

UPLC-UV 法测定注射用益气复脉(冻干)中人参皂苷 R_{g₁}、Re、Rb₁

王伯昊^{1,2}, 李洪英^{1,2}, 李德坤^{1,2}, 林梅^{1,2}, 胡靖^{1,2}, 鞠爱春^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

摘要: 目的 建立UHPLC-UV测定注射用益气复脉(冻干)(YQFM)中人参皂苷R_{g₁}、Re、Rb₁含量的方法。方法 采用Waters Xselect® HSS C₁₈ (3.0×150 mm, 2.5 μm) 色谱柱, 以0.05%磷酸溶液-乙腈为流动相梯度洗脱, 进样量为5 μL, 检测波长为203 nm, 柱温28 °C。进行线性关系考察, 重复性、中间精密度、准确性、耐用性试验。取10批YQFM, 按照本研究建立的方法和YQFM国家药品标准(YBZ07062006-2009Z-2015)中的HPLC含量测定法^[5]进行测定。结果 人参皂苷R_{g₁}、人参皂苷Re、人参皂苷Rb₁分别在0.019 37~0.387 40、0.020 32~0.406 40、0.050 00~0.999 9 mg/mL线性关系良好 ($R > 0.999 9$), 重复性、中间精密度、准确性、耐用性等均满足定量分析要求。含量测定结果与国家标准方法比较无明显差异。结论 研究建立的方法可用于人参皂苷R_{g₁}、Re、Rb₁含量的测定, 与传统的HPLC-UV法相比, 本方法具有分析速度快、节约溶剂等特点, 同时相较于UPLC-MS/MS法, 具有经济、简便的优势。

关键词: UPLC; 人参皂苷; 注射用益气复脉(冻干); 方法学

中图分类号: R285.6

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 08-1587-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.08.020

UPLC-UV method for analysis of Ginsenoside R_{g₁}, Re, and Rb₁ in Yiqi Fumai Lyophilized Injection

WANG Bohao^{1,2}, LI Hongying^{1,2}, LI Dekun^{1,2}, LIN Mei^{1,2}, HU Jing^{1,2}, JU Aichun^{1,2}

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To establish a UHPLC-UV method for the analysis of ginsenoside R_{g₁}, Re, and Rb₁ in Yiqi Fumai Lyophilized Injection. **Methods** The determination was achieved on a Waters Xselect® HSS C₁₈ column (3.0 mm×150 mm, 2.5 μm) with a gradient elution system of 0.05% phosphoric acid solution-acetonitrile. The injection volume was 5 μL with detection wavelength of 203 nm, column temperature was maintained at 28 °C. Linear relationship, repeatability, intermediate precision, accuracy and durability were tested. Ten batches of YQFM were selected and determined according to the method established in this study and the HPLC content determination method in YQFM national drug standard (YBZ07062006-2009Z-2015). **Results** Ginsenoside R_{g₁}, ginsenoside Re, Ginsenoside Rb₁ the linear relationship was good in the range of 0.019 37 — 0.387 40, 0.020 32 — 0.406 40, 0.050 00 — 0.999 90 mg/mL respectively ($r > 0.999 9$). Repeatability, intermediate precision, accuracy and durability meet the requirements of quantitative analysis. There was no significant difference between the content determination results and the national standard method. **Conclusion** The method can be used for the determination of Ginsenoside R_{g₁}, Re and Rb₁. Compared with HPLC-UV method, this method has the characteristics of fast analysis speed and solvent saving. At the same time, it has the advantages of economy and simplicity compared with UPLC-MS/MS method.

Key words: UPLC; Ginsenoside; Yiqi Fumai Lyophilized Injection; methodology

注射用益气复脉(冻干)(YQFM)是天津天士力之骄药业有限公司独家生产的中药注射制剂, 基于

中药经典方剂生脉散, 由红参、麦冬、五味子组成, 临床主要用于冠心病劳累型心绞痛气阴两虚证, 冠

收稿日期: 2020-05-27

基金项目: 天津市科技计划项目(18YFCZZC00430)

第一作者: 王伯昊(1996—), 男, 天津人, 大学本科, 研究方向为药物分析。Tel: (022)86342098 E-mail: wangbohao1996@163.com

