

UPLC 测定 PNS 及血塞通注射液 5 个主要成分含量*

李永伟, 候懿娜, 王 真

(云南白药集团创新研发中心 / 云南省药物研究所 / 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: 目的 建立三七总皂苷及血塞通注射液超高效液相色谱 (UPLC) 测定的方法。方法 采用 Waters Guard column 色谱柱 (50mm×2.1mm, 1.7μm); 流动相: [水 - 乙腈] 进行梯度洗脱; 体积流量 0.5mL/min; 检测波长 203nm; 柱温 25℃; 进样量 2μL。结果 三七总皂苷及血塞通注射液中的 5 个成分在 0.002~0.817μg 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 平均回收率为 101.5%, RSD 值为 1.31%。结论 建立的 UPLC 法操作简便、结果可靠、重复性好、专属性强, 可用于三七总皂苷及血塞通注射液中 5 个主要成分的含量测定。

关键词: 三七总皂苷; 血塞通注射液; UPLC

中图分类号: R286.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)05-0014-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.05.004

超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 技术是近年发展起来的分析技术。与传统的 HPLC 分析技术比较, 具有高效、灵敏、快速的优势^[1]。研究^[2-3]表明, UPLC 技术非常适用于复杂成分, 尤其是中药体系的分析测定, 截至目前, 国内对该技术的研究应用尚不成熟, 相关文献报道较少。

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^[4]。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脑血管疾病后遗症、卒中偏瘫、瘀血阻络和视网膜中央静脉阻塞等疾病的治疗^[5-8]。唐军等^[9]采用 UPLC 法测定了血栓通注射液中 5 种皂苷成分的含量, 杨先启等^[10]采用 UPLC 测定人参中人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1 的含量, 均取得了较好的试验效果。前期已有大量文献采用 HPLC 方法对不同样品中的三七总皂苷进行了含量测定, 也有部分学者采用 UPLC 测定不同口服制剂中的三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Rb1 成分, 但是未见学者采用 UPLC 法同时对三七、三七总皂苷及血塞通注射液中的 5 个主要成分进行同时测定的报道, 为了节约检测成本、快速、准确地测定三七、三七总皂苷及血塞通注射液中 5 个

主要成分含量, 本研究在 2015 版《中国药典》的基础上, 同时参考了相关研究文献^[11-18], 建立了超高效液相色谱 (UPLC) 法同时对本单位生产制备的三七总皂苷及成品制剂中的 5 个主要成分统一进行了同时测定, 为完善三七总皂苷及其口服制剂与注射剂的质量控制, 提高三七总皂苷及其制剂产品的安全性提供科学依据。

1 实验材料

1.1 样品

三七总皂苷: 称取三七药材粗粉, 加 70% 乙醇提取, 提取液滤过、浓缩, 残留物加水溶解, 滤过, 滤液通过苯乙烯型非极性或弱极性共聚体大孔吸附树脂柱, 用水洗涤, 水洗液弃去, 以一定比例的乙醇洗脱, 洗脱液减压浓缩, 脱色, 精制, 减压浓缩至浸膏, 干燥, 即得三七总皂苷, 共 11 批 (YL20140813-YL20150503)。

血塞通注射液: 取三七总皂苷适量, 用注射用水适量溶解, 加针用活性炭脱色, 滤过, 分别加注射用水至总量, 调节 pH 值至 6.5 ± 0.5 , 滤过, 灌装, 融封, 灭菌, 即得血塞通注射液, 共 11 批 (ZJ20140813-ZJ20150503)。

1.2 仪器与试剂

Acquity UPLC System, 包括四元泵处理器、样品

* 基金项目: 云南省科技计划项目 (2015DG043)

收稿日期: 2016-07-18

作者简介: 李永伟 (1979-), 男, 云南昆明人, 博士, 工程师, 主要从事新药、食品及保健食品研究。E-mail: lyw9813@sina.com

处理器、柱温箱、PDA 检测器及 Empower 色谱工作站(Waters 公司);超声仪(昆山市超声仪器有限公司,KQ-100,100 W,40 KHz);Sartorius BP 211D 电子分析天平(上海肯强仪器有限公司);KQ-250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

三七总皂苷对照提取物(批号 110870-201002)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。三七总皂苷针用原料成品含量为 86%~91%,为课题组制备所得,共 11 批;血塞通注射液样品规格为:每支 100mg/2mL,共 11 批,为课题组制备所得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

