,3(35):25.

[5] 周华.胃苏颗粒治疗消化性溃疡210例疗效分析[J].贵阳中医学院学报,2003,25(3):14.
[6] 王艾肖,赵莉,胡云春.胃苏颗粒联合用药治疗幽门螺杆菌相关消化性溃疡疗效观察[J].中国医院药学杂志,2006,26(8):1004.
[7] 樊红杰,王兴华,许春艳.复方阿嗝米特联合胃苏颗粒治疗消化不良疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2013,22(3):1444.
[8] 叶松.胃苏颗粒治疗功能性消化不良50例[J].医药导报,2002,21(12):792.
[9] 张娥铿.胃苏颗粒联合多潘立酮治疗功能性消化不良的临床观察[J].吉林医学,2012,33(12):2475.
[10] 冯勤.胃苏颗粒治疗梅核气38例[J].浙江中西医结合杂志,2002,12(1):60.
[11] 李沁媛,唐亚琴,徐辉,等.高效液相色谱法测定胃苏颗粒中橙皮苷和柚皮苷含量[J].西南科技大学学报,2011,26(2):82.
[12] 阚红玉,宋殿荣,王跃飞,等.HPLC法同时测定黄芩中5种黄酮类成分的含量[J].中国药房,2010,21(11):1016.
(收稿日期:2013-09-22 修回日期:2013-11-06)

* 主管药师。研究方向:药物分析及质量标准。电话:0635-8535586。E-mail:LCHFJL@sina.com

健脑补肾丸是由红参、鹿茸、狗鞭、肉桂、金牛草、炒牛蒡子等25味中药组成的纯中药制剂,具有健脑补肾、益气健脾、安神定志的功效,临床用于治疗脾肾两虚所致的健忘、失眠、头晕目眩、耳鸣、心悸、腰膝酸软、遗精等。方中红参味甘而微苦,气浓香,具有大补元气、回阳固脱的功效^[1]。阳气不足、冬季畏寒、四肢寒冷、肺虚咳嗽、脾虚久泻久痢、老人早衰、妇女内分泌紊乱者宜选用之^[2]。红参含多种成分,主要活性成分为人参皂苷Rg₁和Re。目前,有关文献报道测定人参单体皂苷的方法有薄层扫描法^[3]、高效液相色谱(HPLC)法^[4-5]。健脑补肾丸目前尚无人参皂苷含量测定指标,为保证临床用药的疗效稳定、安全可靠,笔者建立了健脑补肾丸中人参皂苷Rg₁和Re的含量测定方法。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 HPLC仪,配有G1311A四元泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、G1315B二极管阵列检测器(DAD)及Chemstation工作站(美国安捷伦公司);JAC-300数控超声波清洗器(工作频率:40 kHz,输出功率:250 W,济宁市奥波超声电气有限公司);CP225D电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

人参皂苷Rg₁、人参皂苷Re对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110703-201128、110754-201123);健脑补肾丸(山东临清华威药业有限公司,批号:13032410、13012206、13022101,规格:每15丸丸芯重1.7 g);乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长:203 nm;柱温:30 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl;流动相:A相为乙腈,B相为水,梯度洗脱程序详见表1。在上述色谱条件下,各成分分离度大于1.5,理论板数按人参皂苷Rg₁峰计不低于6 000。色谱详见图1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Graduation elution program of mobile phase

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0~35	19	81
>35~55	19→29	81→71
>55~70	29	71
>70~100	29→40	71→60

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取健脑补肾丸60粒,研细,取约1 g,精密称定,置索氏提取器中加三氯甲烷加热回流3 h,弃去三氯甲烷液,药渣挥干溶剂,连同滤纸筒移入100 ml锥形瓶中,精密加入水饱和的正丁醇50 ml,密塞,放置过夜,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液25 ml,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至5 ml量瓶中,再加甲醇稀释至刻度,摇匀,以0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷Rg₁和Re对照

