

[质 量]

HPLC-ELSD 法同时测定天泰 1 号片中 8 种成分

梁少瑜^{1,2,3}, 曾永长^{2,3}, 谭晓梅⁴, 吴正治^{2,3*}

(1. 暨南大学, 广东 广州 510632; 2. 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035; 3. 深圳市老年医学研究所, 广东 深圳 518020; 4. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 建立 HPLC-ELSD 法同时测定天泰 1 号片 (人参、天麻、肉苁蓉等) 中天麻素、巴利森苷 A、巴利森苷 B、人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rd 的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Alltima C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min。**结果** 8 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r > 0.999 0$), 平均加样回收率 96.94% ~ 97.93%, RSD 1.06% ~ 2.48%。**结论** 该方法简便、准确、可靠, 可用于天泰 1 号片的质量控制。

关键词: 天泰 1 号片; 化学成分; HPLC-ELSD

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)09-1841-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.016

Simultaneous determination of eight constituents in Tiantai No. 1 Tablets by HPLC-ELSD

LIANG Shao-yu^{1,2,3}, ZENG Yong-chang^{2,3}, TAN Xiao-mei⁴, WU Zheng-zhi^{2,3*}

(1. Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. The Second People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518035, China; 3. Shenzhen Municipal Institute of Geriatrics, Shenzhen 518020, China; 4. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC-ELSD method for the simultaneous content determination of gastrodin, parishin A, parishin B, ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rb₁ and Rd in Tiantai No. 1 Tablets (*Ginseng Radix et Rhizoma, Gastrodiae Rhizoma, Cistanches Herba, etc.*). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 45 °C thermostatic Alltima C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.999 0$), whose average recoveries were 96.94% - 97.93% with the RSDs of 1.06% - 2.48%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reliable method can be used for the quality control of Tiantai No. 1 Tablets.

KEY WORDS: Tiantai No. 1 Tablets; chemical constituents; HPLC-ELSD

天泰 1 号片为深圳市老年医学研究所吴正治教授基于阿尔茨海默病“肝虚髓亏”中医病理新假说和“补肝养髓”治疗新法则, 结合 20 年临床经验研制的医院制剂^[1], 方中人参补五脏、安精神、开心益智 (《本经》), 为君药; 天麻平调阴阳、养肝阴、助肝阳、平肝风 (独入肝经, 助阳气, 补

五劳七伤《日华子本草》), 为臣药; 辅以银杏叶、肉苁蓉、姜黄、褚实子、益智、远志、石菖蒲、冰片 8 味中药, 共奏补肝养髓、除痰化瘀、开窍益智之功。

其中, 人参皂苷是人参防治阿尔茨海默病的主要药效物质, 人参皂苷 Rg₁ 可降低 P-tau 表达水平,

收稿日期: 2017-02-17

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2016M592604); 广东省科技厅公益研究与能力建设专项资金新药创制专题项目 (2015B020211001); 深圳市科技计划项目 (JCYJ2016042810555220); 广东省中医药科研项目 (20171235)

作者简介: 梁少瑜 (1983—), 女, 博士, 从事老年性疾病中医药防治研究。E-mail: lsy1199@126.com

* 通信作者: 吴正治 (1964—), 男, 博士生导师, 从事中西医结合老年医学研究。E-mail: szwzz001@163.com

提高 ChAT^[2]、SOD、GSH-Px 活性^[3]，抑制 BACE 1、Caspase 3 表达^[4]以及细胞凋亡；人参皂苷 Rd 可抑制 P-Tau、GSK-3 β 表达，提高 PP-2A 活性，保护神经元^[5]；人参皂苷 Rb₁ 可降低 tau 磷酸化，抑制 JNK/p38MAPK^[6]、GSK-3 β 表达^[7]；人参皂苷 Re 可抑制钙通道，减低细胞内游离钙，改善神经细胞膜脂流动性，减轻线粒体肿胀度，抑制线粒体 H⁺-ATP 酶活性下降^[8]，防治老年性痴呆；人参皂苷 Rf 可通过促进神经干细胞增殖分化，增加 HIF-1 α 蛋白、VEGF 蛋白含量，促进神经干细胞的增殖^[9]；巴利森苷作为结合型天麻素（天麻素和柠檬酸缩合酯类化合物），在酸性条件下水解，与游离性天麻素共同作为天麻主要有效成分，对抑制核心病理产物 A β 斑块形成、抗氧化等具有良好的作用^[10-11]。鉴于此，本实验选择 8 种与防治阿尔茨海默病密切相关的天麻素、巴利森苷 A、巴利森苷 B、人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rd 作为检测指标，建立 HPLC-ELSD 法同时测定其含量，以期为天泰 1 号片质量控制提供科学依据和评价标准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 系列高效液相色谱仪，配置 Alltech 3300 型蒸发光散射检测器；H-2K6 二列六孔水浴锅（巩义市予华仪器有限公司）；TC15 套式恒温器（海宁市新华医疗器械厂）；JP-080ST 洁盟牌超声波清洗机（深圳市洁盟清洗设备有限公司）；SB-1100 水浴锅（东京理化器械株式会社）；CP225D 电子微量天平（德国 Sartorius 公司）。

