

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.18.009

高效液相色谱法同时测定血塞通片中5种皂苷类成分含量*

李敏, 叶慧[△], 陈骁鹏, 姜玮, 吴芸

(江苏省泰州市食品药品监督管理局, 江苏 泰州 225300)

摘要:目的 建立同时测定血塞通片中三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} , R_e , R_{b1} , R_d 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 XBridge C_{18} 柱 (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μ m), 流动相为乙腈-水 (梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 203 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L。结果 三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} , R_e , R_{b1} , R_d 检测进样量分别在 0.055 ~ 7.371 mg、0.196 ~ 26.197 mg、0.028 ~ 3.686 mg、0.207 ~ 27.592 mg、0.057 ~ 7.570 mg 范围内与峰面积线性关系良好, r 均大于 0.999 5 ($n=3$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%; 平均回收率分别为 98.76%、99.38%、96.02%、99.69%、99.85%, RSD 分别为 1.30%、2.31%、1.74%、0.60%、1.72% ($n=6$); 样品中各成分总含量占标示量百分比介于 74.44% ~ 90.93% ($n=3$)。结论 该方法简便可行, 结果准确可靠稳定, 重复性好, 可用于血塞通片中 5 种皂苷类成分的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法; 血塞通片; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_{g1} ; 人参皂苷 R_e ; 人参皂苷 R_{b1} ; 人参皂苷 R_d ; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)18-0024-03

Simultaneous Determination of Five Ginsenosides in Xuesaitong Tablets by HPLC

LI Min, YE Hui, CHEN Xiaopeng, JIANG Wei, WU Yun

(Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g1} , ginsenoside R_e , ginsenoside R_{b1} , ginsenoside R_d in Xuesaitong Tablets. **Methods** The chromatographic column was XBridge C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μ m), the mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C and the sample size was 10 μ L. **Results** The notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g1} , ginsenoside R_e , ginsenoside R_{b1} and ginsenoside R_d showed good linear relationship with peak area in the ranges of 0.055 ~ 7.371 mg, 0.196 ~ 26.197 mg, 0.028 ~ 3.686 mg, 0.207 ~ 27.592 mg and 0.057 ~ 7.570 mg, $r > 0.999 5$ ($n=3$). $RSDs$ of precision, stability and repeatability tests were less than 2%. The average recoveries were 98.76%, 99.38%, 96.02%, 99.69% and 99.85%, $RSDs$ were 1.30%, 2.31%, 1.74%, 0.60% and 1.72% ($n=6$). In the samples, the percentage of total content of each component in the labeled amount was in the range of 74.44% ~ 90.93% ($n=3$). **Conclusion** The method is simple, feasible, accurate, reliable, stable and reproducible. It can be used for the simultaneous determination of five ginsenosides in Xuesaitong Tablets.

Key words: HPLC; Xuesaitong Tablets; notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_{g1} ; ginsenoside R_e ; ginsenoside R_{b1} ; ginsenoside R_d ; content determination

*基金项目: 江苏省食品药品监管科研项目 [苏食药监法科<2018>84号-26]。

第一作者: 李敏, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为中成药质量标准, (电子信箱) 544393951@qq.com。

[△]通信作者: 叶慧, 女, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为中成药质量标准及中药材鉴定, (电话) 0523-86200636 (电子信箱) qinglanyiyi@126.com。

