

高效液相色谱法同时测定中成药红药片中5种成分

李敏¹, 赵健², 白钢钢^{1△}

(1. 江苏省泰州市食品药品检验所, 江苏 泰州 225300; 2. 武警安徽总队医院, 安徽 合肥 230000)

摘要:目的 建立中成药红药片的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法对中成药红药片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 进行含量测定。色谱柱采用 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), 柱温为 25 ℃, 流动相 A 为乙腈溶液, B 为水, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 203 nm。结果 三七皂苷 R_1 进样量线性范围为 0.056 06 ~ 0.420 50 mg ($r=0.999\ 1$), 加样回收率为 96.60%, RSD 为 0.62% ($n=6$); 人参皂苷 R_{g1} 进样量线性范围为 0.227 50 ~ 1.706 20 mg ($r=0.999\ 1$), 加样回收率为 99.64%, RSD 为 0.59% ($n=6$); 人参皂苷 R_e 进样量线性范围为 0.030 87 ~ 0.231 60 mg ($r=0.999\ 3$), 加样回收率为 100.21%, RSD 为 2.90% ($n=6$); 人参皂苷 R_{b1} 进样量线性范围为 0.241 30 ~ 1.809 80 mg ($r=0.999\ 0$), 加样回收率为 100.52%, RSD 为 1.07% ($n=6$); 人参皂苷 R_d 进样量线性范围为 0.059 31 ~ 0.444 80 mg ($r=0.999\ 1$), 加样回收率为 101.61%, RSD 为 2.72% ($n=6$)。结论 该方法准确、快捷、重复性好、简单易行, 可用于中成药红药片的质量控制。

关键词: 红药片; 高效液相色谱法; 三七皂苷; 人参皂苷

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)09-0016-04

Simultaneous Determination of Five Constituents in Chinese Patent Drug "Hongyao Tablets" by HPLC

Li Min¹, Zhao Jian², Bai Ganggang¹

(1. Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300; 2. Anhui General Hospital of Armed Police Forces, Hefei, Anhui, China 230000)

Abstract: Objective To establish a method for content determination of Chinese patent drug "Hongyao Tablets". **Methods** The contents of notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g1} , ginsenoside R_e , ginsenoside R_{b1} , ginsenoside R_d in Hongyao Tablets were determined by HPLC method. The chromatographic column was waters XBridge C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), the column temperature was 25 ℃, the mobile phase A was acetonitrile solution, B was water, gradient elution, the flow rate was 0.8 mL/min, and the detection wavelength was 203 nm. **Results** Notoginsenoside R_1 showed a good linear relationship within the range of 0.056 06 ~ 0.420 50 mg ($r=0.999\ 1$), the average recovery rate was 96.60%, the RSD was 0.62% ($n=6$). Ginsenoside R_{g1} showed a good linear relationship within the range of 0.227 50 ~ 1.706 20 mg ($r=0.999\ 1$), the average recovery rate was 99.64%, the RSD was 0.59% ($n=6$). Ginsenoside R_e showed a good linear relationship within the range of 0.030 87 ~ 0.231 60 mg ($r=0.999\ 3$), the average recovery rate was 100.21%, the RSD was 2.90% ($n=6$). Ginsenoside R_{b1} showed a good linear relationship within the range of 0.241 30 ~ 1.809 80 mg ($r=0.999\ 0$), the average recovery rate was 100.52%, the RSD was 1.07% ($n=6$). Ginsenoside R_d showed a good linear relationship within the range of 0.059 31 ~ 0.444 80 mg ($r=0.999\ 1$), the average recovery rate was 100.61%, the RSD was 2.72% ($n=6$). **Conclusion** The method is accurate, quick, reproducible, simple and feasible, which can be used for the quality control of Hongyao Tablets.