品适量,加甲醇制成每1 ml含人参皂苷Rg₁ 0.3 mg、人参皂苷Re 0.2 mg的混合溶液,即得。

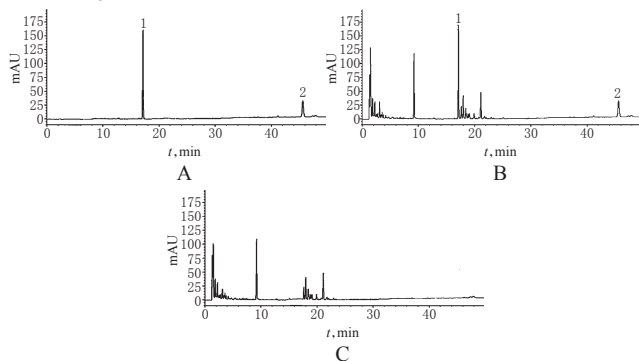


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.人参皂苷Rg₁;2.人参皂苷Re

Fig 1 HPLC chromatograms

A. standard control; B. test sample; C. negative control; 1. ginsenoside Rg₁; 2. ginsenoside Re

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取不含红参的阴性对照样品适量,按“2.2.1”项下制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液2、4、8、12、16、20 μl,进样测定。以峰面积(y)为纵坐标,进样量(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程分别为:人参皂苷Rg₁ $y=242.19x+2.5597$ ($r=0.9996$)、人参皂苷Re $y=231.98x+26.73$ ($r=0.9997$)。结果表明,人参皂苷Rg₁和Re进样量分别在0.903~6.02、0.618~4.12 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液适量,重复进样5次,每次10 μl,测定峰面积。结果,人参皂苷Rg₁和Re的RSD分别为1.1%、1.3%,说明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于放置0、2、4、6、8、10 h时精密吸取10 μl进样测定峰面积。结果,人参皂苷Rg₁和Re的RSD分别为0.90%、1.00%,表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取同一批号(13032410)样品适量,按“2.2.1”项下方法重复制备5份供试品溶液,分别进样10 μl测定。结果,人参皂苷Rg₁和Re的RSD分别为0.70%、1.2%,表明本方法重复性较好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的健脑补肾丸(批号:13012206)6份,各约0.5 g,精密称定,分别加入对照品混合溶液(含人参皂苷Rg₁ 1.506 mg/ml、人参皂苷Re 1.012 mg/ml)各1.0 ml,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样10 μl,记录各色谱峰峰面积,计算加样回收率,结果见表2。

2.8 样品含量测定

取3批健脑补肾丸样品适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件分别进样10 μl,以外标法按干燥品质量计算含量,结果见表3。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

成分	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
人参皂苷R _g	0.140	1.506	1.647	100.1	98.3	1.63
	0.142	1.506	1.611	97.8		
	0.139	1.506	1.641	99.8		
	0.141	1.506	1.599	97.1		
	0.148	1.506	1.603	96.9		
	0.153	1.506	1.630	98.3		
人参皂苷R _e	0.850	1.012	1.859	99.8	98.1	1.27
	0.854	1.012	1.798	96.4		
	0.842	1.012	1.813	97.8		
	0.847	1.012	1.842	99.1		
	0.851	1.012	1.805	96.9		
	0.843	1.012	1.834	98.9		

表3 样品含量测定结果(% , n=3)

Tab 3 Results of content determination of samples(% , n=3)

样品批号	人参皂苷R _g	RSD	人参皂苷R _e	RSD
13032410	0.20	1.32	0.14	1.07
13012206	0.25	1.57	0.16	1.13
13022101	0.23	1.21	0.17	1.63

3 讨论

3.1 流动相的选择

不少文献报道了人参皂苷成分流动相的研究,其中梯度洗脱^[6-7]占了很大比重。因此,在色谱条件优化中,笔者分别考察了甲醇-水、乙腈-水等不同流动相下人参皂苷R_g和R_e的分离情况。结果,乙腈-水为流动相梯度洗脱时,分离效果和重复性好,且可有效排除其他组分的干扰,故本研究选择乙腈-水为流动相^[8]。

