

HPLC 同时测定藤珠胃康颗粒中 4 个皂苷类成分

王小平, 王芳, 白吉庆, 王金, 叶峥嵘, 权利娜, 沈舒文(陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定藤珠胃康颗粒中 4 个皂苷类成分(人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro 和竹节参皂苷 IVa)的方法。方法 采用 Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱(-5~0 min, 19%乙腈; 0~14 min, 19%→26%乙腈; 14~22 min, 26%→29%乙腈; 22~30 min, 29%乙腈; 30~40 min, 29%→35%乙腈; 40~55 min, 35%乙腈), 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 30 ℃。结果 人参皂苷 Re 在 0.080 4~1.608 μg(*r*=1), 人参皂苷 Rb₁ 在 0.108 8~2.176 μg(*r*=0.999 9), 人参皂苷 Ro 在 0.288 8~5.776 μg(*r*=0.999 9), 竹节参皂苷 IVa 在 0.176 0~3.520 μg(*r*=0.999 9)内线性关系良好; 平均回收率(*n*=6)分别为 99.41%, 101.92%, 99.76%, 100.31%, RSD 值分别为 2.22%, 2.07%, 0.33%, 0.64%。结论 本实验所建立的方法简单, 专属性强, 重复性好, 可用于藤珠胃康颗粒中人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro 和竹节参皂苷 IVa 的测定。

关键词: 藤珠胃康颗粒; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Ro; 竹节参皂苷 IVa

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)04-0553-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.017

Simultaneous Determination of Four Saponins in Tengzhuweikang Granules by HPLC

WANG Xiaoping, WANG Fang, BAI Jiqing, WANG Jin, YE Zhengrong, QUAN Lina, SHEN Shuwen(*Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of four saponins(ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Ro and chikusetsusaponin IVa) in Tengzhuweikang granules by HPLC. **METHODS** The HPLC separation was achieved on a Hypersil GOLD C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution with gradient elution(-5~0 min, 19% acetonitrile; 0~14 min, 19%→26% acetonitrile; 14~22 min, 26%→29% acetonitrile; 22~30 min, 29% acetonitrile; 30~40 min, 29%→35% acetonitrile; 40~55 min, 35% acetonitrile) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 203 nm and the column temperature was 30 ℃. **RESULTS** The linear ranges of ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Ro, chikusetsusaponin IVa were 0.080 4~1.608 μg (*r*=1), 0.108 8~2.176 μg(*r*=0.999 9), 0.288 8~5.776 μg(*r*=0.999 9), 0.176 0~3.520 μg(*r*=0.999 9), respectively. The average recoveries(*n*=6) were 99.41%, 101.92%, 99.76%, 100.31%, respectively. RSD of the recoveries was 2.22%, 2.07%, 0.33%, 0.64%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple and repeatable, can be used for the determination of ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Ro and chikusetsusaponin IVa in Tengzhuweikang Granules.

KEY WORDS: Tengzhuweikang granules; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Ro; chikusetsusaponin IVa

胃癌是我国常见恶性肿瘤之一, 其发病率与死亡率逐年上升, 严重威胁人类的生命和健康^[1-2]。藤珠胃康颗粒来源于陕西中医药大学沈舒文教授的临床常用基本方, 由藤梨根、珠子参、黄精、白术、三棱等药组成, 主要用于胃癌的防治。现代研究表明许多天然来源的植物成分——皂苷显示出不同程度的抗肿瘤作用^[3-17], 而人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Ro 和竹节参皂苷 IVa 是该制剂中的主要皂苷类成分, 本实验建立了藤珠胃康颗粒中 4 种皂苷的含量测定方法, 为藤珠胃康颗粒质量标准的制定奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UitiMate 3000 全自动高效液相色谱仪(二极管阵列检测器, 美国戴安); KZW-G 型恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); 101-2 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器设备有限公司); BT125D 型双量程电子分析天平(瑞士赛多利斯, 0.01 mg; 0.1 mg); SB 3200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂

人参皂苷 Re(批号: 110754-200218)、人参皂

基金项目: 陕西省科技厅中药现代化项目(2012KTCL03-14); 陕西省科学技术研究发展计划项目[2009K19-03(2)]

