

HPLC 同时测定乳癖消颗粒中 7 种成分的含量

曹旦华,张剑,朱丹妮*

(中国药科大学中药复方研究室,南京 211198)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定乳癖消颗粒中芍药苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、连翘苷、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb₁、去氢木香内酯 7 种成分的含量。方法:采用 AlltimaC₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);乙腈-水为流动相,梯度洗脱,检测波长 203 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:芍药苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、连翘苷、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb₁、去氢木香内酯线性范围分别为 3.906 25~125 μg (*r*=0.999),9.375~300 μg (*r*=0.999),37.5~1 200 μg (*r*=1.000),2.187 5~70 μg (*r*=0.999),3.75~120 μg (*r*=0.999),25~800 μg (*r*=0.999),0.625~20 μg (*r*=1.000);平均加样回收率分别为 97.95% (RSD 0.71%),99.05% (RSD 1.11%),100.70% (RSD 2.46%),102.74% (RSD 0.35%),103.06% (RSD 0.55%),98.25% (RSD 1.68%),100.16% (RSD 1.82%)。结论:本方法方便、稳定、可靠,可用于乳癖消颗粒的质量控制。

[关键词] 乳癖消颗粒;芍药苷;人参皂苷 Rg₁;哈巴俄苷;连翘苷;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0074-03

Simultaneous Determination of Seven Components in Rupixiao Granule by HPLC

CAO Dan-hua, ZHANG Jian, ZHU Dan-ni*

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of seven components such as paeoniflorin, ginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, forsythin, harpagoside, ginsenoside Rb, dehydrocostuslactone contained in Rupixiao granule. **Method:** HPLC was conducted on an Alltima C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 30 ℃; the mobile phase was consisted of acetonitrile (A)-water (B) with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ detected at 203 nm. **Result:** The linear range (mg·L⁻¹) of paeoniflorin, ginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, forsythin, harpagoside, ginsenoside Rb, dehydrocostuslactone was 3.906 25-125 (*r*=0.999), 9.375-300 (*r*=0.999), 37.5-1 200 (*r*=1.000), 2.1875-70 (*r*=0.999), 3.75-120 (*r*=0.999), 25-800 (*r*=0.999) and 0.625-20 μg (*r*=1.000) respectively. The average recoveries were 97.95% (RSD 0.71%), 99.05% (RSD 1.11%), 100.70% (RSD 2.46%), 102.74% (RSD 0.35%), 103.06% (RSD 0.55%), 98.25% (RSD 1.68%) and 100.16% (RSD 1.82%) respectively. **Conclusion:** The developed method was convenient, reliable and accurate for the quality control of Rupixiao preparation.

[Key words] Rupixiao granule; paeoniflorin; ginsenoside Rg₁; harpagoside; forsythin; HPLC

[收稿日期] 20101209(013)

[第一作者] 曹旦华,硕士研究生,研究方向:中药复方药效物质基础研究,E-mail: codanhua55@163.com

[通讯作者] *朱丹妮,教授,研究方向:中药复方药效物质基础以及中药新药开发,Tel: 025-86185158,E-mail: danizhu@163.com

复方乳癖消颗粒是纯中药制剂,由芍药、玄参、三七、夏枯草、红花等 15 味药材组成,具有软坚散结,活血消痈、清热解毒的功效,临床主要用于乳腺增生的治疗。乳腺增生属于中医乳癖的范畴,近年来随着人们的物质及文化生活水平的提高,患者逐年增多,且病发年龄有年轻化发展趋势^[1]。《中国药

典》2010 年版一部所载的乳癖消片及胶囊制剂的质量控制仅有人参皂苷 R_{g_1} 这一项指标^[2],而且文献报道的乳癖消制剂质量控制指标也仅局限于单个药材的一个或几个成分^[3-5],这对于多味药组成的复方乳癖消颗粒,没有对其中主要多味药材的化学成分进行全面、系统的检测,不易于产品的质量控制,也与中药的整体性特点和协同作用相违背,所以本试验建立了一种复方乳癖消颗粒的质量控制方法。