3.2 提取方法的选择

由于补肾健脑丸为中药复方制剂,成分较复杂,故样品在通过滤纸筒后再用正丁醇提取,能较好地排除其他成分的干扰。在选择与确定供试品溶液制备方法时,分别对提取方式、提取溶剂、提取方法、提取溶剂用量进行了考察,最终确定以加热回流3 h,加水饱和的正丁醇50 ml,放置过夜,超声处理30 min作为最佳提取方法^[9]。结果表明,采用加热回流和超声

处理共同提取的方式,其提取率较高。

3.3 检测波长的选择

在HPLC条件下利用DAD检测器进行3D扫描,结果人参皂苷R_g和R_e在203 nm波长处有最大吸收,故选择203 nm为检测波长^[10]。

综上所述,本方法灵敏度高、操作简便、结果准确,可用于补肾健脑丸的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1 005.
- [2] 刘郁, 刘连新. 人参功效再认识[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 289.
- [3] 张中苏, 杨艳, 罗晋萍, 等. 薄层扫描法测定龟龄集中人参皂苷R_g的含量[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(1): 13.
- [4] 于超, 刁长发, 夏文娟, 等. 反相高效液相色谱法测定人参及其制剂中人参皂苷R_g含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(4): 263.
- [5] 刘军, 王燕桓, 傅承光. HPLC-光敏二极管阵列检测法测定人参单体皂苷的研究[J]. 中草药, 1998, 29(4): 228.
- [6] 张崇禧, 鲍建才, 李向高, 等. HPLC法测定人参、西洋参和三七不同部位中人参皂苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1 190.
- [7] 杨立伟, 郑传奇, 蒋忠军, 等. 超高效液相色谱法测定西洋参中人参皂苷R_g、R_e、R_b的含量[J]. 中药材, 2008, 31(1): 55.
- [8] 易延逵, 邓虹珠, 李跃辉, 等. 高效液相色谱法测定双参龙胶囊中人参皂苷R_e含量的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 987.
- [9] 秦少容, 余佳文, 岳廷哲, 等. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器法测定红参及育精胶囊中人参皂苷R_g和R_e的含量[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(8): 546.
- [10] 赵德华, 杨德智. HPLC测定田七痛经胶囊中人参皂苷R_b、R_g的含量[J]. 中成药, 2005, 27(5): 532.

(收稿日期: 2013-06-14 修回日期: 2013-12-02)

国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽带队赴广东省开展进一步整顿医疗秩序打击非法行医专项行动督查

本刊讯 2013年12月20-22日,由国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽带队,国家中医药管理局和委内监督局、宣传司有关人士以及天津市、江苏省、江西省卫生监督所专家参加的全国进一步整顿医疗秩序打击非法行医专项行动联合督查组,赴广东省开展为期3天的进一步整顿医疗秩序打击非法行医专项行动督查活动。

督查组听取了广东省及广州市、江门市关于打击非法行医工作情况的汇报,对广州市、江门市的医疗机构、计划生育技术服务机构、生活美容院、药店等15家单位进行了抽查,查阅了相关资料,与相关单位进行了座谈,发放了群众评议问卷。

座谈会上,崔丽充分肯定了广东省近两年来按照省委、省政府“三打两建”整体部署,严厉打击非法行医所取得的成绩。要求广东省进一步提高认识,将专项行动作为开展党的群众路线教育实践活动的重要整改措施,加强综合监督执法体系建设,建立健全部门联动、军地配合的工作机制,形成监管合力,进一步加大整治力度。扎实开展集中整治阶段“回头看”,认真开展群众评议,梳理专项行动中存在的问题,切实进行整改。崔丽强调,广东省流动人口多,要继续深化医药卫生体制改革,合理配置医疗资源,健全法律法规,强化医疗机构、医务人员依法执业意识,提高医疗服务能力,方便人民群众特别是流动人口看病就医,从根本上解决非法行医问题。