

UFLC 法测定复方丹参片中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1}

陈繁华¹, 曾玉梅¹, 邹伟魁¹, 吴苏杭², 谭姗娇³

1. 梅州市食品药品监督管理局, 广东 梅州 514071

2. 广东环境保护工程职业学院, 广东 佛山 528216

3. 嘉应学院医学院, 广东 梅州 514031

摘要: 目的 探索建立超快速液相色谱 (UFLC) 法测定复方丹参片中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 。方法 采用 SHIMADZU Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm×75 mm, 1.6 μ m) 色谱柱; 以乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱; 体积流量为 0.4 mL/min; 检测波长为 203 nm; 进样体积为 3 μ L。结果 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 分别在 0.025 7~0.257 0、0.101 2~1.012 0、0.104 4~1.044 0 μ g 与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 96.7%、98.1%、98.8%。结论 本方法在 15min 内可以将三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 有效分离, 节省了大量人力和流动相的消耗, 为中药的质量控制技术提供参考方法。

关键词: 超快速液相色谱; 复方丹参片; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_{g1} ; 人参皂苷 R_{b1}

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)03-0260-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.016

Determination of notoginsenoside R_1 , ginsenosides R_{g1} and R_{b1} in Compound Danshen Tablet by UFLC

CHEN Fan-hua¹, ZENG Yu-mei¹, WU Wei-kui¹, WU Su-hang², TAN Shan-jiao³

1. Meizhou Institute for Food And Drug Control, Meizhou 514071, China

2. Guangdong Environmental Protection Engineering Vocational College, Foshan 528216, China

3. Medical College of Jiaying University, Meizhou, 514031, China

Abstract: Objective To establish the quantitative method of notoginsenoside R_1 , ginsenosides R_{g1} and R_{b1} in Compound Danshen Tablet by ultra-fast liquid chromatography (UFLC). **Methods** This assay was performed on Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (75 mm × 2.0 mm, 1.6 μ m) column with acetonitrile-water as mobile phase in gradient elution at a flow rate of 0.4 mL/min; And the detection wavelength was 203 nm. The injection volume was 3 μ L. **Results** The linear of notoginsenoside R_1 , ginsenosides R_{g1} and R_{b1} had good linearity within the range of 0.025 7—0.257, 0.101 2—1.012, and 0.104 4—1.044 μ g. And their average recovery ratios were 96.7%, 98.1%, and 98.8%. **Conclusion** UFLC method may greatly improve the separation efficiency and analysis speed in the case of notoginsenoside R_1 , ginsenosides R_{g1} and R_{b1} in Compound Danshen Tablet while reducing the solvent consumption. As an alternative of conventional HPLC, UPLC is more convenient, fast, and feasible.

Key words: UFLC; Compound Danshen Tablet; notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_{g1} ; ginsenoside R_{b1}

超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC)/超快速液相色谱 (ultra fast liquid chromatography, UFLC) 技术是近年发展起来的一种新的分析技术。与传统的采用粒度 5 μ m 的色谱柱填料的 HPLC 技术比较, UPLC/UFLC 技术能获更高的柱效, 并且在更宽的线速度范围内柱保持恒定, 因而有利于提高流动相速度, 缩短分析时间, 提高分析通量^[1]。杨先启等^[2]采用 UPLC 测

定人参中人参皂苷 R_e 、 R_{g1} 和 R_{b1} 的含量, 唐军等^[3]采用 UPLC 法测定 5 种皂苷成分的含量, 均取得了较好的试验效果。有研究^[4-5]表明, UPLC/UFLC 技术非常适宜用于复杂成分, 尤其是中药体系的分析测定, 国内对该技术的研究应用尚处于起步阶段, 相关的文献报道还较少。

复方丹参片由丹参、三七和冰片 3 味中药组成, 具有活血化瘀、理气止痛的功效, 其质量标准收载

收稿日期: 2014-01-13

作者简介: 陈繁华(1981—), 男, 主管药师, 主要从事药品检验和质量标准研究工作。Tel: (0753)2319696 13750551253 E-mail: fanhuac@163.com