Key words: Hongyao Tablets; HPLC; notoginsenoside; ginsenoside

中成药红药片由三七、红花、当归、川芎、白芷和土鳖虫 6 味中药组成, 具有活血止痛、祛瘀生新功效, 临床

第一作者: 李敏, 女, 硕士研究生, 初级中药师, 主要从事中药检验, (电子信箱)544393951@qq.com。

△通信作者: 白钢钢, 男, 硕士研究生, 初级中药师, 主要从事中成药检验及鉴定, (电子信箱)bggyxyky@163.com。

- [7] 赵玉华, 崔晓娟, 樊萍, 等. 丹参葛根对药不同提取方法薄层特征比较研究[J]. 中医药临床杂志, 2011, 23(10): 900-901.
- [8] 黄超华, 吴杰, 路妃静. 山楂中熊果酸的提取与分离[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(6): 459-460.
- [9] 谷春霞. 益肝散中丹参和川芎的薄层色谱鉴别[J]. 北方药学, 2014, 11(4): 13-14.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 31, 76-77, 229.
- [11] 王立新, 吴启南, 彭国平. 泽泻中 23-乙酰泽泻醇 B 的含量测定研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2002, 18(2): 105-107.
- [12] 巩丽萍, 王少云, 侯准, 等. 泽泻薄层色谱鉴别研究[J].

- 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1628-1629.
- [13] 刘海容. 葛根清肠颗粒质量控制方法研究[J]. 中国药业, 2011, 20(11): 28-29.
- [14] 杨峰亮, 汤颖斐, 虞和永. HPLC 测定十味玉泉胶囊中葛根素的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 576-577.
- [15] 张伏军, 须建, 尹小玲. 益阴消渴滴丸质量标准研究[J]. 中国药业, 2014, 23(14): 51-52.
- [16] 吴晶, 高星, 张瑜, 等. 葛根素结构改造研究进展[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(12): 741-743.
- [17] 张彤, 徐莲英, 陶建生, 等. 多指标综合评分法优选葛根提取工艺[J]. 中草药, 2004, 35(1): 38-40.

(收稿日期: 2018-02-11)

主要用于跌打损伤、筋骨淤血肿痛、风湿麻木^[1]。方中三七为主药,可散瘀止血、消肿定痛,临床主要用于各种内、外出血,胸腹刺痛,跌扑肿痛^[2]。人参皂苷和三七皂苷是三七的生物活性成分,但在红药片部颁标准中无其含量测定项目。三七的含量测定有薄层扫描法、高效液相色谱(HPLC)-蒸发光散射测定法、HPLC法等,薄层扫描法的精密度和重复性均较差^[3],HPLC-蒸发光散射测定法在测定过程中不稳定。HPLC法更快速,分离效能高,结果准确可靠,重复性好,应用广泛,如2015年版《中国药典(一部)》中,三七药材的含量测定采用HPLC法测定人参皂苷R_{g1}、R_{b1}和三七皂苷R₁的含量^[2]。目前,关于红药片三七中皂苷类成分的HPLC法检测分析,大多以4个成分以下居多^[4-7],同时测定5个成分的报道相对较少,缺少对人参皂苷R_d的测定,且目前市场上有三七总皂苷对照品,相对于配制混合对照品,更简单、方便、快捷。为更好地控制中成药红药片的质量,保证临床用药的疗效,本研究中建立了中成药红药片5种主要生物活性成分的含量测定方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪,包括脱气泵、四元泵、自动进样器、2489UV 紫外检测器;Empower 色谱工作站;8200 型超声波清洗器(功率为 500 W,频率为 53 kHz,上海科导超声仪器有限公司);Milli-Q 型超纯水处理系统(美国 MILLIPORE 公司);Mettler AE-200 型电子天平(梅特勒公司);Mettler XS105DU 型电子天平(梅特勒公司)。

1.2 试药

红药片(抚顺青松药业有限公司,批号分别为 20161104,20170402,20170521);三七总皂苷对照品(批号为 110870-201603),人参皂苷 R_{g1}(纯度为 28.0%),人参皂苷 Re(纯度为 3.8%),人参皂苷 R_{b1}(纯度为 29.7%),人参皂苷 R_d(纯度为 7.3%),三七皂苷 R₁(纯度为 6.9%),均购于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