1 材料

1.1 药品与试剂 色谱纯乙腈 (Tedia, USA); 纯净水 (Millipore, France); 甲醇 (江苏汉邦科技有限公司);其他试剂均为国产分析纯;乳癖消颗粒 (哈尔滨泰华药业股份有限公司);对照品 芍药苷 (0736-9811)、三七皂苷 R_1 (110745-200415)、人参皂苷 R_{g_1} (110703-200424)、人参皂苷 R_{b_1} (110704-200012)、连翘苷 (110821-200711)、去氢木香内酯 (111525-200907) 均购自中国药品生物制品检定所;哈巴俄苷由实验室从玄参中分离得到,其纯度经 HPLC 归一化法检测 >98%。

1.2 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪 (HPG1322A 在线脱气、HPG1311A 四元泵、HPG1316A 柱温箱、HPG1314A VWD 紫外检测器及 chemstation 色谱工作站);3104 LOT I. D. 手动进样器 (Rheodyne, USA); PB303-N 电子精密天平 (Mettler-Toledo, 瑞典);HH-2 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司);KH-250DB 超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 取本品装量差异项下的内容物,研细,取 10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 m,密塞,称定质量,超声处理 (功率 250 W,频率 33 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,弃取初滤液,精密量取续滤液 25 mL,置蒸发皿中蒸干,残渣加水 15 mL 使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用氨试液 30 mL 充分洗涤,弃去氨试液,再用正丁醇饱和的水 30 mL 洗涤,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液的制备 甲醇配制供定量用含 7 个标准品的混标溶液 ($g \cdot L^{-1}$) 芍药苷 (0.125), 哈巴俄苷 (0.12), 人参皂苷 R_{g_1} (1.2), 人参皂苷 R_{b_1}

(0.8), 三七皂苷 R_1 (0.3), 去氢木香内酯 (0.02), 连翘苷 (0.07)。

2.3 色谱条件 AlltimaC₁₈ 分析柱 (4.6mm × 250 mm, 5 μ m;流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱,洗脱程序见表 1;检测波长 203 nm;柱温 30 $^{\circ}C$;流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹,见图 1。

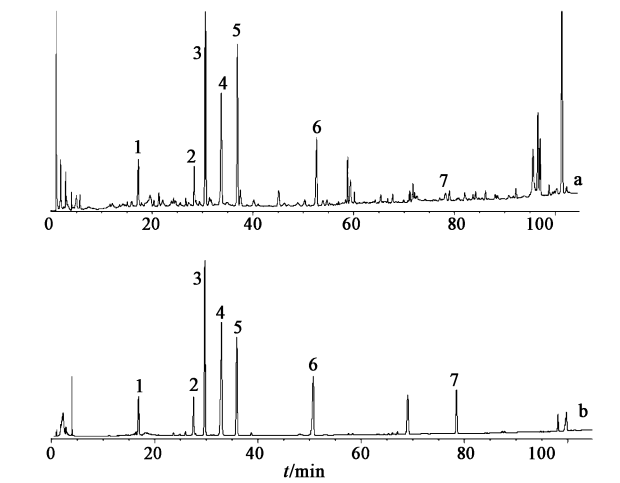


图 1 乳癖消颗粒 HPLC 图 (a), 对照品 HPLC 图 (b)

1. 芍药苷;2. 三七皂苷 R_1 ;3. 人参皂苷 R_{g_1} ;4. 连翘苷;
5. 哈巴俄苷;6. 人参皂苷 R_{b_1} ;7. 去氢木香内酯

表 1 洗脱程序

t/min	A/%
0	10
6	12
10	18
30	29
48	34
50	34
55	42
100	95
105	95

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的制备 将含 7 个对照品的混标溶液稀释至 6 个梯度浓度 ($g \cdot L^{-1}$) 芍药苷 (125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.906 25), R_1 (300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375), R_{g_1} (1 200, 600, 300, 150, 75, 37.5), 连翘苷 (70, 35, 17.5, 8.75, 4.375, 2.1875), 哈巴俄苷 (120, 60, 30, 15, 7.5, 3.75), R_{b_1} (800, 400, 200, 100, 50, 25), 去氢木香内酯 (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625)。每个梯度浓度进样 20 μ L,建立色谱峰面积对浓度的回归方程 (表 2),结果表明,各成分峰在检测的浓度范围内均显示了良好的线性关系。