作者简介: 王小平, 女, 博士, 硕士 Tel: (029)38185165 E-mail: wangxiaoping323@126.com

昔 Rb₁(批号: 110704-200217)、人参皂昔 Ro(批号: 111903-201303)和竹节参皂昔 IVa(批号: 111861-201001)对照品均购自中国食品药品检定研究院, 供含量测定用, 纯度均>98%; 乙腈为色谱纯(默克公司); 其他试剂均为分析纯。藤珠胃康颗粒为实验室自制(批号: 20150721、20150725、20150302)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil GOLD C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱: -5~0 min, 19%乙腈; 0~14 min, 19%→26%乙腈; 14~22 min, 26%→29%乙腈; 22~30 min, 29%乙腈; 30~40 min, 29%→35%乙腈; 40~55 min, 35%乙腈, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm, 柱温 30 ℃, 进样体积 5 μL。理论板数按竹节参皂昔 IVa 应≥5 000。

2.2 对照品溶液的配制

分别精密称取竹节参皂昔 IVa 对照品 8.80 mg、人参皂昔 Ro 对照品 14.44 mg、人参皂昔 Rb₁ 对照品 5.44 mg、人参皂昔 Re 对照品 4.02 mg, 置 50 mL 的量瓶中, 加 60%乙醇溶解并定容, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的配制

取本品适量, 研细, 取 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60%乙醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声 40 min, 放冷, 用 60%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照液的制备

按制剂成型工艺制备未含珠子参的颗粒, 取适量, 研细, 取 1 g, 按“2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果见图 1, 供试品色谱中, 在与对照品相应的位置显色谱峰, 分离度良好, 且阴性无干扰。表明方法的专属性良好。

2.5.2 线性关系的考察 分别精密吸取上述混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 进样 2 次, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标(Y), 以对照品的质量(μg)为横坐标(X)进行线性回归, 得回归方程: $Y_{\text{人参皂昔 Re}}=2.762\ 4X+0.012\ 3(r=1)$; $Y_{\text{人参皂昔 Rb}_1}=2.369\ 7X-0.005\ 6(r=0.999\ 9)$; $Y_{\text{竹节参皂昔 IVa}}=$

$4.195\ 6X+0.064(r=0.999\ 9)$; $Y_{\text{人参皂昔 Ro}}=3.293\ 8X-0.084\ 3(r=0.999\ 9)$ 。结果表明人参皂昔 Re 在 0.080 4~1.608 μg, 人参皂昔 Rb₁ 在 0.108 8~2.176 μg, 竹节参皂昔 IVa 在 0.176 0~3.520 μg, 人参皂昔 Ro 在 0.288 8~5.776 μg 内线性关系良好。

2.5.3 仪器精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 5 μL, 注入液相色谱仪, 连续进样 5 次, 记录峰面积, 结果人参皂昔 Re、人参皂昔 Rb₁、竹节参皂昔 IVa、人参皂昔 Ro 峰面积的 RSD 值分别为 1.42%, 0.85%, 0.94%, 0.73%, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 称取同一供试品(批号: 20150302), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别进样 5 μL, 测得人参皂昔 Re、人参皂昔 Rb₁、竹节参皂昔 IVa、人参皂昔 Ro 峰面积积分值的 RSD 分别为 0.87%, 0.92%, 0.75%, 0.99%, 表明供试品溶液中待测成分在 12 h 内基本稳定。

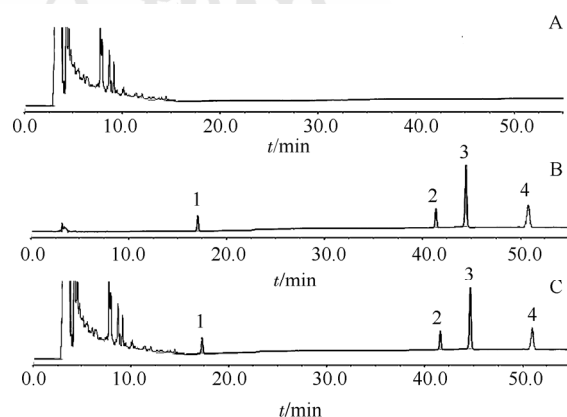


图 1 HPLC 图谱

A-阴性样品; B-混合对照品溶液; C-样品; 1-人参皂昔 Re; 2-人参皂昔 Rb₁; 3-人参皂昔 Ro; 4-竹节参皂昔 IVa。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-negative sample; B-mixed standard solution; C-sample; 1-ginsenoside Re; 2-ginsenoside Rb₁; 3-ginsenoside Ro; 4-chikusetsusaponin IVa.