*通信作者: 鞠爱春(1973—), 男, 正高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及生产管理。Tel: (022) 86342096 E-mail: juach@tasly.com

心病所致慢性左心功能不全II、III级气阴两虚症,具有确切疗效^[1-2]。在YQFM中,红参为君药,因此其皂苷类成分为主要的活性成分^[3]。YQFM国家药品标准(YBZ07062006-2009Z-2015)中以人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的含量测定作为皂苷类成分的定量评价指标,其液相检测方法需要70 min,时间长,耗费溶剂多。UPLC具有分析速度快的特点,已有分析方法文献使用UPLC-MS/MS法对YQFM中的人参皂苷进行快速定量测定^[4],但该方法仪器成本高,难以应用在日常生产检验过程中。因此,本研究使用最大耐受压力不大于 6×10^4 kPa的高效液相色谱仪进行测定,使在质量控制实验室进行快速高效的含量测定成为可能。

1 材料

Waters Arc-2489型高效液相色谱仪;Agilent 1260-VWD型高效液相色谱仪;Milli-Q Gradient型超纯水器;MS204TS型电子分析天平;XS105DU型电子分析天平。

人参皂苷Rg₁对照品(中国食品药品检定研究院,批号110703-201933,质量分数97.4%);人参皂苷Re对照品(中国食品药品检定研究院,批号110754-201626,质量分数91.4%);人参皂苷Rb₁对照品(中国食品药品检定研究院,批号110704-201726,质量分数91.1%);YQFM(天津天士力之骄药业有限公司,批号20190910、20190911、20190912、20200414、20200415、20200416、20200417、20200418、20200501、20200502、20200503);磷酸(科密欧,优级纯);甲醇(默克,色谱纯);乙腈(默克,色谱纯);超纯水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

Waters Xselect® HSS C₁₈ 色谱柱(3.0×150 mm, 2.5 μm);流动相:乙腈-0.05%磷酸溶液,梯度洗脱程序见表1;检测波长203 nm;柱温28 °C;进样体积5 μL。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure

t/min	体积流量/ (mL·min ⁻¹)	乙腈/%	0.05%磷酸 溶液/%
0~7.66	0.6	19	81
7.66~12.25	0.6	19→22	81→78
12.25~12.76	0.6→0.5	22	78
12.76~16.33	0.5	22→24	78→76
16.33~17.86	0.5	24→30	76→70
17.86~21.95	0.5	30→31	70→69
21.95~27.05	0.5	31→33	69→67
27.05~28.07	0.5	33→100	67→0
28.07~32.16	0.5	100	0
32.16~33.18	0.5	100→19	0→81
33.18~35.73	0.5	19	81

在上述色谱条件下,人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁与其相邻峰的分度均大于1.5,理论塔板数按人参皂苷Rg₁峰计应大于30 000。空白溶液、供试品与对照品的色谱图见图1。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取对照品人参皂苷Rg₁ 5 mg、人参皂苷Re 5 mg和人参皂苷Rb₁ 12.5 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇制成含人参皂苷Rg₁ 0.2 mg/mL、人参皂苷Re 0.2 mg/mL和人参皂苷Rb₁ 0.5 mg/mL的混合溶液,即得^[5]。