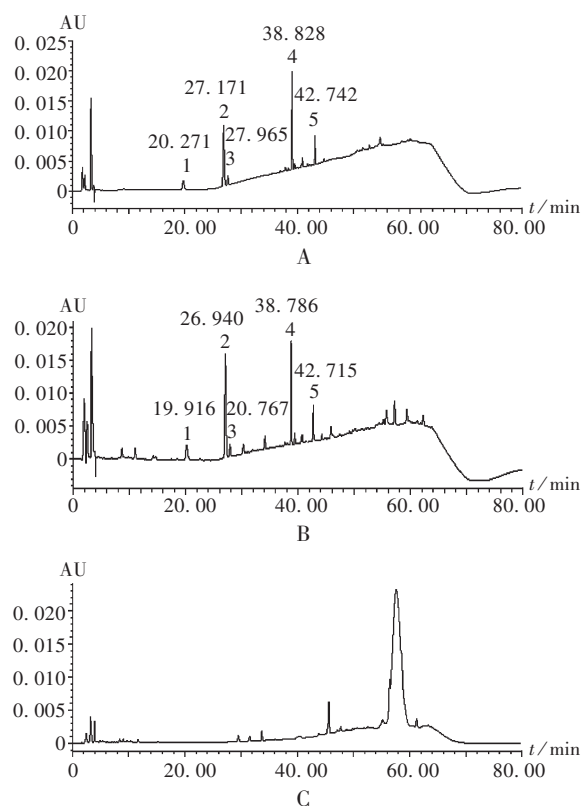
色谱柱:Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm);柱温:25℃;流动相:A 为乙腈溶液,B 为水,梯度洗脱(0~20 min 20% A,20~45 min 20%~46% A,45~55 min 46%~55% A,55~60 min 55% A,60~65 min 55%~20% A,65~80 min 20% A);流速:0.8 mL/min;检测波长:203 nm;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取三七总皂苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含三七皂苷 R₁ 28 μg、人参皂苷 R_{g1} 0.15 mg、人参皂苷 Re 15 μg、人参皂苷 R_{b1} 0.12 mg、人参皂苷 R_d 30 μg 的对照品溶液。取本品 10 片,研细,混匀,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水饱和正丁醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为 500 W,频率为 53 kHz)40 min,放冷,再称定质量,用水饱和的正丁醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,置分液漏斗中,用正丁醇饱和的氨试液洗涤 2 次(25 mL,15 mL),弃去氨试液,再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次(25 mL,15 mL),弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取缺三七药材的阴性样品,按供试品溶液项下方法制备,即得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取缺三七药材的阴性样品,依法制备溶液并进样测定,记录色谱图,结果阴性对照品溶液无干扰。详见图 1。



1. 三七皂苷 R₁ 2. 人参皂苷 R_{g1} 3. 人参皂苷 Re
4. 人参皂苷 R_{b1} 5. 人参皂苷 R_d
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

线性关系考察:取对照品溶液,分别进样 2,5,8,10,12,15 μL ,记录峰面积,计算回归方程,详见表 1。

表 1 线性关系考察结果

成分	回归方程	r	线性范围(mg)
R_1	$Y=9.0512 \times 10^3 X + 2.2842 \times 10^3$	0.999 1	0.056 06 ~ 0.420 50
R_{g1}	$Y=4.1840 \times 10^4 X + 1.5294 \times 10^4$	0.999 1	0.227 50 ~ 1.706 20
Re	$Y=5.2120 \times 10^3 X + 1.6889 \times 10^3$	0.999 3	0.030 87 ~ 0.231 60
R_{b1}	$Y=3.0999 \times 10^4 X + 1.8086 \times 10^4$	0.999 0	0.241 30 ~ 1.809 80
Rd	$Y=9.6275 \times 10^3 X + 5.9471 \times 10^3$	0.999 1	0.059 31 ~ 0.444 80

注: R_1 为三七皂苷 R_1 , R_{g1} 为人参皂苷 R_{g1} , Re 为人参皂苷 Re, R_{b1} 为人参皂苷 R_{b1} , Rd 为人参皂苷 Rd。下表均同。

精密度试验:取对照品溶液,连续进样 6 次,记录色谱峰面积值。结果的 RSD 依次为 0.71% , 0.23% , 0.31% , 0.18% , 0.60% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下同一供试品溶液,分别在

