

HPLC- ELSD测定脑得生片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b 的含量^{*}

樊文娟, 王光忠, 林宁, 刘焱文^{**}

(湖北中医学院中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室, 武汉 430061)

摘要 目的: 用 HPLC- ELSD 法测定脑得生片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b 含量。方法: 采用 Hypersil ODS- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 以乙腈- 水为流动相, 梯度洗脱 (0~20 min, 乙腈 20% → 40%; 20~26 min, 乙腈 40% → 20%), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 漂移管温度 40 °C, 载气压力 3.5 kPa。结果: 三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b 进样量分别在 0.150~3.00 μ g ($r=0.9991$)、0.753~15.1 μ g ($r=0.9996$) 和 0.755~15.1 μ g ($r=0.9995$) 范围内呈良好的线性关系; 平均加样回收率 ($n=6$) 分别为 98.3% (RSD=1.0%), 96.7% (RSD=1.5%), 98.6% (RSD=0.9%)。结论: 该方法快速、简便、准确, 可用于脑得生片的质量控制。

关键词: HPLC- ELSD; 脑得生片; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_g ; 人参皂苷 R_b

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254- 1793(2009)05- 0830- 03

HPLC- ELSD determination of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_g and R_b in Naodesheng tablets^{*}

FAN Wen-juan, WANG Guang-zhong, LIN Ning, LIU Yan-wen^{**}

(Provincial and the Ministry of Education Key Laboratory of Resource Science and Chinese Herbal Compound in Chinese Medicine Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract Objective To develop the quantitative method of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_g , and R_b in Naodesheng tablets by HPLC- ELSD. **Method** The column was packed with 5 μ m Hypersil ODS- C_{18} stationary phase. The mobile phase consisted of acetonitrile- water, eluted in gradient mode (0-20 min, acetonitrile 20% → 40%; 20-26 min, acetonitrile 40% → 20%) with flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. Column temperature was set at 25 °C. The temperature of drift tube was 40 °C and the nebulizer nitrogen pressure was 3.5 kPa. **Results** The linear ranges of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_g and R_b were 0.150-3.00 μ g ($r=0.9991$), 0.753-15.1 μ g ($r=0.9996$) and 0.755-15.1 μ g ($r=0.9995$), respectively; the average recoveries ($n=6$) were 98.3%, 96.7%, 98.6%, with the RSD of 1.0%, 1.5%, 0.9% respectively. **Conclusion** The method is rapid, simple and accurate. It can be used for quality evaluation of Naodesheng tablets.

Key words HPLC- ELSD; notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_g ; ginsenoside R_b ; Naodesheng tablets

脑得生片由三七、山楂 (去壳)、川芎、红花、葛根共 5 味中药组成, 用于治疗淤血阻络所致的眩晕、中风、症见肢体不用、言语不利、头晕目眩及脑动脉硬化、缺血性中风、脑出血后遗症^[1]。三七为方中君药, 含有三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b 等多种皂苷类成分, 具有活血化淤、疏通经络的功效, 其常用的含量测定方法^[2-4] 的文献较多, 但脑得生制剂

中皂苷类成分含量测定^[3] 的文献较少。因此, 研究这些化合物的检测方法对于脑得生制剂的质量控制有重要意义。本文采用 HPLC- ELSD 同时测定脑得生片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 、 R_b 的含量。该方法简便快速, 准确可靠, 重现性好。

1 仪器与试剂

Agilent- 1100 高效液相色谱仪, 包括 G1322 排

* 武汉市科技局专项资金资助项目 (2006600513001)

** 通讯作者 Tel: (027) 88920834 E-mail: ywlin@public.wh.hb.cn

气阀、G1311泵、G1316柱温箱、G1314紫外检测器、Agilent色谱工作站(美国安捷伦科技公司);SEDEX 75检测器(Sedere France);空气泵(天津市分析仪器厂);BP211D电子天平(Sartorius公司);超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品三七皂苷 R_1 (批号 110745-200415)、人参皂苷 R_{g1} (批号 110703-200424)、人参皂苷 R_{b1} (批号 110704-200420)均购自中国药品生物制品检定所;乙腈为色谱纯(LEDA),水为双蒸水,异丙醇、甲醇均为分析纯。

