

· 药品检验 ·

HPLC 法测定三七中人参皂苷 R_{g1} 和三七皂苷 R₁ 的含量

张雯洁 李忠琼 张贇华 胡旭佳(云南省药品检验所 昆明 650011)

Determination of Ginsenoside R_{g1} and Notoginsenoside R₁ in Notoginseng by HPLC

Zhang Wenjie, Li Zhongqiong, Zhang Yunhua, Hu Xujia (Yunnan Institute for Drug Control, Kunming 650011)

Abstract Objective: To establish the determination method of Ginsenoside R_{g1} and Notoginsenoside R₁ in Notoginseng. **Methods:** The HPLC method for determination of Notoginseng was. C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5μm), a mixture acetonitrile-0.05% phosphoric acid (21.5 : 78.5) as a mobile phase, detection wavelength 203nm. **Results:** This method showed a good linear relationship. The mean recovery was Ginsenoside R_{g1} 99.54% and Notoginsenoside R₁ 101.40% (n=6). **Conclusion:** This method showed a good separating degree and reliable.

Key Words: HPLC; Ginsenoside R_{g1}; Notoginsenoside R₁; Notoginseng

摘要:目的:建立 HPLC 测定三七中人参皂苷 R_{g1} 和三七皂苷 R₁ 含量的方法。方法:色谱条件为:C₁₈柱,流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液(21.5 : 78.5),UV 检测波长为 203nm。结果:此方法线性关系良好,平均加样回收率分别为人参皂苷 R_{g1} 99.54% 和三七皂苷 R₁ 101.40% (n=6)。结论:本方法分离良好,结果准确可靠。

关键词: HPLC; 人参皂苷 R_{g1}; 三七皂苷 R₁; 三七

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根,是我国名贵的中药材,始见于李时珍《本草纲目》,具有散瘀止血、消肿定痛之功,用于治疗咯血,吐血,衄血,便血,崩漏,外伤出血,胸腹刺痛,跌扑肿痛。中国药典 2000 年版一部中三七项下收录了 TLCS 法测定人参皂苷 R_{g1} 与人参皂苷 R_{b1} 的含量^[1],本文采用 HPLC 法测定三七中的主要成分人参皂苷 R_{g1} 与特征成分三七皂苷 R₁ 的含量。

一、仪器及试剂

HP-1100 液相色谱仪, HP-1100 系列四元泵, VWD 可变波长检测器, 自动进样器。

人参皂苷 R_{g1} 对照品: 中国药品生物制品检定所提供, 编号 0703-9813, 供含量测定用。三七皂苷 R₁ 对照品: 中国药品生物制品检定所提供, 编号 0745-9804, 供含量测定用。

三七样品: 云南省文山州三七栽培区。

所用溶剂均为分析纯, 流动相配制用色谱纯溶剂。

二、色谱条件

Alltech C₁₈ 色谱柱 (250mm × 4.6mm, 5μm); 乙腈-0.05% 磷酸溶液 (21.5 : 78.5) 为流动相; 检测波长 203nm; 进样量 10μL; 流速: 1mL/min; 柱温

20℃。

三、溶液配制

(一) 对照品溶液的配制: 精密称取 P₂O₅ 减压干燥 72 小时的人参皂苷 R_{g1} 62.04mg 及三七皂苷 R₁ 19.88mg, 置 100mL 量瓶中, 加乙腈-0.05% 磷酸溶液 (21.5 : 78.5) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即配成含人参皂苷 R_{g1} (0.6204mg/ml) 和三七皂苷 R₁ (0.1988mg/mL) 的溶液作为对照品溶液。

(二) 供试品溶液的制备 取本品粉末 0.2g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加氯仿 30mL, 加热回流 1 小时, 弃去氯仿液, 药渣挥去氯仿, 加甲醇 50mL, 加热回流 3 小时, 提取液挥干, 加水 10mL 使溶解, 水液通过 D₁₀₁ 型大孔吸附树脂柱, 以水 50mL 洗脱, 弃去水液, 再用 20% 乙醇 50mL 洗脱, 弃去洗脱液, 继用 80% 乙醇 80mL 洗脱, 收集 80% 乙醇洗脱液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并稀释至 10mL, 即得。

四、方法与结果

(一) 系统适用性试验 分别量取对照品溶液、供试品溶液注入色谱仪, 记录色谱图 (图 1、2)。理论板数按三七皂苷 R₁ 峰计算为 10880, 三七皂苷 R₁ 峰与其他组分峰的分度度 > 8, 三七皂苷 R₁ 峰保留时间约为 17.6min, 理论板数按人参皂苷 R_{g1} 峰计算为 12020, 人参皂苷 R_{g1} 峰与其他组分峰 (人参皂