- 品微生物限度检查: 微生物计数法解读[J]. 药物分析, 2016, 36(6): 1101-1107.
- [3] 马仕洪, 刘鹏, 杨利红, 等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中灭菌方式的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 877-882.
- [4] 曹晓云, 郭艳娟. 药品微生物限度检查方法验证试验及相关技术的问题[J]. 天津药学, 2006, 18(16): 49-51.
- [5] 庞云娟, 樊文研, 刘康连, 等. 药品微生物限度检查方法学验证的研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2137-2140.
- [6] 达朝荣, 陈建强. 药品微生物限度误差影响因素分析[J]. 北方药学, 2016, 13(1): 177-178.
- [7] 江东英, 胡巧云. HPLC-UV法测定不同厂家甲硝唑片的含量和溶出度[J]. 中国医药指南, 2012, 10(17): 100-101.
- [8] 邹云, 项中华, 洪天谷. 琥乙红霉素颗粒微生物限度检查方法验证研究[J]. 安徽医药, 2009, 13(3): 269-271.
- [9] 李芳, 刘冬玲, 刘浩, 等. 氟罗沙星胶囊微生物检查方法的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(6): 445-447.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 140-145.
- [11] 王艳, 裴志良, 刘株. 阿莫西林胶囊微生物限度检查方法的研究[J]. 中国药业, 2011, 20(7): 30-31.
- [12] 甘永琦, 朱斌. 盐酸头孢他美酯干混悬剂微生物限度检查方法的建立[J]. 中国药房, 2015, 26(9): 1274-1276.
- [13] 徐巍巍, 肖利红, 姚福鑫. 二代大环内酯类抗生素微生物限度检查法研究[J]. 煤炭与化工, 2015, 38(8): 75-77.
- [14] 刘绪平, 肖钦钦, 陈希, 等. 阿奇霉素胶囊新版药典微生物限度检查方法的建立[J]. 中国医药科学, 2016, 6(17): 37-39.

(收稿日期: 2019-04-11)

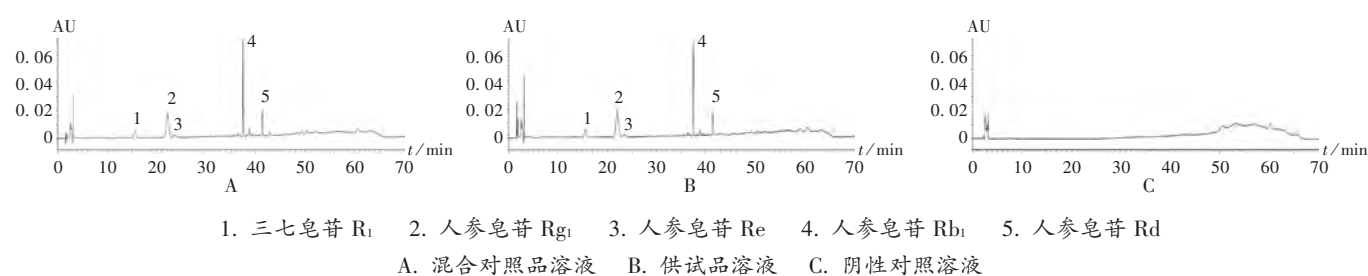


图1 高效液相色谱图

血塞通片主要成分为三七药材中的三七总皂苷,有活血祛瘀、通脉活络功效,其现行标准^[1]含量测定项以紫外-可见分光光度法测定三七总皂苷的含量^[2]。本研究中建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定血塞通片中5种皂苷类成分的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity Arc 高效液相色谱仪,包括 Empower 3 工作站、四元梯度泵、2998 型二极管阵列检测器、自动进样器和柱温箱(美国 Waters 公司);8200 型超声波清洗器(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);XS105DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

三七皂苷 R_1 对照品(批号为 110745-201318,含量 94.0%),人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号为 110703-201530,含量 91.7%),人参皂苷 R_e 对照品(批号为 110754-201626,含量 97.4%),人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号为 110704-201424,含量 93.7%),人参皂苷 R_d 对照品(批号为 111818,含量 92.1%),均购自中国食品药品检定研究院;血塞通片(云南安特纳制药股份有限公司,批号分别为 170516、160412、170937;湖南湘雅制药有限公司,批号为 1704101;昆药集团血塞通药业股份有限公司,批号为 161227;湖南绅泰春药业有限公司,批号为 20150701、20160301);乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:XBridge C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm, 3.5 μ m);流动相:乙腈溶液(A)-水(B),梯度洗脱(0~20 min 时 20% A, 20~45 min 时 20% A → 46% A, 45~55 min 时 46% A → 55% A, 55~60 min 时 55% A, 60~62 min 时 55% A → 20% A, 62~70 min 时 20% A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长:203 nm;进样量:10 μ L。各相邻成分之间分离度较好($R > 1.5$),理论板数按人参皂苷 R_{g1} 峰计应不低于 5 000。