仪器:Waters Acquity H-Class;柱温:25℃;检测

表 1 UPLC 梯度洗脱程序

	时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	A/%	B/%
梯度程序	0.0	0.5	80	20
	3.00	0.5	72	28
	7.00	0.5	65	35
	11.00	0.5	40	60
	13.00	0.5	30	70
	18.00	0.5	80	20
	24.00	0.5	80	20

表 2 5 个皂苷的线性方程、相关系数及范围

名称	线性方程	相关系数	线性范围/μg	检测限/μg	定量限/μg
三七皂苷 R1	$Y = 813242X + 294.67$	0.9998	0.018--0.534	0.0199	0.0663
人参皂苷 Rg1	$Y = 5E+06X - 12266$	0.9999	0.013--0.771	0.3702	1.2339
人参皂苷 Re	$Y = 5E+06X - 5172.8$	0.9997	0.002--0.061	0.0066	0.0219
人参皂苷 Rb1	$Y = 3E+06X - 19621$	0.9999	0.014--0.817	0.3848	1.2826
人参皂苷 Rd	$Y = 4E+06X - 579.16$	0.9998	0.003--0.167	0.0216	0.0721

2.5 稳定性试验

取批号 YL20141003 的三七总皂苷样品,制备供试品溶液,分别在 0、1、2、3、4、5 和 24h 进样测定 5 个三七皂苷(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)峰面积,结果其 RSD 值分别为 1.91%、0.64%、1.56%、0.84%、1.05%。结果表明供试品溶液在 24h 内稳定性良好。

取批号 ZJ20141003 的血塞通注射液样品,制备供试品溶液,分别在 0、1、2、3、4、5 和 24h 进样测定 5 个(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)三七皂苷峰面积,结果其 RSD 值分别为 1.65%、0.70%、1.66%、0.90%、1.12%。结果表明供试品溶液在 24h 内稳定性良好。

波长:203nm;色谱柱:Waters Guard column(50mm×2.1mm,1.7μm);流动相:水(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱,见表 1;理论塔板数按人参皂苷 Rg1 峰计算应不低于 6000。

2.2 对照提取物溶液的制备

精密称取三七皂苷对照提取物适量,加 70%甲醇溶解并稀释制成每 1mL 中约含 4.0mg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

三七总皂苷:备取三七总皂苷对照提取物适量,精密称定,加 70%甲醇溶解并稀释制成每 1mL 中含 4.0mg 的溶液,即得。

血塞通注射液:取本品适量,精密量取,加 70%甲醇溶解并稀释制成每 1mL 中约含 4.0mg 的溶液,即得。

2.4 线性关系、检测限及定量限考察

精密称取三七总皂苷对照提取物适量,加 70%甲醇制成 5.0mg/mL 储备液。分别精密量取储备液适量,配制成 10.0、50.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0μg/mL 溶液,进样,测定峰面积。以含量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归计算,分别得到 5 个主要成分的线性方程、检测限、定量限如表 2 所示。结果表明三七总皂苷在 0.002~0.817μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取 4.0mg/mL 三七总皂苷对照品溶液,连续进样 7 次,测定 5 个三七皂苷(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)峰面积,结果其 RSD 值分别为 0.49%、1.93%、1.98%、1.88%、1.88%。

2.7 重复性试验

取批号 YL2041002 的三七总皂苷样品,平行取样 6 份,制备供试品溶液,进样测定 5 个三七皂苷(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)峰面积,计算各成分的质量分数,结果其 RSD 值分别为 0.49%、1.43%、1.58%、1.28%、1.90%。

取批号 ZJ20141003 的血塞通注射液样品,平行取样 6 份,制备供试品溶液,进样测定 5 个三七皂苷(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)峰面积,计算各成分的质量分数,结果其 RSD 值分别为 1.59%、1.48%、1.64%、1.45%、1.95%。

2.8 回收率试验

精密称取批号 YL2041002 三七总皂苷样品 0.25g,共 6 份,分别加入三七皂苷对照品 0.24g,制备供试品溶液,进样测定 5 个三七皂苷(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)峰面积,计算回收率,结果各成分回收率分别为 102.45%、100.12%、100.06%、102.20%、101.86%、101.13%,平均回收率为 101.5%,RSD 值为 1.31%。