2.5.5 重复性试验 取同一供试品(批号: 20150302)5 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样, 结果人参皂昔 Re、人参皂昔 Rb₁、竹节参皂昔 IVa、人参皂昔 Ro 质量分数的 RSD 分别为 1.02%, 1.08%, 1.09%, 1.12%, 表明此方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取同一供试品(批号: 20150302)每份 0.5 g(6 份), 精密称定, 分别精密加入一定量的人参皂昔 Re 对照品、人参皂昔 Rb₁ 对照品、竹节参皂昔 IVa 对照品、人参皂昔 Ro 对

照品。同法制备供试品溶液，结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Recoveries for four kinds of saponin compounds ($n=6$)

成分	样品中的 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
人参皂苷 Re	0.53	0.54	1.05	96.44	99.41	2.22
	0.53	0.54	1.06	98.15		
	0.53	0.54	1.08	101.85		
	0.53	0.54	1.07	100.00		
	0.53	0.54	1.06	98.15		
	0.53	0.54	1.08	101.85		
人参皂苷 Rb ₁	0.28	0.26	0.55	103.85	101.92	2.07
	0.28	0.26	0.55	103.85		
	0.28	0.26	0.54	100.00		
	0.28	0.26	0.54	100.00		
	0.28	0.26	0.55	103.85		
	0.28	0.26	0.54	100.00		
人参皂苷 Ro	4.85	4.80	9.62	99.38	99.76	0.33
	4.85	4.80	9.66	100.21		
	4.85	4.80	9.65	100.00		
	4.85	4.80	9.62	99.38		
	4.85	4.80	9.64	99.79		
	4.85	4.80	9.64	99.79		
竹节参皂 苷 IVa	2.68	2.70	5.36	99.26	100.31	0.64
	2.68	2.70	5.40	100.74		
	2.68	2.70	5.39	100.37		
	2.68	2.70	5.39	100.37		
	2.68	2.70	5.38	100.00		
	2.68	2.70	5.41	101.11		

2.6 含量测定

按“2.3”项下方法制备供试品溶液，精密吸取 10 μ L，注入液相色谱仪，按“2.1”项下色谱条件分析，记录峰面积，代入标准曲线进行计算，结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 2 Determination of samples($\bar{x} \pm s, n=3$)

批号	含量/mg·g ⁻¹			
	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Ro	竹节参皂苷 IVa
20150302	1.04±0.01	0.54±0.03	9.68±0.04	5.34±0.04
20150721	1.15±0.02	0.61±0.01	9.87±0.12	5.43±0.06
20150725	1.19±0.02	0.58±0.01	9.85±0.06	5.49±0.02

3 讨论

3.1 提取条件

本研究采取单因素试验对提取溶剂、提取方

式、提取时间及溶剂用量进行了考察。分别考察甲醇、60%乙醇、水等不同溶剂提取效果，结果 60%乙醇和水的提取率相当，考虑到水作为提取溶剂时，提取的杂质较多，因此选 60%的乙醇为提取溶剂；比较超声提取和回流提取的提取效果，2 种提取方式的提取率虽在数值上有所不同，但无统计学意义，考虑到回流提取杂质较多，因此选择超声提取；对不同提取时间进行了考察，以 60%乙醇提取溶剂分别超声提取 20, 30, 40, 50 min，结果表明超声提取 40 min 与 50 min 的结果比较接近，说明超声 40 min 已基本提取完全；对提取溶剂用量(5, 10, 15, 20 倍)进行比较，10 倍量与 15, 20 倍量溶剂的提取结果相比无统计学意义，故选用 10 倍量 60%乙醇超声提取 40 min。

3.2 色谱条件的优化

乙腈-0.2%磷酸水溶液(19:81)时，出峰太慢，55 min 只出了 2 个待测成分的色谱峰；乙腈-0.2%磷酸水溶液(25:75)时，0~20 min 的色谱峰出峰太快，过于密集，当待测成分出峰时，基线落不到 0，影响色谱峰的峰面积和图谱的美观。在达到分离度要求的情况下，最终采用“2.1”项下的梯度洗脱，色谱图的基线平直，各待测成分具有较强吸收，峰型较好，且分离度均>1.5；考察了不同柱温(20, 25, 30 $^{\circ}$ C)对分析的影响，结果不同柱温对色谱峰的影响不显著，只是 30 $^{\circ}$ C 的时候分析时间会稍短一些，而且由于温度高，柱子的压力也较低，故选择 30 $^{\circ}$ C 的柱温。