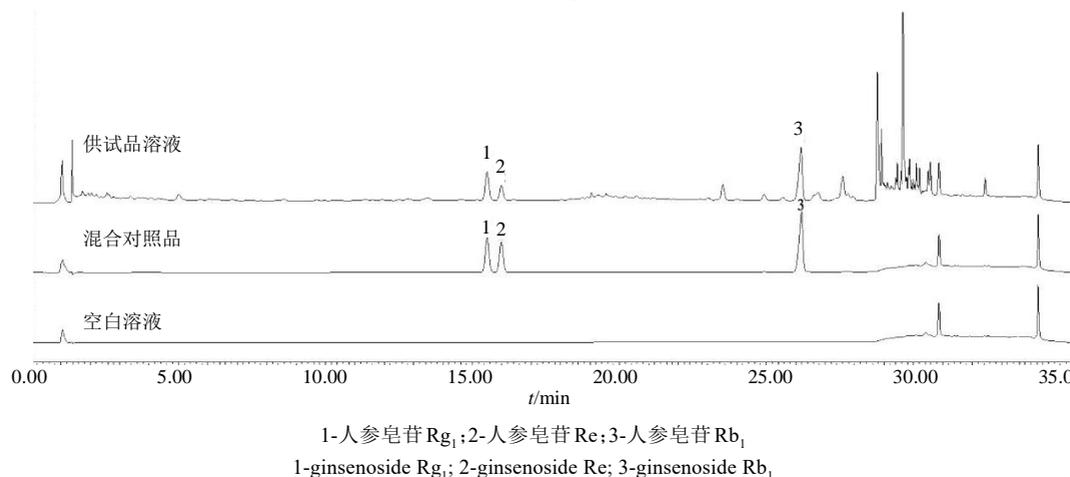


图1 供试品溶液、混合对照品、空白溶液的UHPLC图谱

Fig. 1 UHPLC spectra of sample solution, mixed reference solution and blank solution

2.3 供试品溶液的制备

取供试品1.3 g,精密称定,加30%甲醇溶液10 mL

使溶解,通过ProElut TMPLS SPE柱(500 mg/6 mL, 预先依次用0.5 mol/L氢氧化钠溶液、0.1 mol/L盐酸

溶液各 10 mL 洗脱,然后用水洗至洗脱液呈中性,再依次用甲醇、30% 甲醇各 10 mL 洗脱,备用),体积流量约 1 mL/min,弃去流出液,再依次用含 0.5 mol/L 的氢氧化钠的 30% 甲醇溶液 2 mL、30% 甲醇溶液 5 mL 洗脱,弃去流出液,最后用甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液至 5 mL 量瓶中至近刻度,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,即得^[5]。

2.4 线性关系考察

混合对照品储备液:精密称取对照品人参皂苷

Rg₁ 20 mg、人参皂苷 Re 20 mg、人参皂苷 Rb₁ 50 mg,置 50 mL 量瓶中,再加甲醇使溶解并定容,摇匀,制成含人参皂苷 Rg₁ 0.4 mg/mL、人参皂苷 Re 0.4 mg/mL 和人参皂苷 Rb₁ 1.0 mg/mL 的混合溶液,备用。

分别精密吸取混合对照品储备液适量,加甲醇稀释至不同质量浓度,摇匀,制得系列混合对照品溶液。按照“2.1”项下的色谱条件进样分析,记录峰面积,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得到回归方程及线性范围,结果见表 2, $R > 0.999$, 线性关系良好。

表 2 人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 的回归方程及线性范围

Table 2 Regression equation and linear range of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁

对照品	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	回归方程	R
人参皂苷 Rg ₁	0.019 4~0.387 4	$y=4\ 156\ 669.222\ 92x+1\ 582.546\ 93$	0.999 995
人参皂苷 Re	0.020 3~0.406 4	$y=3\ 424\ 383.608\ 22x+1\ 136.285\ 60$	0.999 995
人参皂苷 Rb ₁	0.050 0~0.999 9	$y=2\ 945\ 018.436\ 93x+4\ 977.678\ 70$	0.999 995

2.5 重复性试验

取同一批 YQFM,精密称取 6 份,按照“2.3”项下供试品溶液的制备方法和“2.1”项下色谱条件进行测定,计算样品中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 质量浓度及 RSD 值,RSD 值分别为 0.09%、0.23%、0.18%。符合检测要求。

2.6 中间精密度试验

取同一批 YQFM,按照“2.3”项中供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按照“2.1”项中色谱条件,由不同人员、不同仪器、不同日期进行分析测定,计算不同人员、不同日期使用不同仪器所测定成分含量的 RSD 值。

不同人员使用同一仪器在同一天进行测定,人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 含量 RSD 值为 0.27%、0.11%、0.010%;同一人员使用同一仪器在相隔一周进行测定,人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 含量 RSD 值为 1.3%、1.4%、1.2%;同一人员在同一天使用不同型号仪器(Waters Arc-2489 与 Agilent 1260-VWD)进行测定,人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 含量 RSD 值为 1.1%、1.1%、1.0%。