精密称取批号 ZJ20141003 的血塞通注射液样品 5.0mL,共 6 份,分别加入三七皂苷对照品 250mg,制备供试品溶液,进样测定 5 个三七皂苷(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)峰面积,计算回收率,结果各成分回收率分别为 101.60%、100.02%、100.14%、101.60%、100.86%、100.64%,平均回收率为 100.81, RSD 值为 0.68%。

2.9 样品测定

分别取 11 批三七总皂苷样品、11 批血塞通注射液样品适量,平行取样 2 份,制备供试品溶液,进样测定,以外标法计算 5 个三七皂苷(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)的质量分数,色谱图见图 1,结果见表 3、表 4。从表中可看出,5 个主要成分含量与三七总皂苷含量均符合 2015 版《中国药典》“三七总皂苷项下”的规定。

表 3 三七总皂苷原料中三七总皂苷的含量测定结果

批号	R1/%	Rg1/%	Re/%	Rb1/%	Rd/%	三七总皂苷含量/%
YL20140813	6.4	31.2	3.8	37.8	7.4	86.6
YL20140825	6.2	31.1	3.5	37.6	7.4	85.8
YL20140826	6.4	32	3.7	37.9	7.5	87.5
YL20140903	6.5	31.8	3.8	37.6	7.5	87.2
YL20140912	6.4	31.7	3.9	38	7.4	87.4
YL20141001	6.5	31.4	3.9	37.9	7.5	87.2
YL20141002	6.7	31.3	3.8	39.1	7.4	88.3
YL20141003	6.5	31.5	3.8	37.2	7.5	86.5
YL20150501	9.5	32.2	5.6	36.3	7.9	91.4
YL20150502	9.3	32.0	5.3	36.1	7.7	90.4
YL20150503	9.0	32.7	5.0	35.5	7.2	89.4

表 4 血塞通注射液中三七总皂苷的含量测定结果

批号	R1/%	Rg1/%	Re/%	Rb1/%	Rd/%	三七总皂苷含量/%
ZJ20140813	6.2	31.5	3.7	38.1	7.5	87.0
ZJ20140825	6.1	31.2	3.6	38.0	7.5	86.4
ZJ20140826	6.5	31.8	3.7	38.4	7.6	88.0
ZJ20140903	6.4	31.7	3.7	38.2	7.6	87.6
ZJ20140912	6.3	31.6	3.9	38.5	7.5	87.8
ZJ20141001	6.5	31.1	3.9	38.6	7.6	87.7
ZJ20141002	6.5	31.8	3.9	39.0	7.6	88.8
ZJ20141003	6.3	31.6	3.8	38.1	7.6	87.4
ZJ20150501	9.9	31.6	5.7	36.7	7.9	91.8
ZJ20150502	9.1	32.4	5.2	36.7	7.6	91.0
ZJ20150503	8.9	32.1	5.3	36.5	7.4	90.2