3.3 结论

采用 HPLC 建立同时测定藤珠胃康颗粒中人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、竹节参皂苷 IVa 和人参皂苷 Ro 的分析方法。与该类成分含量测定的文献方法相比较^[18-19]，文献方法分析周期较短，但色谱峰的基线很不平整，而且有些待测成分色谱峰的分离度不好；通过方法学验证，本实验所建立的定量分析方法专属性强，精密度、稳定性和重现性良好，准确度较高，可用于藤珠胃康颗粒中皂苷类成分的定量分析，为藤珠胃康颗粒质量标准的制定、HPLC 指纹图谱研究及全面评价藤珠胃康颗粒的质量提供了依据。

REFERENCES

[1] AHMEDIN J, FREDDIE B, MELISSA M, et al. Global cancer statistics [J]. Ca Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
[2] 赫捷, 赵平, 陈万青. 2102 中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 军
Chin J Mod Appl Pharm, 2017 April, Vol.34 No.4 • 555 •

事医学科学出版社, 2012.

- [3] FANG J, LIU X, CHEN Y, et al. Advances of experimental research in anti-lung cancer and other tumors by ginsenoside [J]. J Mod Oncol(现代肿瘤医学), 2012, 20(8): 1740-1742.
- [4] HAN X H, YE Y Y, GUO B F, et al. Effects of platycodin D in combination with different active ingredients of Chinese herbs on proliferation and invasion of 4T1 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines [J]. J Chin Integr Med(中西医结合学报), 2012, 10(1): 67-75.
- [5] XU Q J, HOU L L, HU G Q, et al. Molecular mechanism of ophiopogonin B induced cellular autophagy of human cervical cancer HeLa cells [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2013, 48(6): 855-859.
- [6] LIU C, ZHANG X, ZHAO D D, et al. Mechanism of intestinal absorption of total saponin in *Panacis Majoris Rhizoma* [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2013, 11(3): 191-193.
- [7] JIANG W W, LIU J. Overview of Antitumor effects and mechanism of ginsenoside Rb1, Rg3, Rh2 [J]. World Sci Tech-Mod Tradit Chin Med(世界科学技术—中医药现代化), 2013, 15(7): 1634-1637.
- [8] 罗颖颖. 白头翁鬼臼抗肺癌作用及机制研究[D]. 南中医药大学, 2014.
- [9] 王静. 地肤子皂苷对 HepG2 人肝癌细胞凋亡和迁移侵袭的影响及其作用机制研究[D]. 西北农林科技大学, 2014.
- [10] ZHANG C J, YU H T, HOU J C. Effects of 20(S)-ginsenoside Rh2 and 20(R)-ginsenoside Rh2 on proliferation and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. China J Chin Mater Med(中国中医药杂志), 2011, 36(12): 1670-1674.
- [11] ZHAO B, LIU Y, XU T H. Inhibitory effect of ginsenoside Rg1 on BGC-823 human gastric cancer cell line [J]. Chin J Clin Pharm Ther(中国临床药理学与治疗学), 2011, 16(4): 361-365.
- [12] HE Y, WANG J S, ZHANG P, et al. Synergistic apoptotic effect of the combination of diosgenin and TRAIL on non-small-cell lung cancer cell line A549 evaluated with the Chou-Talalay method [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2013, 48(1): 45-51.
- [13] QUAN K, LIU Q. Advances of ginsenosides in anticancer activities [J]. J Med Poost(医学研究生学报), 2015, 28(4): 427-431.
- [14] YUAN G R, YE Z Y. Experiment study of ginsenoside Rg3 and paclitaxel on inhibiting gastric cancer cells' metastasis and its mechanism [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2011, 29(3): 625-628.
- [15] GUO X H. Effect and mechanism of ginsenoside Re on TNF- α -induced leukocyte activation [J]. Pharm J Chin PLA(解放军药理学学报), 2012, 28(2): 116-118, 181.
- [16] YANG Q Y, LIN X Y, LIU G L. Research progress in pharmacological activities of ginsenoside Rb1 [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2013, 48(15): 1233-1237.
- [17] ZHANG D R, FENG D. Research advances on application of ginsenosides in liver diseases [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(5): 671-675.
- [18] XU M M, SONG B, YANG X J, et al. HPLC simultaneous determination of 4 chemical components in *Panacis Majoris Rhizoma* [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2014, 12(8): 796-799.
- [19] ZHANG G J, SHEN Y, MENG Z G, et al. Determination of 5 saponins in *Panax zingiberensis* by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(3): 500-504.

收稿日期: 2016-08-27

(本文责编: 李艳芳)