

超高效液相色谱法测定三七总皂苷中三七皂苷 K

龚云麒, 高宏涛, 王乙鸿, 普俊学, 杨兆祥*

昆药集团股份有限公司, 云南 昆明 650106

摘要: 目的 建立三七总皂苷中三七皂苷 K 的超高效液相色谱 (UPLC) 测定的方法。方法 采用 Cosmosil Cholesterol 色谱柱 (50 mm×2.0 mm, 2.5 μm); 流动相: [水 - 乙腈 (85:15)] - 乙腈, 进行梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL。结果 三七皂苷 K 在 2.020~101.000 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 平均回收率为 99.50%, RSD 值为 1.35%。结论 建立的 UPLC 法操作简便、结果可靠、重复性好、专属性强, 可用于三七总皂苷中三七皂苷 K 的质量控制。

关键词: 三七总皂苷; 三七皂苷 K; 超高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)09-1072-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.09.005

Determination of notoginsenoside K in Notoginseng total saponins by ultra performance liquid chromatography method

GONG Yun-Qi, GAO Hong-Tao, WANG Yi-Hong, PU Jun-Xue, YANG Zhao-Xiang

Kunming Pharmaceutical Group Limited Corporation, Kunming 650106, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of notoginsenoside K in Notoginseng total saponins by ultra performance liquid chromatography (UPLC) method. **Methods** The determination was carried out on Cosmosil Cholesterol column (50 mm × 2.0 mm, 2.5 μm). The mobile phase consisted of [water - acetonitrile (85 : 15)] - acetonitrile with gradient elution at a flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelength was set 203 nm and the column temperature was at 30 °C with injection volume of 2 μL. **Results** Notoginsenoside K had good linearity in the ranges of 2.020 — 101.000 μg/mL ($r=0.9999$). The average recovery was 99.50% with RSD of 1.35%. **Conclusion** The method has simple operation, accurate results, good reproducibility, and specificity which can be used in the quantity control of notoginsenoside K in Notoginseng total saponins effectively.

Key words: Notoginseng total saponins; notoginsenoside K; UPLC

三七总皂苷为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的主根或根茎加工制成^[1]。目前以三七总皂苷为原料的制剂有口服剂和注射剂, 其中三七总皂苷注射剂广泛用于卒中偏瘫、瘀血阻络、脑血管疾病后遗症和视网膜中央静脉阻塞等疾病的治疗^[2-4]。三七中含有二醇型皂苷三七皂苷 K, 该化合物具有显著的溶血活性, 能够增强被卵白蛋白免疫的小鼠体内有丝分裂原诱导和卵白蛋白诱导的脾细胞扩增^[5]。为了快速、准确地测定三七总皂苷中三七皂苷 K, 本课题组制备了三七皂苷

K 对照品^[6]。本研究采用超高效液相色谱 (UPLC) 法对三七总皂苷中三七皂苷 K 进行了测定, 为完善三七总皂苷及其注射剂质量控制研究以及提高三七总皂苷注射剂的安全性提供科学依据。

1 实验材料

1.1 样品

取三七药材粗粉, 加乙醇提取, 提取液滤过、浓缩, 残留物加水溶解, 滤过, 滤液通过 D₁₀₁ 型大孔吸附树脂, 先以水洗脱, 再以 60%乙醇洗脱, 收集 60%乙醇洗脱液, 滤过, 滤液浓缩至干, 即得

收稿日期: 2015-06-05

基金项目: 云南省科技计划项目 (2012ZA002)

作者简介: 龚云麒 (1981—), 男, 云南安宁人, 工程师, 从事植物有效成分提取研究。Tel: (0871)6810002 E-mail: gongyun911@163.com

*通信作者 杨兆祥, 男, 云南剑川人, 高级工程师, 硕士生导师, 学士, 从事新药开发研究。Tel: (0871)68183902 E-mail: yangzxy@163.com

三七总皂苷，共 10 批。三七皂苷 K 对照品由昆药集团股份有限公司提供，质量分数为 98.7%

1.2 仪器及试剂

Waters H-Class 超高效液相色谱仪, 5510E-DTH 型超声波清洗器 (美国必能信公司), XP205 型分析天平 (梅特勒 - 托利多公司)。乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 甲醇为分析纯, 水为注射用水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Cosmosil Cholester 色谱柱 (50 mm×2.0 mm, 2.5 μm); 流动相: [水 - 乙腈 (85 : 15)] (A) - 乙腈 (B), 进行梯度洗脱, 见表 1; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL。理论塔板数按三七皂苷 K 峰计算应不低于 5 000。

表 1 三七皂苷 K 的梯度洗脱程序

t /min	A/%	B/%
0	94	6
10	94	6
17	83	17
25	60	40
30	94	6
35	94	6

2.2 对照品溶液的制备

精密称取三七皂苷 K 对照品适量, 加甲醇溶解并稀释制成 20 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取三七总皂苷 0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