1.2 材料 人参皂苷 Rb₁（批号 110704-201424，含量 $\geq 93.7\%$ ）、人参皂苷 Re（批号 110754-201525，含量 $\geq 92.3\%$ ）、人参皂苷 Rf（批号 111719-201505，含量 $\geq 92.3\%$ ）对照品均购自中国食品药品检定研究院；人参皂苷 Rd（批号 150815，含量 $\geq 98.0\%$ ）对照品购自成都普菲德生物技术有限公司；人参皂苷 Rg₁（批号 20160420，含量 $\geq 98.0\%$ ）、天麻素（批号 20160313，含量 $\geq 98.0\%$ ）、巴利森苷 B（批号 20160704-1，含量 $\geq 98.0\%$ ）、巴利森苷 A（批号 20160702-2，含量 $\geq 98.0\%$ ）对照品购自宝鸡辰光生物科技有限公司。天泰 1 号片（批号 20160802、20160823、20160918）由深圳市老年医学研究所提供。乙腈、甲醇为色谱纯（德国 Merck 公司）；其他试剂均为分析纯；水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[12] Alltima C₁₈ 色谱柱（4.6 mm \times 250 mm，5 μ m）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0 ~ 10 min，5% ~ 10% A；10 ~ 25 min，10% ~ 20% A；25 ~ 55 min，20% ~ 22% A；55 ~ 65 min，22% ~ 30% A；65 ~ 90 min，30% ~ 40% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 $^{\circ}$ C；蒸发光散射检测器；漂移管温度 45 $^{\circ}$ C，载气体积流量 1.4 L/min；进样量 20 μ L。见图 1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取天麻素、巴利森苷 A、巴利森苷 B、人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rd 对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含上述对照品 1.03、1.07、0.74、1.13、0.92、0.82、1.05、1.12 mg 的溶液。

2.3 供试品溶液制备 样品粉碎（过 40 目筛），精密称取 2.0 g，移入 100 mL 锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定质量，超声（250 W、40 kHz）30 min，室温下静置，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密量取 25 mL，水浴蒸干，残渣加 30 mL 水溶解，水饱和正丁醇振摇萃取 4 次（30 mL/次），合并萃取液，蒸干，残渣加甲醇溶解，转移至 10 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 阴性样品制备 按照处方比例及工艺，制备缺天麻、人参的阴性样品，按“2.3”项下方法制备溶液。

