

生脉超微粉中 3 种人参皂苷含量测定方法学研究*

邱新建, 李守信**, 刘武占, 苏瑞强, 张则平, 赵志全

(鲁南制药集团股份有限公司/中药制药共性技术国家重点实验室/
中药制药新技术山东省企业重点实验室 临沂 276006)

摘要:目的:建立生脉超微粉中 3 种人参皂苷的含量测定方法。方法:采用 kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱 0~35 min,19%A;35~55 min,19%~29%A;55~70 min,29%A;70~100 min,29%~40%A,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 30℃,进样量 10 μL。结果:人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1} 线性范围分别为 0.083~0.834 μg、0.086~0.863 μg、0.091~0.911 μg;平均加样回收率(n=6)分别为 100.7%、100.5%、100.5%。结论:本方法快速、灵敏,重现性好,适合于生脉超微粉中人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1} 的含量测定。

关键词: HPLC 生脉超微粉 人参皂苷 R_{g1} 人参皂苷 Re 人参皂苷 R_{b1} 含量测定

doi: 10.11842/wst.2013.08.024 中图分类号: R917 文献标识码: A

中药超微粉碎技术是指中药的细胞级微粉碎,可使中药材细胞破壁率达 95%,其中心粒直径应在 75 μm 以下^[1,2],能够提高药材有效成分的溶出率和生物利用度,减少药材用量^[3-5]。生脉超微粉由红参、麦冬、五味子 3 味药材采用超微粉碎技术制备而成,具有益气复脉,养阴生津等功效,用于气阴两亏,心悸气短,脉微自汗^[6],该方的有效成分具有保护心肌细胞、调节血压、提高免疫功能、增强抗氧化、抗癌及抑制病毒等作用^[7]。首次建立高效液相色谱法测定生脉超微粉中 3 种人参皂苷类成分含量的分析方法,优化了供试品溶液制备的方法,为生脉超微粉的全面、客观质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);METTLER TOLEDO AG285 电子分析天平(梅

特勒托利多仪器有限公司);Shangping FA1004 电子分析天平(上海精科天平仪器厂);KQ5200DB 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。生脉超微粉(批号分别为 20120301、20120302、20120303,鲁南制药集团股份有限公司);人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号分别为:110703-200726、110754-200822、110704-200921,中国药品生物制品检定所)。乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:A 为乙腈,B 为水,梯度洗脱,0~35 min,19%A;35~55 min,19%~29%A;55~70 min,29%A;70~100 min,29%~40%A;流速:1 mL·min⁻¹,柱温:30℃,检测波长:203 nm。依上述色谱条件^[8],分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,进

收稿日期:2013-02-04

修回日期:2013-11-13

* 科学技术部国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB735604):新药研制过程化学机理——中药制药过程控制技术模式和方式研究,负责人:萧伟。

** 通讯作者:李守信,高级工程师,主要研究方向:中药新药研究与开发。

样分析。结果显示,各色谱峰的峰形和分离度均较好,可以准确测定其峰面积,并以峰面积进行定量分析。

2.2 供试品溶液的制备

取本品粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水饱和正丁醇 50 mL,再加入氨水 0.5 mL,密塞,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)30 min,滤过。精密量取续滤液 25 mL,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 对照品适量,用甲醇配制成浓度分别为 0.834、0.863、0.911 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液,备用;再取 2 mL 上述储备液置 5 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品储备液 1、2、4、8、10 μL ,进样分析,各进样 3 次,取平均值。以对照品进样量(μg)为横坐标、峰面积为纵坐标,进行线性回归,结果见表 1。

2.5 精密度试验

取上述对照品溶液,在“2.1”项条件进样分析,连续进样 6 次,测定峰面积,人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 的 RSD 分别为 0.44%、0.50%、0.83%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性考察

取生脉超微粉样品(批号:20120301),依“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样,测定人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 峰面积,其 RSD 分别为 0.55%、0.92%、0.49%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性考察