2.4 线性关系考察

精密称取三七皂苷 K 对照品 10.1 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 制成 0.10 mg/mL 储备液。分别精密量取储备液适量, 配制成 2.020、5.050、10.100、20.200、40.400、101.000 μg/mL 溶液, 进样, 测定峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归计算, 得到线性方程 $Y=490.0 X-315.0$, $r=0.999 9$ 。结果表明三七皂苷 K 在 2.020~101.000 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 稳定性试验

取批号 2013011 三七总皂苷样品, 制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定三七

皂苷 K 峰面积, 结果其 RSD 值为 0.15%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 精密度试验

取 10.1 μg/mL 三七皂苷 K 对照品溶液, 连续进样 7 次, 测定三七皂苷 K 峰面积, 结果其峰面积的 RSD 值为 0.56%。

2.7 重复性试验

取批号 2013011 三七总皂苷样品, 平行取样 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定三七皂苷 K 的峰面积值, 计算三七皂苷 K 的质量分数, 结果其 RSD 值为 1.58%。

2.8 回收率试验

精密称取批号 2013011 三七总皂苷样品 0.1 g, 共 9 份, 分别加入三七皂苷 K 对照品 0.84、1.05、1.26 mg, 制备供试品溶液, 进样测定三七皂苷 K 峰面积值, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.50%, RSD 值为 1.35%。

2.9 样品测定

分别取 10 批三七总皂苷样品, 各 0.1 g, 平行取样 2 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 以外标法计算三七皂苷 K 的质量分数, 色谱图见图 1, 结果见表 2。

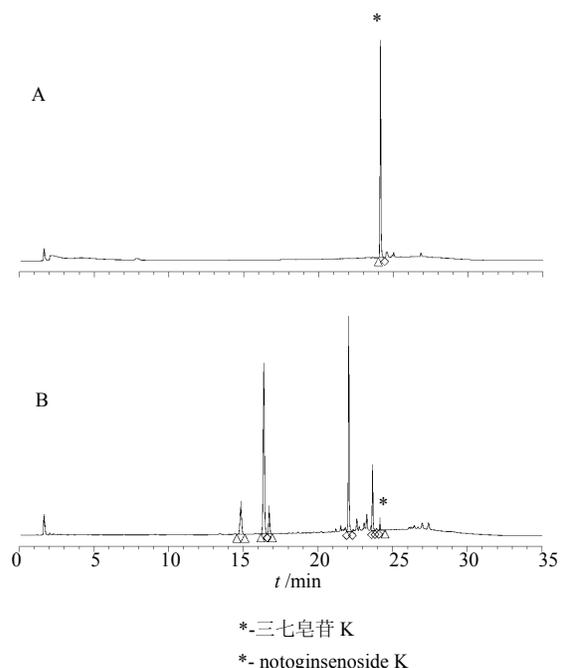


图 1 三七皂苷 K 对照品 (A) 和三七总皂苷样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of notoginsenoside K reference substance (A) and Notoginseng total saponins samples (B)

表 2 三七总皂苷样品中三七皂苷 K 的测定结果

Table 2 Determination of notoginsenoside K in Notoginseng total saponins

批 号	三七皂苷 K/%	批 号	三七皂苷 K/%
2013011	0.27	2014006	0.16
2013012	0.28	2014007	0.12
2013013	0.25	2014008	0.14
2013014	0.27	2014009	0.17
2013015	0.24	2014010	0.15

3 讨论

参考了三七总皂苷高效液相色谱测定方法,对流动相进行筛选,最终确定在乙腈-水系统中,本品保留时间适宜,峰形和分离度均达到要求。

本实验采用 UPLC 法测定了三七总皂苷中三七皂苷 K,结果显示,建立的 UPLC 法操作简便、结果可靠、重复性好、专属性强,可用于三七总皂苷中三七皂苷 K 的质量控制。结合三七皂苷 K 具有显

著的溶血活性,本实验为三七总皂苷及其注射剂的质量提升和安全性提升提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S].一部. 2010: 369-370.
- [2] 刘荣东,翟小燕,黄香君,等.三七总皂苷注射剂对痹证疼痛老年人血瘀指标的影响 [J].中国老年学杂志, 2010, 30(13): 1802-1804.
- [3] 刘荣东,翟小燕,黄香君,等.三七总皂苷注射剂改善老年人痹证疼痛及生命质量的研究 [J].辽宁中医药大学学报, 2010, 12(7): 21-24.
- [4] 王莹,褚扬,李伟,等.三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J].中草药, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [5] Sun H X, Qin F, Ye Y P. Relationship between haemolytic and adjuvant activity and structure of protopanaxadiol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Vaccine*, 2005, 23(48-49): 5533-5542.
- [6] 龚云麒,王珺,高宏涛,等.三七皂苷 K 对照品的制备研究 [J].现代药物与临床, 2014, 29(8): 869-871.