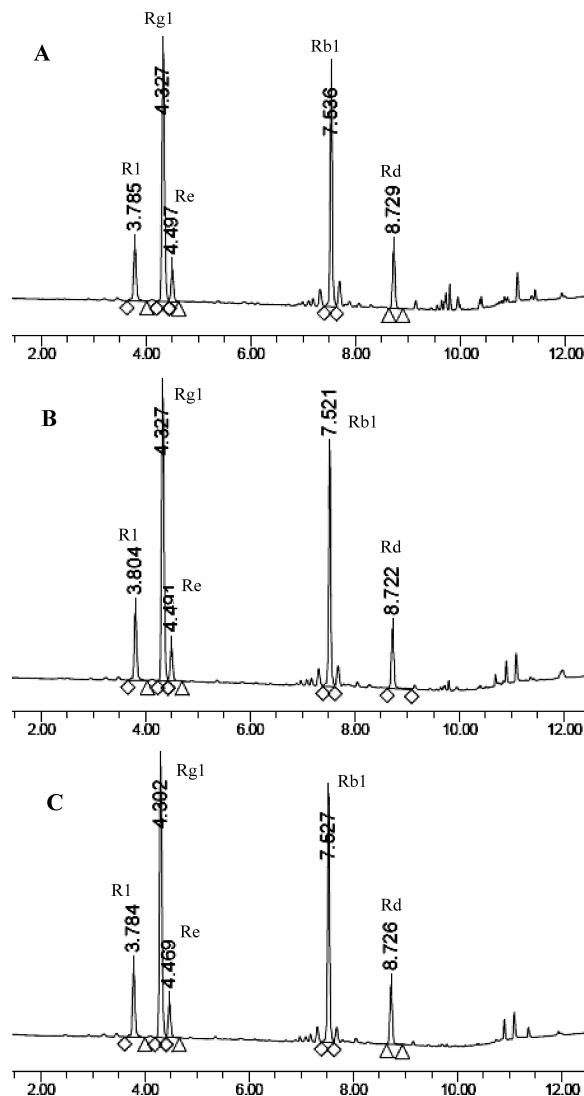


图 1 三七总皂苷对照品(A)、三七总皂苷原料(B)和血塞通注射液样品 UPLC 图谱(C)

3 讨论

本研究内容在参考了2015版《中华人民共和国药典》中收载的三七总皂苷高效液相色谱测定方法与前期的UPLC分析方法,对色谱条件进行了筛选和完善,并对分析方法进行了验证,最终确定了分析条件,并将建立的方法用于自制三七总皂苷、血塞通注射液的含量测定,结果显示,建立的UPLC分析方法与HPLC分析方法比较,检测时间仅需12min,具有高效、快速、准确等优点,对以往的研究内容进行了补充完善,可用于三七、三七总皂苷及其制剂中5个主要成分(R1、Rg1、Re、Rb1、Rd)的质量控制。

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] 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—中医药现代化, 2006, 8(3): 106-111.
- [3] 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.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015版一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 393-394.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七总皂苷成分及其药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [8] 臧妍妍, 李卫红, 郭晓谨, 等. 三七总皂苷对拟缺血损伤脑微血管内皮细胞转化生长因子-B血管内皮生长因子表达的影响[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(2): 1-4.
- [9] 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中5种皂苷成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 97-99.
- [10] 杨先启, 卓开华, 陈军, 等. RRLC法分离分析人参中的人参皂苷Rg1、人参皂苷Re和人参皂苷Rb1[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1144-1146.
- [11] 龚云麒, 高宏涛, 王乙鸿, 等. 超高效液相色谱法测定三七总皂苷中三七皂苷K[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(9): 1072-1074.
- [12] 王常顺, 刘永利, 王晓蕾, 等. UPLC-HPLC测定血栓通注射液中5个皂苷类成分含量的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1617-1620.
- [13] 张晓旭, 马雪涛, 胡蒙, 等. 超高效液相色谱法检测6种人参皂苷含量[J]. 中国食品学报, 2015, 15(5): 241-246.
- [14] 王邱, 冯毅凡, 芮雯, 等. UPLC-Q-TOFMS对三七中皂苷类成分的快速化学表征[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26: 1233-1239.
- [15] 孙英英, 郭玉海, 林华庆, 等. UPLC测定丹七片中三七皂苷R1、人参皂苷Rg1和人参皂苷Rb1的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 148-150.
- [16] 陈繁华, 曾玉梅, 郭伟魁, 等. UFLC法测定复方丹参片中三七皂苷R1、人参皂苷Rg1及Rb1[J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 260-262.
- [17] 陈菲, 林晓兰, 席海为, 等. UPLC-MS-MS同时测定中药活血益气方KLW中三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 156-159.
- [18] 谢耀轩, 林亚珠. 超高效液相色谱法测定三七中人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1和三七皂苷R1的含量[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(5): 489-492.

(编辑:徐建平)

Determination of Five Saponins in PNS and Sanqi Panax Notoginseng Injection by Ultraperformance Liquid Chromatography Method

LI Yongwei, HOU Yina, WANG Zhen

(Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center/Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for determination of five saponins in Notoginseng and Sanqi Panax Notoginseng Injection by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method. **Methods** The determination was carried out on Waters Guard column(50mm×2.1mm, 1.7μm). The mobile phase consisted of [water-acetonitrile]-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 25°C with injection volume of 2μL. **Results** Notoginsenosides had good linearity in the ranges of 0.002~0.817μg(r=0.9999). The average recovery was 101.5% with RSD of 1.31%. **Conclusion** The method has simple operation, accurate results, good reproducibility, and specificity which can be used in the quantity control of Notoginseng total saponins in Notoginseng and Sanqi Panax Notoginseng Injection effectively.

KEY WORDS: Notoginseng total saponins; Sanqi Panax Notoginseng injection; UPLC