取生脉超微粉样品(批号:20120301),平行 6 份,依“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项条件下进样分析,计算人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 的 RSD,结果分别为 0.39%、0.88%、0.50%,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率考察

取已知含量的生脉超微粉(批号:20120301),平行 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,加入混合对照品溶液适量,按“2.2”项下方法操作,在“2.1”项条件下进样分析,计算回收率。结果见表 2。

2.9 样品含量测定

精密称取 3 个批次的生脉超微粉样品各 3 份,依“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项条件下进样分析,以外标法计算各成分含量。结果见表 3。

3 讨论

本文对供试品溶液的制备方法进行系统考察。

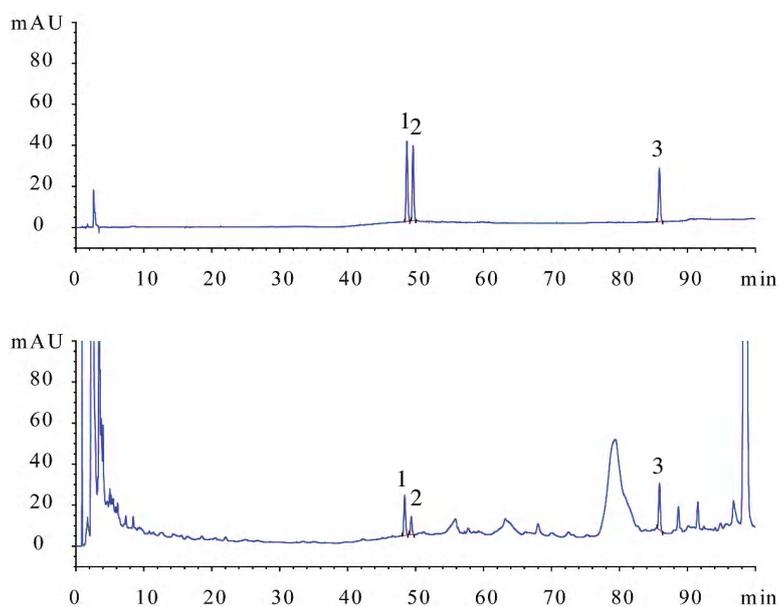


图 1 对照品(A)和生脉超微粉样品(B)的 HPLC 图

注:1.人参皂苷 R_{g_1} 2.人参皂苷 R_e 3.人参皂苷 R_{b_1} 。

表 1 回归方程和线性范围

对照品	回归方程	线性范围/ μg	r
人参皂苷 R_{g_1}	$Y = 1.487X - 0.3327$	0.083~0.834	0.9999
人参皂苷 R_e	$Y = 1.6306X - 0.892$	0.086~0.863	0.9999
人参皂苷 R_{b_1}	$Y = 1.1573X + 0.6047$	0.091~0.911	0.9999

表 2 生脉超微粉中有效成分的加样回收率

成分	取样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
人参皂苷 R _{g₁}	0.500 2	0.322	0.322	0.649	100.7	2.1
	0.501 3	0.323	0.322	0.658		
	0.502 3	0.323	0.322	0.639		
	0.499 2	0.321	0.322	0.649		
	0.498 9	0.321	0.322	0.641		
	0.500 7	0.322	0.322	0.642		
人参皂苷 Re	0.500 2	0.152	0.153	0.304	100.5	2.0
	0.501 3	0.152	0.153	0.311		
	0.502 3	0.153	0.153	0.306		
	0.499 2	0.152	0.153	0.303		
	0.498 9	0.152	0.153	0.304		
	0.500 7	0.152	0.153	0.308		
人参皂苷 R _{b₁}	0.500 2	0.538	0.536	1.077	100.5	1.5
	0.501 3	0.539	0.536	1.068		
	0.502 3	0.54	0.536	1.081		
	0.499 2	0.537	0.536	1.089		
	0.498 9	0.536	0.536	1.076		
	0.500 7	0.538	0.536	1.069		