0,2,4,6,8,10,12,16,20,24 h 时进样,记录峰面积。结果 5 种成分峰面积的 RSD 分别为 1.46% , 1.08% , 1.34% , 0.90% , 1.88% ($n=10$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号 20161104)样品 6 份,依法平行制备,测定。结果,三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} , Re, R_{b1} , Rd 每片平均含量分别为 0.20, 0.88, 0.096, 0.58, 0.16 mg, RSD 分别为 2.43% , 1.28% , 1.01% , 1.66% , 3.69% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号 20161104)样品,研细,称取 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别加入三七皂苷 R_1 (0.070 g/L)、人参皂苷 R_{g1} (0.28 g/L)、人参皂苷 Re (0.039 g/L)、人参皂苷 R_{b1} (0.30 g/L)、人参皂苷 Rd (0.074 g/L) 的对照品溶液 3 mL,依法制备,测定。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果 ($n=6$)

成分	取样量(mg)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
R_1	0.251 4	0.200 9	0.210 0	0.404 0	96.71	96.60	0.62
	0.255 6	0.204 2	0.210 0	0.408 0	97.05		
	0.253 1	0.202 2	0.210 0	0.403 3	95.76		
	0.250 8	0.200 4	0.210 0	0.402 2	96.10		
	0.249 8	0.199 6	0.210 0	0.402 4	96.57		
	0.250 1	0.199 8	0.210 0	0.404 3	97.38		
R_{g1}	0.251 4	0.879 4	0.840 0	1.714 2	99.38	99.64	0.59
	0.255 6	0.894 1	0.840 0	1.731 0	99.63		
	0.253 1	0.885 3	0.840 0	1.728 4	100.37		
	0.250 8	0.877 3	0.840 0	1.708 7	98.98		
	0.249 8	0.873 8	0.840 0	1.706 8	99.17		
	0.250 1	0.874 6	0.840 0	1.717 3	100.32		
Re	0.251 4	0.084 0	0.117 0	0.204 3	102.82	100.21	2.90
	0.255 6	0.085 4	0.117 0	0.199 2	97.26		
	0.253 1	0.084 5	0.117 0	0.205 4	103.33		
	0.250 8	0.083 8	0.117 0	0.200 2	99.49		
	0.249 8	0.083 4	0.117 0	0.202 6	101.88		
	0.250 1	0.083 5	0.117 0	0.196 4	96.50		
R_{b1}	0.251 4	0.586 8	0.900 0	1.476 3	98.83	100.52	1.07
	0.255 6	0.596 6	0.900 0	1.499 4	100.31		
	0.253 1	0.590 7	0.900 0	1.494 8	100.46		
	0.250 8	0.585 4	0.900 0	1.495 0	101.07		
	0.249 8	0.583 0	0.900 0	1.502 0	102.11		
	0.250 1	0.583 7	0.900 0	1.486 8	100.34		
Rd	0.251 4	0.162 2	0.222 0	0.382 1	99.05	101.61	2.72
	0.255 6	0.164 9	0.222 0	0.385 0	99.14		
	0.253 1	0.163 2	0.222 0	0.383 7	99.32		
	0.250 8	0.161 8	0.222 0	0.393 9	104.55		
	0.249 8	0.161 1	0.222 0	0.389 3	102.79		
	0.250 1	0.161 3	0.222 0	0.3940	104.82		

2.4 样品含量测定

取3批样品,依法制备溶液并测定,按外标校正因子法计算含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg, $n=4$)

批号	R ₁	R _{g1}	Re	R _{b1}	R _d
20161104	0.20	0.88	0.096	0.58	0.16
20170402	0.18	0.82	0.091	0.52	0.13
20170521	0.22	0.93	0.103	0.68	0.24

3 讨论

本研究中所测的人参皂苷类成分,在常温条件下稳定不易分解,可常温保存,但供试品溶液在蒸干过程中,温度蒸干,几乎没有三七总皂苷成分。三七皂苷类成分的稳定性相关的研究表明,高温对三七总皂苷的影响较大,在高温条件下,三七总皂苷极易分解,样品应密封,阴凉暗干燥处储存^[4,8-9]。

本研究中对流动相系统进行了选择,分别对乙腈-0.05%磷酸溶液(20:80)^[10]、乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78)^[11]、甲醇-水(55:45),发现人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 Re 几乎很难分开,且人参皂苷 R_d 相对其他成分,极性小,出峰时间比较靠后,洗脱时间长,故应考虑梯度洗脱方法。参考2015年版《中国药典(一部)》三七药材含量测定的色谱条件,使用乙腈-水梯度洗脱,结果人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 Re 分离度低,且人参皂苷 R_d 未分离出来。采用人参皂类成分多选用的乙腈-水为流动相^[12],梯度洗脱 115^[13],80,65 min^[14],结果梯度洗脱 80 min 时,出峰快,待测组分能和共存组分达到基线分离,基线平稳,且色谱峰具有较好的对称性,故选用 80 min 的梯度洗脱程序。