2.2 溶液制备

称取各对照品适量,精密称定,加甲醇制成含三七

皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 的混合对照品溶液。取样品 10 片,除去包衣,称定质量,研细,混匀,取约 40 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,溶解并定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按样品处方取缺三七总皂苷的适量赋形剂制成阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下混合对照品溶液及阴性对照溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,在各待测成分峰处阴性对照无干扰,详见图 1。

线性关系考察:取混合对照品溶液适量,加甲醇稀释成不同质量浓度,按 2.1 项下色谱条件分别进样 10 μ L,记录峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X , mg)为横坐标进行线性回归。结果见表 1。

表1 5个成分线性关系考察结果($n=3$)

待测成分	回归方程	r	线性范围 (mg)	检测限 (μ g/mL)	定量限 (μ g/mL)
三七皂苷 R_1	$Y = 2.6746 \times 10^5 X - 4.2172 \times 10^3$	0.9998	0.055 ~ 7.371	2.21	11.06
人参皂苷 R_{g1}	$Y = 3.4495 \times 10^5 X + 4.0654 \times 10^3$	0.9998	0.196 ~ 26.197	1.18	2.36
人参皂苷 R_e	$Y = 3.0229 \times 10^5 X - 2.3107 \times 10^3$	0.9996	0.028 ~ 3.686	1.11	4.21
人参皂苷 R_{b1}	$Y = 2.6221 \times 10^5 X + 1.6426 \times 10^4$	0.9999	0.207 ~ 27.592	0.41	1.66
人参皂苷 R_d	$Y = 2.6868 \times 10^5 X + 3.6400 \times 10^3$	0.9998	0.057 ~ 7.570	0.51	1.36

定量限与检测限考察:精密吸取混合对照品溶液适量,加甲醇逐级稀释,进样测定,以信噪比(S/N) ≥ 10 测定各成分定量限,以 $S/N \geq 3$ 测定各成分检测限。结果见表 1。

精密度试验:取 2.2 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录峰面积。结果三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 色谱峰面积的 RSD 分别为 0.34%, 0.25%, 0.23%, 0.26%, 0.24% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:吸取同一供试品溶液(批号为 170516),室温下分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样,记录峰面积。结果三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 的色谱峰面积的 RSD 分别为 0.83%, 0.56%, 1.23%, 0.78%, 1.04% ($n=8$),表明供试品溶液室温下放置 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批样品(批号为170516)6份,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果三七皂苷 R_i 及人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{e_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的平均含量分别为每片 9.74, 33.75, 4.51, 34.18, 8.75 mg, RSD 分别为 1.00%, 0.87%, 1.82%, 0.82%, 0.77% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为170516),研细,称取6份,每份约20 mg,精密称定,再精密加入一定质量浓度的混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果($n=6$)

待测成分	取样量 (mg)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
三七皂苷 R_i	21.78	1.171 5	1.167 1	2.328 9	99.17	98.76	1.30
	19.26	1.036 0	1.167 1	2.187 8	98.69		
	21.21	1.140 9	1.167 1	2.289 3	98.40		
	20.50	1.102 7	1.167 1	2.253 7	98.62		
	19.71	1.060 2	1.167 1	2.190 4	96.84		
	20.03	1.077 4	1.167 1	2.253 9	100.81		
人参皂苷 R_{g_1}	21.78	4.061 1	3.519 7	7.680 6	102.84	99.38	2.31
	19.26	3.591 2	3.519 7	7.034 1	97.82		
	21.21	3.954 8	3.519 7	7.385 9	97.48		
	20.50	3.822 4	3.519 7	7.277 0	98.15		
	19.71	3.675 1	3.519 7	7.134 0	98.27		
	20.03	3.734 8	3.519 7	7.315 7	101.74		
人参皂苷 R_e	21.78	0.542 5	0.508 6	1.046 8	99.15	96.02	1.74
	19.26	0.479 8	0.508 6	0.963 7	95.14		
	21.21	0.528 3	0.508 6	1.010 8	94.87		
	20.50	0.510 7	0.508 6	0.997 9	95.79		
	19.71	0.491 0	0.508 6	0.972 6	94.69		
	20.03	0.498 9	0.508 6	0.989 5	96.46		
人参皂苷 R_{b_1}	21.78	4.113 1	3.859 2	7.992 3	100.52	99.69	0.60
	19.26	3.637 2	3.859 2	7.465 6	99.20		
	21.21	4.005 5	3.859 2	7.820 4	98.85		
	20.50	3.871 4	3.859 2	7.717 7	99.67		
	19.71	3.722 2	3.859 2	7.574 2	99.81		
	20.03	3.782 6	3.859 2	7.645 1	100.09		
人参皂苷 R_d	21.78	1.052 7	0.977 3	2.057 7	102.83	99.85	1.72
	19.26	0.930 9	0.977 3	1.905 1	99.68		
	21.21	1.025 2	0.977 3	2.010 1	100.78		
	20.50	0.990 9	0.977 3	1.951 6	98.30		
	19.71	0.952 7	0.977 3	1.915 1	98.48		
	20.03	0.968 2	0.977 3	1.935 8	99.01		