表 3 不同批号生脉超微粉中 3 种成分测定结果(n=3)

批号	质量分数/mg·g ⁻¹		
	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 Re	人参皂苷 R _{b₁}
20120301	0.644	0.304	1.075
20120302	0.668	0.313	1.123
20120303	0.628	0.297	1.044

首先,采用水饱和正丁醇超声提取^[6],结果 3 种成分的含量均低于溶出度测定时的溶出量^[8];可能是生脉超微粉含有糖类物质较多,易吸取正丁醇中的水而粘结成团,影响提取效果,而后采用水饱和正丁醇回流提取、70%乙醇超声提取后正丁醇萃取,含量仍偏低。供试品溶液制备过程,除萃取步骤外,还需较长的蒸干过程,人参皂苷在酸性条件下不稳定^[9],

与麦冬五味子配伍后酸性变强,使人参皂苷发生水解,人参皂苷含量明显降低^[10]。溶出度研究中,笔者曾采用人工胃液作为溶出介质,结果发现人参皂苷几乎分解,这也证实了上述推断^[8]。故而考虑在采用水饱和正丁醇超声时,加入少量氨水,防止成分的水解,达到预期效果。本文所建立的方法准确可靠,重现性好,可作为生脉超微粉中人参皂苷含量的测

定方法,同时对含人参皂苷复方药物的含量测定提供参考。

参考文献

- 1 杨海涵,李犹平,黄建国.中药超微粉概述及其防控猪病的研究进展. 兽医导刊, 2011, (5):47~49.
- 2 杨松,丁善磊.中药超微粉碎研究进展.黑龙江科技信息, 2011, 11,35.
- 3 金毅.中药超微粉碎研究进展.山东中医杂志, 2011, 30(9):677~679.
- 4 陈绪龙,赵国巍,廖正根,等.当归超微粉体和普通粉体的粉体学性质比较.中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18):1~5.
- 5 易延遼,张璐,刘莉,等.超微粉与普通粉田七痛经胶囊比较研究.中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):34~36.
- 6 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:化学工业出版社, 2010.
- 7 徐淑华,刘生友.生脉注射液的药理作用研究进展.中国药事, 2010, 24(4):405~407.
- 8 邱新建,李守信,张则平,等.红参超微粉及其复方超微粉的溶出度研究.中华中医药杂志, 2013, 28(4):103~105.
- 9 陈木洲,刘延辉,黄姬.酸碱度对人参皂苷提取率及其稳定性影响分析.中国实用医药, 2011, 6(20):146~147.
- 10 曹站霞.人参与麦冬配伍后人参皂苷含量变化的研究.中国现代药物应用, 2009, 3(8):34~35.

Content Determination of Three Ginsenosides in *Shengmai* Ultra-micro Powder

Qiu Xinjian, Li Shouxin, Liu Wuzhan, Su Ruiqiang, Zhang Zeping, Zhao Zhiquan

(Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. / State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine / Shandong Province Key Laboratory of Pharmaceutical New Technology of Traditional Chinese Medicine, Linyi 276006, China)

Abstract: This study was aimed to establish an HPLC method to determine three ginsenosides in *Shengmai* ultra-micro powder. The kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as analytical column. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and water (B) with gradient elution (0~35 min, 19% A; 35~55 min, 19%~29% A; 55~70 min, 29% A; 70~100 min, 29%~40% A) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 203 nm and the column temperature was 30°C. The injection volume was 10 μL. The results showed that the linear ranges of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁ were 0.083~0.834 μg, 0.086~0.863 μg, 0.091~0.911 μg, respectively. The average recovery rates (n = 6) were 100.7%, 100.5%, 100.5%, respectively. It was concluded that this method was quick, sensitive, repeatable and suitable to determine contents of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re and ginsenoside Rb₁ in *Shengmai* ultra-micro powder.

Keywords: HPLC, *Shengmai* ultra-micro powder, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, content determination

(责任编辑 叶丽萍 张志华, 责任译审 王 晶)