苷 Re) 的分离度 >1.6 , 人参皂苷 R_{g_1} 峰保留时间约为 24.9min。

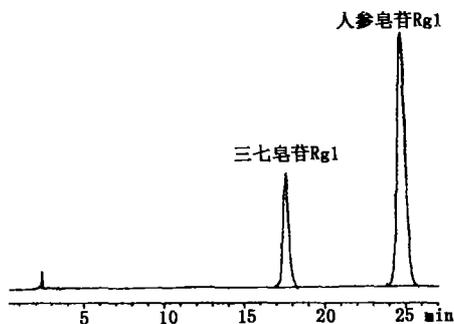


图1 对照品溶液 HPLC 色谱图

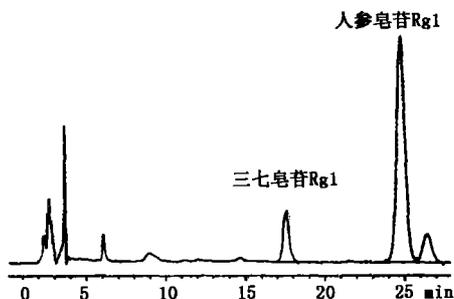


图2 三七供试品溶液 HPLC 色谱图

(二)线性关系考察:精密量取对照品溶液 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ L 进样, 记录色谱图, 以峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行回归处理, 人参皂苷 R_{g_1} 回归方程为 $Y = 352.04445X + 12.97996$, $r = 0.9999$, 三七皂苷 R_1 回归方程为 $Y = 374.37286X - 1.07711$, $r = 0.9999$ 。线性范围为人参皂苷 R_{g_1} : 0.6204 μ g - 31.02 μ g, 三七皂苷 R_1 : 0.1988 μ g - 9.94 μ g。

(三)精密度试验 量取同一对照品溶液, 连续测定 5 次, 以峰面积积分值计算人参皂苷 R_{g_1} RSD = 0.585%, 三七皂苷 R_{g_1} RSD = 0.701%。

(四)稳定性试验 量取同一供试品溶液, 测定 5 次, 每次间隔 2 小时, 以供试品含量计算人参皂苷 R_{g_1} RSD = 1.53%, 三七皂苷 R_1 RSD = 1.34%, 表明供试品溶液在 8 小时内稳定。

(五)重现性试验 量取同一批号的样品, 按供试品溶液的制备方法制备 6 份供试品溶液, 分别测定, 以供试品含量计算人参皂苷 R_{g_1} RSD = 3.70%, 三七皂苷 R_1 RSD = 3.38%, 证明此方法重现性好。

(六)回收率试验 精密称取 P_2O_5 减压干燥 24 小时的人参皂苷 R_{g_1} 27.52mg, 三七皂苷 R_1 6.18mg 置 5ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 作为加

样用对照品溶液。取重现性试验的同批号样品 105 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后精密称取 0.1g (6 份), 置索氏提取器中, 精密加入加样用对照品溶液 0.4ml、0.5ml、0.6ml (各双样), 挥干溶剂, 照供试品溶液同法制备加样回收试验溶液, 分别测定, 计算回收率。结果见表 1、2。

表1 人参皂苷 R_{g_1} 加样回收试验结果 (平均含量为 2.74%, 对照品浓度 5.504mg/ml)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测定量 (mg)	对照品测得量 (mg)	回收率 (%)
0.1002	2.7455	2.2016	4.9114	2.1659	98.38
0.1011	2.7701	2.2016	5.0216	2.2515	102.27
0.1006	2.7564	2.7520	5.5414	2.7850	101.20
0.1002	2.7455	2.7520	5.4610	2.7155	98.67
0.1010	2.7674	3.3024	6.0672	3.2998	99.92
0.1005	2.7537	3.3024	5.9512	3.1975	96.82

平均加样回收率为 99.54%, RSD = 2.00%。

表2 三七皂苷 R_1 加样回收试验结果 (平均含量为 0.62%, 对照品浓度 1.236mg/ml)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测定量 (mg)	对照品测得量 (mg)	回收率 (%)
0.1002	0.6212	0.4944	1.1166	0.4954	100.21
0.1011	0.6268	0.4944	1.1280	0.5012	101.37
0.1006	0.6237	0.6180	1.2374	0.6137	99.31
0.1002	0.6212	0.6180	1.2498	0.6286	101.72
0.1010	0.6262	0.7416	1.3940	0.7678	103.53
0.1005	0.6231	0.7416	1.3815	0.7584	102.27

平均加样回收率为 101.40%, RSD = 1.47%。

五、样品测定

按规定方法制备 10 批样品的供试品溶液及对照品溶液, 分别测定, 测定结果见表 3。

表3 样品测定结果 (%)