2.7 准确度试验

称取已知含量的 YQFM 约 0.65 g,精密加入不同质量浓度人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 混合对照品溶液 3 mL,超纯水 7 mL,按照“2.3”项中供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,每种浓度对照品溶液制备 3 份供试品,共 9 份,作为低(加入人参皂苷 Rg₁ 0.174 3 mg、人参皂苷 Re 0.182 85 mg、人参皂苷 Rb₁ 0.450 0 mg)、中(加入人参皂苷 Rg₁ 0.348 6 mg、人参

皂苷 Re 0.365 7 mg、人参皂苷 Rb₁ 0.900 0 mg)、高(加入人参皂苷 Rg₁ 0.581 1 mg、人参皂苷 Re 0.609 6 mg、人参皂苷 Rb₁ 1.500 0 mg)3 种浓度的供试品溶液,进样测定,人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 平均回收率分别为 98.89%、99.04%、98.45%,RSD 分别为 0.6%、0.4%、0.7%。

2.8 耐用性试验

取同一批 YQFM,通过不同色谱柱、不同柱温,进样测定,计算样品含量和 RSD 值,图谱见图 2、3。

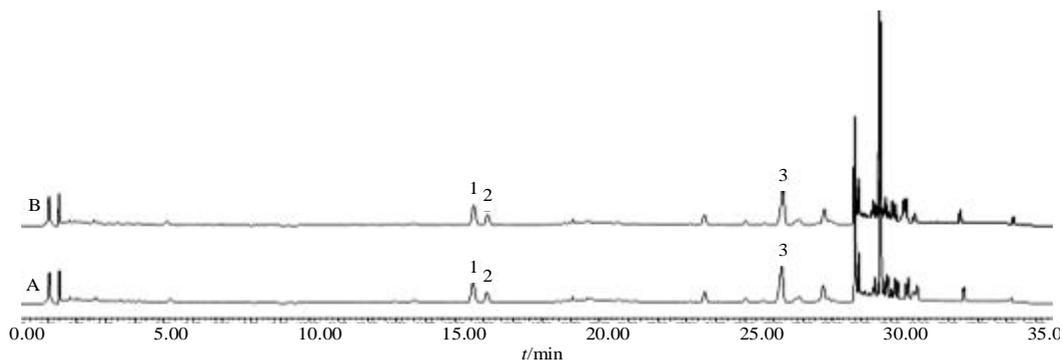
由图谱可看出,使用同一型号的 2 支不同颗粒批号的色谱柱进行测定,图谱基本一致,经过计算,人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 含量 RSD 值为 1.1%、0.8%、0.8%;在 23、28 和 33 °C 下进行测定,待测峰的保留时间均存在差异,在柱温为 23 °C 时,人参皂苷 Rg₁ 与相邻峰分离度为 1.37,无法满足系统适用性的要求,在柱温为 33 °C 时,虽然 3 个待测峰分离度较 28 °C 时均有所下降,但仍满足分离度 ≥ 1.5 的要求,经过计算,人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 含量 RSD 值为 1.6%、1.8%、1.7%。

2.9 样品测定

取 10 批 YQFM,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项中色谱条件和 YQFM 国家药品标准(YBZ07062006-2009Z-2015)中的 HPLC 含量测定法^[5]进行测定,2 种方法液相图谱见图 4。分别计算样品中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的质量分数,2 种测定方法结果基本一致,结果见表 3。