色谱条件的考察中,温度对人参皂苷类成分的影响也很大,温度高色谱峰会拖尾,温度低有的色谱峰会有前沿,最终确定色谱柱的最佳温度为 25℃^[15]。本研究中选择色谱柱是 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm),1.0 mL/min 的流速在梯度洗脱中致色谱柱压力偏高。通过优化试验,最终采用 0.8 mL/min 的流速既满足柱压又符合分离要求。

为达到让样品有更大的提取效率,前处理过程分别对称样量和提取方式进行了考察。提取方式分别考察了加热回流(2 h)和超声处理 2 种^[16],发现超声处理含量明显偏高,说明三七总皂苷生物活性成分在前处理过程中应避免高温加热过程,故使用超声处理。分别比较超声 30,40,60 min,发现超声处理 40 min 时提取效率最高,故超声处理 40 min。称样量分别称取约 0.2,0.3,0.4,0.5,0.7,1.0 g 样品,超声处理 40 min,结果称取约

0.5 g 时样品提取效率最佳。

综上所述,HPLC 法同时测定中成药红药片中的三七皂苷 R₁ 及人参皂苷 R_{g1},Re,R_{b1},R_d 的含量,各成分在 80 min 内检测完全,方法精密度、准确度、重复性好,对该制剂的质量控制具有重要意义。

参考文献:

- [1] WS₃-B-4028-98,中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十分册)[S].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:11-12.
- [3] 冯雅斌,杜 靓,温 静,等. 薄层色谱法在药物分析中的应用及研究进展[J]. 疾病监测与控制杂志,2011,5(1):60-62.
- [4] 郑丽华,卢昌均,周志坤,等. HPLC 测定三七总皂苷中 5 种皂苷的含量及稳定性考察[J]. 中医药临床杂志,2012,24(1):73-75.
- [5] 王德旺,马坤芳,季宏建. HPLC 法测定红药片中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 的含量[J]. 南京医科大学学报,2006,26(12):1292-1294.
- [6] 段 瑞,沙东旭,杨 文. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定红药片中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 R_{g1}、Re、R_{b1} 的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(5):376-379.
- [7] 王 敏,马玉梅. HPLC 法测定跌打红药片三七药材中人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 及三七皂苷 R₁ 的含量[J]. 中国民族民间医药,2012,12(23):29-31.
- [8] 陈木洲,刘延辉,黄 姬,等. 酸碱度对人参皂苷提取率及其稳定性影响分析[J]. 中国实用医药,2011,6(20):146-147.
- [9] 余潇苓,苗 青,方翠芬. 人参皂苷水溶液热稳定性研究[J]. 中国现代应用药学,2011,28(12):1109-1112.
- [10] 张文杰,白旭东. HPLC 测定红药片中人参皂苷 R_{g1} 的含量[J]. 中华中医药学刊,2007,25(5):1059-1060.
- [11] 齐胡堂,周向阳. HPLC 法测定跌打红药片中人参皂苷 R_{g1} 的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1924-1925.
- [12] 陈开杰. HPLC 法同时测定参附注射液中人参皂苷 R_{g1}、R_{b1} 的含量[J]. 中国药房,2014,25(40):3827-3828.
- [13] 谢 华,王 砚,王钢力,等. 参附注射液中人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 Re 的含量测定[J]. 华西药学杂志,2006,21(2):208-209.
- [14] 南 国,张 鹏,王 萌,等. HPLC 法测定稳心颗粒中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、R_{b1}、R_d 与党参炔苷的含量[J]. 天津中医药,2016,33(7):434-436.
- [15] 陆 娟,李绪文,魏 巍,等. RP-HPLC 测定生脉注射液中 7 个人参皂苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(12):2302-2304.
- [16] 张建伟,赵 倩,何希荣,等. HPLC 测定中成药中人参皂苷类成分含量的应用概况[J]. 南京医科大学学报,2014,20(17):228-231.

(收稿日期:2017-12-09;修回日期:2017-12-27)