样品编号	R_1	R_{g_1}	$R_{g_1} + R_1$
01	0.62	2.74	3.36
02	0.60	3.58	4.18
03	0.57	2.68	3.25
04	0.71	3.05	3.76
05	0.96	3.94	4.90
06	0.50	3.07	3.57
07	0.83	3.77	4.60
08	0.44	2.52	2.96
09	0.52	2.78	3.31
10	0.69	3.42	4.11

六、讨论

1. 三七中的活性成分以多种达玛烷型四环三萜皂苷为主, 同时含有三七素、氨基酸、多炔、挥发油、黄酮及三七多糖、无机元素。三七根中的主要皂苷成分为人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} , 与人参根十分相似, 而三七皂苷 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 则是三七中的特有成分, 人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 Re 和三七皂苷 R_1

的皂苷元均为原人参三醇^[2]。

2. 柱温以 20~25℃为宜,若超过 25℃则影响人参皂苷 R_{G1} 与人参皂苷 Re 的分离,理论塔板数以三七皂苷 R₁ 计应不低于 5000。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典, 2000, 一部: 10
[2] 郑光植, 杨崇仁编著. 三七生物学及其应用. 北京, 科学出版社, 1994: 9

AccQ-Tag 法测定复方精氨酸胶囊中精氨酸的含量

梁蔚阳(广东省药品检验所 广州 510180)

摘要:目的:建立测定复方精氨酸胶囊中精氨酸含量的 AccQ-Tag 法^[1,2,3]。方法:以 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)为衍生剂,与复方精氨酸胶囊中精氨酸柱前定量衍生,用 Waters HPLC 仪, AccQ-TagTM氨基酸分析柱,以 pH 4.95 醋酸钠缓冲液为流动相 A, 乙腈-水(3:2)为流动相 B, 进行梯度洗脱,检测波长为 248nm。结果:线性范围:0.1006~0.9054μg, r=0.9995(n=5)。回收率:99.7%, RSD 0.38%(n=5)。结论:本法快速、简便,辅料无干扰,结果满意。

关键词: AccQ-Tag 法; 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC); 精氨酸; 复方精氨酸胶囊

Determination of Arginine in Compound Arginine Capsules Using AccQ-Tag Method

Liang Weiyang(Guangdong Provincial Institute for Drug Control, Guangzhou 510180)

Abstract Objective: The paper reports the determination of arginine in compound arginine capsules using HPLC-AccQ Tag method. **Methods:** The arginine reacted with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) respectively and quantitatively and produced corresponding derivatives which were analyzed by HPLC. Chromatographic conditions: AccQ-TagTM for amino acids analysis (3.9×150mm), mobile phase of program elution (A) sodium acetate solution (pH 4.95), (B) acetonitrile: water (3:2) detected at 248nm by UV-detector. **Results:** The linear response range from 0.1006~0.9054μg of arginine (r=0.9995, n=5). The mean recoveries of arginine were 99.7% (RSD: 0.38%, n=5) **Conclusion:** The method is simple, quick and the result of determination is good.

Key Words: AccQ-Tag method; 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC); arginine; Compound Arginine capsules

复方精氨酸胶囊主要由硫酸锌和精氨酸加以适当辅料制成,主要用于治疗男性精子不足或精子活动率而引起的男性不育症。原企业标准中是采用常量定氮法测定其总氮从而求得精氨酸的含量,无专属性,不足以控制产品质量;本文采用的 AccQ-Tag 法有专属性,且简便,快速,灵敏度高,重现性好,结果满意。

一、仪器与药品

精氨酸(Lot. No. 901AB56)为日本味之素提供,含量 99.9%; 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)、AQC 稀释液和 pH 8.8 硼酸盐缓冲液均为 Waters 公司提供;复方精氨酸胶囊为中山市三才医药集团提供;乙腈(色谱级),其它试剂均为分析纯。

Waters 2010 色谱工作站, Waters 510 泵, Waters 486 检测器, Waters 717 自动进样器。

二、方法与结果

1. 色谱条件

色谱柱 AccQ-TagTM 柱, 3.9mm × 150mm, 4μm; 柱温 37℃; 检测波长 248nm; 进样量 5μl; 流速 1.0ml/min 梯度洗脱。流动相 A: 取醋酸钠 19.04g, 加超纯水 1000ml 溶解, 用 50% 磷酸溶液调节 pH 值至 5.2, 加 0.1% 乙二胺四醋酸二钠溶液 1.0ml, 加三乙胺 2.37ml, 用磷酸调节 pH 值至 4.95, 用 0.45μm 滤膜滤过并脱气; 流动相 B: 乙腈-水(3:2)。梯度见表 1:

表 1 梯度表

t(min)	0	0.5	15	19	32	33	34	37	38
A%	100	98	93	90	67	67	0	0	100
B%	0	2	7	10	33	33	100	100	0

2. 线性试验

取 105℃ 干燥 3 小时的精氨酸对照品适量, 加