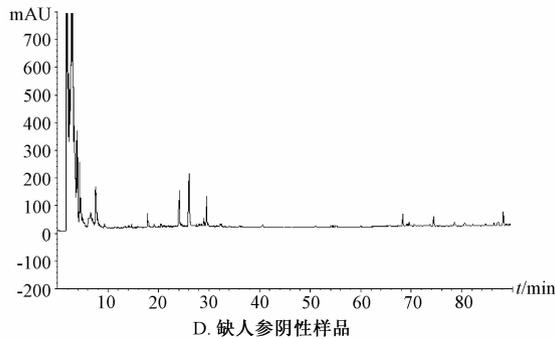
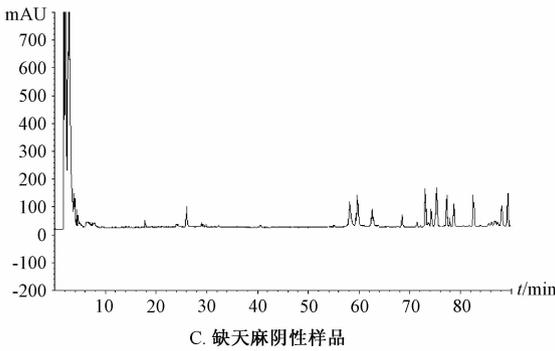
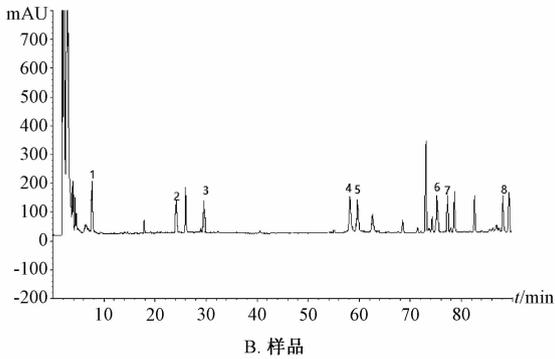
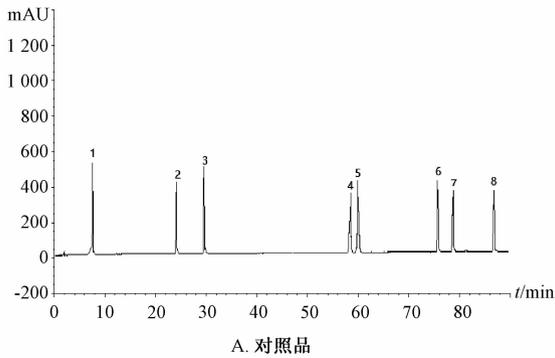
2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，制得 6 个质量浓度溶液，依次进样 20 μ L，平行 2 次。以峰面积积分值的自然对数为纵坐标（Y），进样量的自然对数为横坐标（X）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

| 成分 | 回归方程 | R ² | 线性范围/ μ g |
|----------------------|----------------------|----------------|---------------|
| 天麻素 | $Y = 2.756X + 4.385$ | 0.999 1 | 1.03 ~ 10.3 |
| 巴利森苷 A | $Y = 3.076X + 4.961$ | 0.999 3 | 1.07 ~ 10.7 |
| 巴利森苷 B | $Y = 3.221X + 5.100$ | 0.999 2 | 0.74 ~ 7.4 |
| 人参皂苷 Rg ₁ | $Y = 3.179X + 3.915$ | 0.999 4 | 1.13 ~ 11.3 |
| 人参皂苷 Re | $Y = 3.077X + 3.877$ | 0.999 2 | 0.92 ~ 9.2 |
| 人参皂苷 Rf | $Y = 3.143X + 4.405$ | 0.999 1 | 0.82 ~ 8.2 |
| 人参皂苷 Rb ₁ | $Y = 2.836X + 4.208$ | 0.999 1 | 1.05 ~ 10.5 |
| 人参皂苷 Rd | $Y = 2.928X + 4.115$ | 0.999 2 | 1.12 ~ 11.2 |



- 1. 天麻素 2. 巴利森苷 B 3. 巴利森苷 A 4. 人参皂苷 Rg₁
- 5. 人参皂苷 Re 6. 人参皂苷 Rf 7. 人参皂苷 Rb₁
- 8. 人参皂苷 Rd
- 1. gastrodin 2. parishin B 3. parishin A 4. ginsenoside Rg₁
- 5. ginsenoside Re 6. ginsenoside Rf 7. ginsenoside Rb₁
- 8. ginsenoside Rd

图1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

“2.1”项下方法连续进样6次,每次20 μL,测得天麻素、巴利森苷 B、巴利森苷 A、人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rd 峰面积 RSD 分别为 2.45%、2.17%、1.98%、2.58%、2.66%、2.03%、1.76%、2.30%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样 20 μL,测得天麻素、巴利森苷 B、巴利森苷 A、人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rd 峰面积 RSD 分别为 1.94%、1.91%、2.13%、2.31%、1.84%、1.75%、2.64%、2.24%,表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 精密称取同一份样品 2.0 g,平行 6 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定,测得天麻素、巴利森苷 B、巴利森苷 A、人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rd 峰面积 RSD 分别为 2.24%、1.92%、2.37%、2.16%、2.44%、1.69%、2.07%、2.63%,表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取同一批样品(20160802)约 1.0 g,按比例加入一定量对照品溶液(天麻素 1.03 mg/mL、巴利森苷 A 1.07 mg/mL、巴利森苷 B 0.74 mg/mL、人参皂苷 Rg₁ 1.13 mg/mL、人参皂苷 Re 0.92 mg/mL、人参皂苷 Rf 0.82 mg/mL、人参皂苷 Rb₁ 1.05 mg/mL、人参皂苷 Rd 1.12 mg/mL),按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定,计算加样回收率。结果,天麻素、巴利森苷 A、巴利森苷 B、人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rd 平均加样回收率分别为 97.54%、97.39%、97.49%、97.65%、97.79%、97.91%、96.94%、97.93%,RSD 分别为 2.48%、1.06%、2.20%、1.55%、1.86%、1.40%、1.48%、1.76%。