表 2 7 种成分线性关系

成分	回归方程	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	R^2
芍药苷	$Y=14.77X-1.047$	3.906 25~125	0.999
三七皂苷 R_1	$Y=5.244X+1.469$	9.375~300	0.999
人参皂苷 R_{g_1}	$Y=6.256X+39.23$	37.5~1 200	1.000
连翘苷	$Y=101.5X+5.594$	2.187 5~70	0.999
哈巴俄苷	$Y=39.79X+10.24$	3.75~120	0.999
人参皂苷 R_{b_1}	$Y=4.895X+13.29$	25~800	0.999
去氢木香内酯	$Y=101X+15.32$	0.625~20	1.000

注:λ 均为 203 nm。

2.4.2 精密度考察 称定本品装量差异项下的内容物 10 g,按照 2.1 项下方法制得供试品溶液,连续手动进样 6 次,按 2.3 项下色谱条件进行测定,芍药苷、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、连翘苷、哈巴俄苷、人参皂苷 R_{b_1} 、去氢木香内酯峰面积的 RSD 分别为 1.74%,1.99%,1.57%,1.99%,1.96%,1.81%,1.90%。结果表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性考察 按照样品制备方法平行制备 6 份乳癖消颗粒的供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,芍药苷、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、连翘苷、哈巴俄苷、人参皂苷 R_{b_1} 、去氢木香内酯峰面积 RSD 分别为 1.69%,1.97%,1.16%,1.26%,1.84%,1.87%,2.00%,结果表明此法具有较好的重复性。

2.4.4 稳定性考察 取 2.1 项下供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件,分别于 0,2,4,8,12,24 h 测定,芍药苷、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、连翘苷、哈巴俄苷、人参皂苷 R_{b_1} 、去氢木香内酯峰面积 RSD 分别为 0.77%,1.34%,0.40%,0.61%,0.82%,1.07%,1.89%,表明供试品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率 取已知含量的乳癖消颗粒适量共 6 份,分别精密加入各标准品对照液适量,按照 2.1 项下方法制得供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,测定各成分的含量,计算各成分的加样回收率和 RSD。芍药苷、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、连翘苷、哈巴俄苷、人参皂苷 R_{b_1} 、去氢木香内

酯加样回收率分别为 97.95%,99.05%,100.70%,102.74%,103.06%,98.25%,100.16;RSD 分别为 0.71%,1.11%,2.46%,0.35%,0.55%,1.68%,1.82。结果表明该方法对这几个成分的定量分析准确可行。

2.5 样品测定 按 2.1 项下供试品溶液制备方法制备样品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,色谱图详见图 1,记录各色谱峰的峰面积,每个样品平行 2 份,含量取平均值,测定结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

批号	芍药苷	三七皂苷 R_1	人参皂苷 R_{g_1}	连翘苷	哈巴俄苷	人参皂苷 R_{b_1}	去氢木香内酯
20100401	0.058 1	0.119 4	0.621 9	0.026 0	0.080 4	0.435 7	0.002 1
20100403	0.058 2	0.116 0	0.631 7	0.026 1	0.079 2	0.437 4	0.002 1
20100408	0.054 8	0.116 5	0.633 2	0.026 0	0.081 8	0.434 6	0.002 2

3 讨论

乳癖消颗粒为 15 味药材组成的中药复方,成分复杂,在摸索色谱条件时,我们比较了乳癖消颗粒分别在不同检测波长以及柱温下的指纹图谱,发现在 203 nm 波长检测以及 30 ℃ 条件下指纹图谱不但成分峰丰富而且丰度大,7 种成分能够与其他成分很好的分离,并且保留时间相对适中;流动相乙腈-水不但配比简单,而且可以减少对柱子的损害。

[参考文献]

[1] 张聪毅. 自拟乳癖消治疗乳腺增生 190 例[J]. 光明中医,2008,23 (6):787.
[2] 中国药典. 一部[S]. 2010:840.
[3] 孙金元. HPLC 法测定乳癖消片种丹皮酚的含量[J]. 中华中医药学刊,2007,25 (5):1062.
[4] 姜云云,潘亚菊,范国荣. HPLC 法测定乳癖消片种芍药苷含量[J]. 药学实践杂志,2007,25 (5):330.
[5] 徐国兵,王峥涛,潘涅,等. RP-HPLC 测定乳癖消片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31 (13):1067.

[责任编辑 蔡仲德]