3 讨论

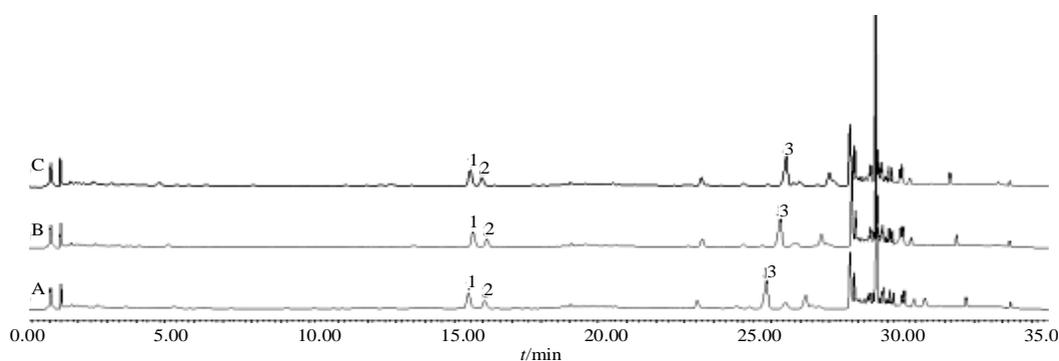
本试验建立的 UPLC-UV 方法由 YQFM 国家药



1-人参皂苷Rg₁;2-人参皂苷Re;3-人参皂苷Rb₁;A-Waters HSS C18,批号01193907015806;B- Waters HSS C18,批号01193915815509
1-ginsenoside Rg₁;2-ginsenoside Re;3-ginsenoside Rb₁;A-Waters HSS C18,SN: 01193907015806;B- Waters HSS C18,SN: 01193915815509

图2 使用不同颗粒批号色谱柱进样的UHPLC图谱

Fig. 2 UHPLC spectra of different particle batches chromatographic column injection

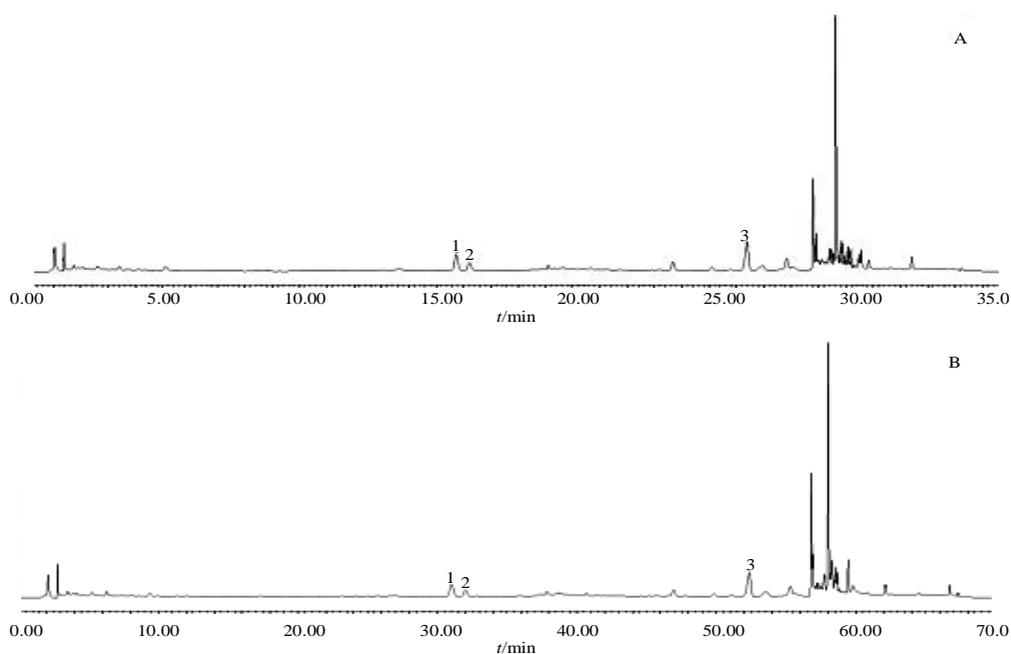


1-人参皂苷Rg₁;2-人参皂苷Re;3-人参皂苷Rb₁

1-ginsenoside Rg₁;2-ginsenoside Re;3-ginsenoside Rb₁

图3 在柱温为23 °C(A)、28 °C(B)、33 °C(C)时进样的UHPLC图谱

Fig. 3 UHPLC spectra of sample injection at 23 °C(A), 28 °C(B), 33 °C(C)



1-人参皂苷Rg₁;2-人参皂苷Re;3-人参皂苷Rb₁

1-ginsenoside Rg₁;2-ginsenoside Re;3-ginsenoside Rb₁

图4 UHPLC(A)和HPLC(B)供试品液相图谱

Fig. 4 sample chromatograms by UPLC(A) and HPLC(B)

表3 UPLC和HPLC法测定样品中人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re、人参皂苷R_{b1}的结果
Table 3 UPLC and HPLC determination of ginsenoside R_{g1}, ginsenoside Re and ginsenoside R_{b1} in samples