2.6 样品含有量测定 取 3 批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定,计算含有量,结果见表 3。

3 讨论

天泰 1 号片中人参为君药,人参皂苷作为其主要活性成分,本身具有紫外末端吸收的特征,课题组前期采用 HPLC-DAD 法在梯度洗脱条件下分析,发现存在较高的基线噪音和严重的基线漂移。蒸发光散射检测器(ELSD)作为一种浓度型检测器,其响应不依赖于被测物的光学特性及官能团,分析过程中流动相被气化蒸发,不影响样品检测,可充

2.5.2 精密度试验 取同一对照品溶液,按

表3 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

| 成分 | 批号 | | |
|----------------------|----------|----------|----------|
| | 20160802 | 20160823 | 20160918 |
| 天麻素 | 1.872 | 1.893 | 1.851 |
| 巴利森苷 A | 1.173 | 1.146 | 1.129 |
| 巴利森苷 B | 1.157 | 1.211 | 1.185 |
| 人参皂苷 Rg ₁ | 1.757 | 1.804 | 1.787 |
| 人参皂苷 Re | 1.719 | 1.692 | 1.703 |
| 人参皂苷 Rf | 1.492 | 1.533 | 1.572 |
| 人参皂苷 Rb ₁ | 1.762 | 1.811 | 1.785 |
| 人参皂苷 Rd | 1.610 | 1.575 | 1.603 |

分满足皂苷类成分分析的需要。

本实验考察了不同色谱柱 (Alltima C₁₈、Inertsil C₁₈、ACE C₁₈、Cosmosil C₁₈)、体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min)、柱温 (25、30、35、40 °C) 对分离效果及分析时间的影响,发现不同色谱柱对分离度无明显影响;柱温升高,分析时间缩短,分离度提高;体积流量提高,分离度降低。综合考虑色谱柱寿命及分离效果,最终选择色谱条件为体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 °C。

参考文献:

[1] 吴正治, 钟琪, 孙苏萍, 等. 天泰1号治疗轻度认知障碍前瞻性多中心随机双盲对照临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(3): 255-258.

[2] 李源, 刘颖, 袁海峰, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对阿尔茨海默病模型大鼠脑片磷酸化 Tau 蛋白及胆碱乙酰基转移酶表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(6): 1640-1641.

[3] 王莹莹, 宋修云, 王奇, 等. 人参皂苷 Rg₁ 通过抗氧化应激保护冈田酸诱导的 PC12 细胞损伤[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(10): 1064-1070.

[4] 张潇丹. 人参皂苷 Rg₁ 对阿尔兹海默病大鼠认知功能障碍的作用及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.

[5] 李玲. 人参皂苷 Rd 对阿尔茨海默病模型的神经保护作用及机制探讨[D]. 西安: 第四军医大学, 2012.

[6] 宋锦秋, 陈晓春, 张静, 等. 人参皂苷 Rb₁ 通过 JNK/p38 MAPK 途径减轻 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的胎鼠皮层神经元 tau 蛋白过度磷酸化[J]. 药学报, 2008, 43(1): 29-34.

[7] 贾立云, 潘晓华, 刘晶, 等. 人参皂苷 Rb₁、Re 对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用[J]. 山东大学学报: 医学版, 2011, 49(4): 33-37.

[8] 陈立敏. 人参皂苷 Re 基于多靶点理论的抗阿尔茨海默病作用研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.

[9] 白华静. 人参皂苷对中风后神经干细胞增殖、分化的作用和机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[10] 周楠楠, 朱燃, 赵雪梅, 等. 天麻素抑制小鼠大脑内 Aβ 斑块形成及其作用机制[J]. 药学报, 2016, 51(4): 588-594.

[11] 王艳. 天麻素对脂多糖诱导 PC12 细胞氧化应激保护作用的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2012.

[12] 徐鹏, 冯素香, 赵迪, 等. HPLC-ELSD 法测定血塞通注射液中心三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rd[J]. 中成药, 2013, 35(3): 521-524.