于《中国药典》2010年版一部^[6],标准仅对丹参的功效成分丹参酮II_A和丹酚酸B采用HPLC法测定,对三七的质量控制仅收录了薄层色谱鉴别方法。本文以三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁及Rb₁作为三七质量控制的指标成分,采用UPLC分离技术对上述3种成分进行测定,为中药的质量控制技术提供参考方法。

1 仪器与试剂

SHIMADZU LC—30AD UPLC 系统(包括真空脱气机、四元梯度泵、自动进样器、DAD 检测器); Sartorius BP 211D 电子分析天平; KQ—250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

三七皂苷R₁对照品(批号110745-200617); 人参皂苷Rg₁对照品(批号110703-200726); 人参皂苷Rb₁对照品(批号110704-200420)均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水。复方丹参片样品规格为: 每片重0.32克(相当于饮片0.6克), 均广州白云山和记黄埔中药有限公司生产, 为市场监督抽样(批号为C3A026、D3A012、D3A019)。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁及Rb₁对照品适量, 加甲醇制成含三七皂苷R₁ 0.051 4 mg/mL、人参皂苷Rg₁ 0.202 4 mg/mL、人参皂苷Rb₁ 0.208 8 mg/mL的混合溶液。

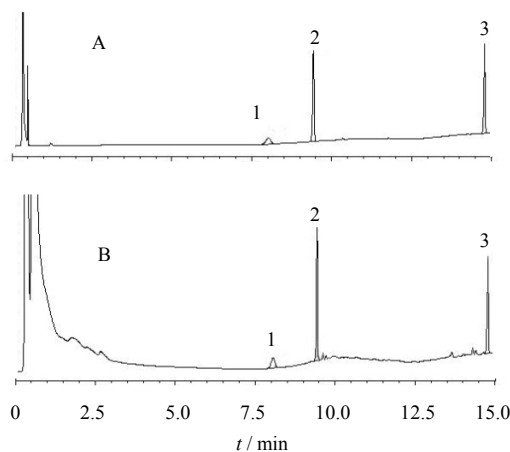
2.2 供试品溶液的制备

取本品10片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇50 mL, 称定质量, 超声处理(功率250 W, 频率33 kHz) 30 min, 放冷, 用70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

2.3 色谱条件

色谱柱: SHIMADZU Shim-pack XR-ODS III (75 mm×2.0 mm, 1.6 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱(0~5.5 min, 19:81; 5.5~8.5 min, 19:81~29:71; 8.5~10.5 min, 29:71; 10.5~15 min, 29:71~40:60), 体积流量0.4 mL/min, 柱温30℃, 检测波长203 nm, 进样量3 μL。分别精密吸取混合对照品、供试品溶液各3 μL, 按上述色谱条件进样测试。结果三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁色谱峰与相邻峰的分度度分别为7.93、1.83

和5.88, 符合系统适用性要求。色谱图见图1。



1-三七皂苷R₁; 2-人参皂苷Rg₁; 3-人参皂苷Rb₁
1-notoginsenoside R1; 2-ginsenoside Rg1; 3-ginsenoside Rb1

图1 混合对照品(A)、供试品(B) UPLC 图
Fig. 1 UPLC chromatogram of mixed references (A) and sample of Compound Danshen Tablet (B)

2.4 线性关系的考察

分别精密吸取2.1项下混合对照品溶液0.5、1、2、3、5 μL, 注入超快速液相色谱仪, 以色谱峰峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X)为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程。三七皂苷R₁: $Y=2.5474 \times 10^5 X - 8.4123 \times 10^2$, $r=0.9997$, 线性范围为0.025 7~0.257 μg; 人参皂苷Rg₁: $Y=3.0243 \times 10^5 X - 2.5741 \times 10^3$, $r=0.9999$, 线性范围为0.101 2~1.012 μg; 人参皂苷Rb₁: $Y=2.2467 \times 10^5 X - 2.1357 \times 10^3$, $r=0.9999$, 线性范围为0.104 4~1.044 μg。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液3 μL, 连续进样6次, 测定三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁及Rb₁的峰面积, 其相对标准偏差RSD值分别为1.6%、0.9%、1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