编号	人参皂苷R _{g1} /(mg·g ⁻¹)		人参皂苷Re/(mg·g ⁻¹)		人参皂苷R _{b1} /(mg·g ⁻¹)	
	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC
1	0.620 8	0.631 5	0.372 9	0.378 3	1.641 8	1.666 8
2	0.486 6	0.491 3	0.289 1	0.290 9	1.216 5	1.234 8
3	0.453 8	0.460 5	0.270 4	0.272 5	1.165 4	1.187 1
4	0.500 1	0.503 6	0.296 7	0.298 1	1.193 5	1.207 7
5	0.486 6	0.493 1	0.287 9	0.292 1	1.151 8	1.170 0
6	0.506 8	0.511 7	0.303 5	0.305 9	1.246 4	1.261 8
7	0.514 4	0.516 0	0.308 4	0.310 8	1.262 8	1.284 3
8	0.503 5	0.508 1	0.301 3	0.304 8	1.218 3	1.236 5
9	0.574 6	0.580 6	0.334 6	0.338 5	1.297 2	1.320 2
10	0.536 9	0.541 9	0.292 7	0.295 8	1.332 2	1.357 3

品标准(YBZ07062006-2009Z-2015)中含量测定方法转换而来,仅改变其色谱方法,对照品溶液和供试品溶液配制过程未改变。《中国药典》2015版HPLC通则中已明确允许色谱柱粒径改变,有关色谱柱粒径的改变规定为:若需使用小粒径(约2 μm)填充剂,输液泵的性能、进样体积、检测池体积和系统的死体积等必须与之匹配;如有必要,色谱条件也应做适当的调整^[6]。高青等^[7]提出方法转换时色谱柱最好采用同品牌,相同填料仅粒径不同的色谱柱,并且转换前后色谱柱的柱长/粒径值应保持一致。本实验室采用Waters Xselect® HSS C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱进行YQFM中人参皂苷R_{g1}、Re、R_{b1}的含量测定,故直接选择Waters Xselect® HSS C₁₈(3.0 mm×150 mm, 2.5 μm)色谱柱作为本次试验所用色谱柱。

为保证该方法在HPLC仪上能稳定运行,其梯度洗脱时最大压力最好不超过4×10⁴ kPa,经过测试,选择0.6 mL/min作为梯度洗脱的初始体积流量。梯度程序调整的依据是保持不同规格色谱柱的洗脱体积倍数相同^[7],即目标梯度段时间×目标体积流量/目标柱体积=原梯度段时间×原体积流量/原柱体积,通过此公式计算得出本试验梯度洗脱程序。在此基础上,降低进样量以避免溶剂效应的产生,调整柱温与以保证分离效果与原方法近似。

本试验建立的YQFM中人参皂苷R_{g1}、Re、R_{b1}UPLC-UV法,在其质量浓度范围内线性良好,测定样品的重复性、中间精密度、准确性、耐用性等均满足定量分析要求,含量测定结果与国家标准方法比较无明显差异,且分析时间短,可提高工作效率,缩短检验周期,并节约大量的有机溶剂。

参考文献

[1] 张崇荣,牛昱光,李欣,等.注射用益气复脉治疗气阴两虚型冠心病心绞痛临床疗效观察[J].中国医药指南,2016,14(8):211-212.
 [2] 窦新宇,冯晓敬.注射用益气复脉(冻干)治疗房颤气阴两虚症的临床观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(5):582-584.
 [3] 刘红宇,徐玉琴,欧阳婷,等.HPLC-Q-TOF-MS鉴定注射用益气复脉冻干粉中皂苷类成分[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(5):7-12.
 [4] 乔晓莉,肖学风,周大铮,等.UPLC-MS/MS法同时测定注射用益气复脉(冻干)中13中成分[J].中草药,2014,45(23):3402-3407.
 [5] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准(修订)颁布件[J].中国药品标准,2016,17(4):316-320.
 [6] 中国药典[S].四部.2015.
 [7] 高青,刘颖,钱忠直,等.超高效液相色谱与高效液相色谱方法转换及验证[J].药物分析杂志,2016,36(7):1279-1286.