2.4 样品含量测定

取7批样品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以外标法计算样品中5种成分的含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

批号	标示量 (mg/片)	含量(mg/片)					总含量/标示量(%)	
		三七皂苷 R_i	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_e	人参皂苷 R_{b_1}	人参皂苷 R_d	总含量	标示量
170516	100	9.74	33.75	4.51	34.18	8.75	90.93	90.93
160412	25	2.07	7.23	0.95	7.36	1.94	19.55	78.20
170937	100	8.38	26.83	3.96	28.37	7.32	74.86	74.86
1704101	25	2.09	7.40	0.67	6.91	1.72	18.79	75.16
161227	100	9.38	32.26	4.52	30.10	7.13	83.39	83.39
20150701	25	2.07	6.93	0.84	6.67	2.10	18.61	74.44
20160301	50	3.87	13.35	1.91	14.92	4.46	38.51	77.02

3 讨论

采用甲醇作为提取溶剂,分别超声30 min和直接溶解,进样,比较峰面积,结果直接溶解的提取率更高,可能是由于超声过程中皂苷类分解加速,故选用直接溶解^[3-4]。分别称取10, 20, 30, 40, 50 mg样品,直接溶解,进样,比较峰面积,结果40 mg的提取效率最高。

2015年版《中国药典(二部)》西洋参药材检测中以乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱,结果人参皂苷 R_d 出峰太快,分离度差,且分离时间过长。查阅有关文献^[5-7],发现大多选用乙腈-水为流动相,同时血塞通片以三七总皂苷为原料药,样品色谱图中杂质峰相对较少,考虑到人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_e 分离度不佳,以及人参皂苷 R_d 极性小、出峰时间晚的问题,通过对梯度洗脱程序的调整,最终选用70 min的梯度洗脱系统。

综上所述,本HPLC法简便可行,准确可靠,重复性好,结果稳定,可用于血塞通片中5种皂苷类成分的同时测定。

参考文献:

- [1] WS₃-B-4028-98,卫生部药品标准·中药成方制剂(第十七册)[S].
- [2] 袁恣敏. 血塞通片不能完全替代原药材三七[J]. 中国医药指南,2012,10(36):579-580.
- [3] 张高菊,沈勇,孟珍贵,等. HPLC法测定姜状三七5种皂苷含量[J]. 药物分析杂志,2016,36(3):500-504.
- [4] 代琪,罗霄,叶俏波. HPLC测定益安宁丸中西洋参和三七的有效成分[J]. 重庆中草药研究,2017(2):20-26.
- [5] 韩亚亮,古今,何新荣,等. HPLC法测定血塞通软胶囊中三七皂苷 R_i 及人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_b 的含量[J]. 中国药物应用与检测,2015,12(5):268-271.
- [6] 南国,张鹏,王萌,等. HPLC法测定稳心颗粒中三七皂苷 R_i 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 与党参炔苷的含量[J]. 天津中医药,2017,33(7):434-436.
- [7] 李敏,赵健,白钢钢. 高效液相色谱法同时测定中成药红药片中5种成分[J]. 中国药业,2018,27(9):16-19.

(收稿日期:2019-01-10)