称取供试品(批号C3A026)粉末约0.5 g, 共6份, 精密称定, 按2.2项下方法提取并测定三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁及Rb₁的峰面积。结果上述3种成分的质量分数分别为1.92、8.13、6.48 mg/片, RSD值分别为1.7%、0.8%、1.5%。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定, 结果三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁及Rb₁的RSD值分别为1.7%、1.1%、1.3%, 表明供

试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

称取供试品(批号 C3A026)粉末约 0.25 g, 共 6 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入相当于等量的混合对照品溶液适量, 按 2.2 项下方法提取制备, 测定含量并计算各组分回收率。结果三七皂苷 R_1 、人

参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 的加样回收率分别为 96.7%、98.1%、98.8%, RSD 值分别为 1.9%、1.5%、1.1%。

2.9 样品测定

取 3 个不同批次的复方丹参片按 2.2 项下的方法提取制备成供试品溶液, 进样测定。结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果

Table 1 Content determination of samples

批号	三七皂苷 R_1 / (mg·片 ⁻¹)	人参皂苷 R_{g1} / (mg·片 ⁻¹)	人参皂苷 R_{b1} / (mg·片 ⁻¹)
3A026	1.92	8.13	6.48
D3A012	1.88	7.95	6.87
D3A019	1.63	7.81	6.65

3 讨论

经查阅文献, 复方丹参片中三七皂苷类成分含量的报道较多^[7-9], 采用的 HPLC 方法测定耗时长, 分析时间大多在 60~100 min, 消耗了大量的人力、物力。本方法具有明显缩短检测时间、节约溶剂等优势, 在 15 min 内便可将三七中的三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 完全分离, 并具有良好的准确度、重复性和稳定性。

UPLC/UFLC 多采用 10 mm 光程(与普通 HPLC 相同)而池体积仅为 500 nL(约为 HPLC 池体积的 1/20)的新型光纤导流通池^[10], 因此进样量减少为 1/10。经试验, 当进样体积大于 5 μ L 时, 三七皂苷 R_1 色谱峰出现分叉现象, 建议进样体积控制在 0.5~5 μ L 比较合适。

运用 UPLC 测定中药复方制剂成分的含量,《中国药典》2010 年版一部已有收载, 复方丹参滴丸中丹参素的含量项目即采用该方法测定, 但收载 UPLC 或者 UFLC 的方法还很少。本文方法操作简单, 结果准确, 可作为三七药材质量控制的方法, 同时也为中药的质量控制技术提供参考方法。

参考文献

[1] 曾祥林, 曾智. 超高效/高分离度快速/超快速液相色谱技术在分析领域中的应用 [J]. 医药导报, 2010,

29(7): 909.

- [2] 杨先启, 卓开华, 陈军, 等. RRLC 法分离分析人参中的人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 和人参皂苷 R_{b1} [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1144-1146.
- [3] 唐军, 武为宝. 超高效液相快速色谱法快速测定血栓通注射液 5 种皂苷成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 97-99.
- [4] 金高娃, 章飞芳, 薛兴亚, 等超高效液相色谱在复杂体系中中药分离分析中的应用 [J]. 世界科学技术—中药现代化, 2006, 8(3): 106-111.
- [5] 杨义芳. 超高效高分离度快速超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1259-1263.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [7] 曾荣华, 邓雪媚, 卢慧娴, 等. HPLC 测定复方丹参片中三七总皂苷的含量 [J]. 中国医药指南, 2010, 2(8): 21.
- [8] 陆继伟, 于建, 王柯, 等. 复方丹参片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的 HPLC 法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(12): 1027.
- [9] 冯中, 李晓燕, 刘波, 等. HPLC 测定不同厂家复方丹参片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_e 、 R_{g1} 、 R_{b1} 含量 [J]. 中成药, 2009, (31): 72.
- [10] 胡海燕, 朱馨乐, 胡昊, 等. 超高效液相色谱简介及应用比较 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(4): 48-50.