脑得生片(湖南怀化正好制药有限公司;规格:0.31 g·片⁻¹;批号:070701, 070801, 070902)。

2 方法和结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取对照品三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} (置五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 h)适量,精密称定,分别加甲醇制成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 0.150 mg 人参皂苷 R_{g1} 0.753 mg 人参皂苷 R_{b1} 0.755 mg 的混合溶液,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液 取本品 20 片,除去包衣,精密称定,研细,精密称取约 0.5 g 置 50 mL 量瓶中,加入甲醇约 40 mL,超声(250 W, 25 kHz)处理 20 min,放冷,用甲醇定容至刻度,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方比例及制备工艺制得不含三七的阴性对照样品,按“2.1.2”项下方法制得阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS - C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水,梯度洗脱(0~20 min 乙腈 20% → 40%; 20~26 min 乙腈 40% → 20%)^[1]; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 检测器参数: 漂移管温度 40 °C, 载气压力 3.5 kPa 进样量 20 μ L。在选定条件下,三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 与样品中其他组分色谱峰可基线分离,且阴性样品在三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 出峰处无干扰,理论塔板数以三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 计均大于 5000。三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 对照品及样品、阴性样品色谱图见图 1。

2.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20 μ L, 注入液相色谱仪,测定峰面积。以峰面积的常用对数为纵坐标,以进样量(μ g)的常用对数为横坐标进行线性回归,三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 的线性回归方程分别为:

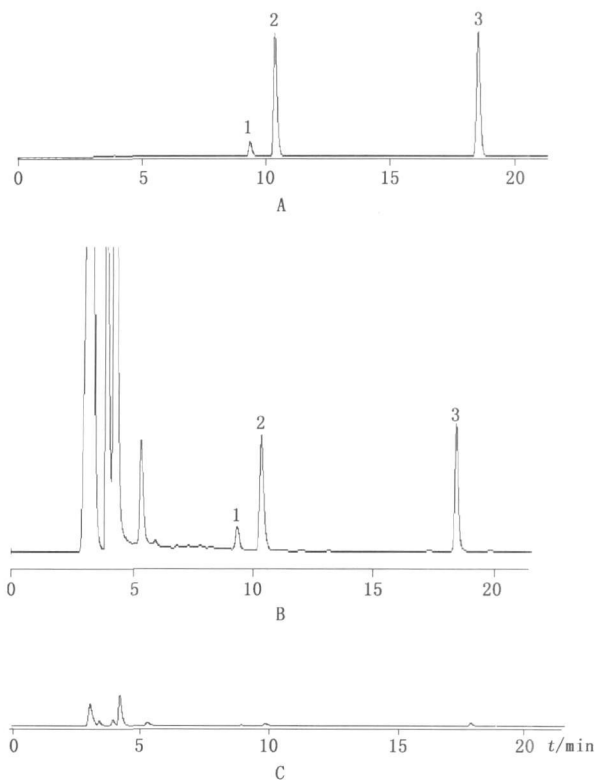


图 1 三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 对照品 (A)、样品 (B) 及阴性样品 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC-ELSD chromatograms of reference substances (A), sample (B), and negative sample without Radix et Rhizoma Notoginseng (C). 1. 三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1) 2. 人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside R_{g1}) 3. 人参皂苷 R_{b1} (ginsenoside R_{b1})

$$\lg Y = 1.36 \lg X + 4.862 \quad r = 0.9991$$

$$\lg Y = 1.38 \lg X + 4.882 \quad r = 0.9996$$

$$\lg Y = 1.42 \lg X + 4.829 \quad r = 0.9995$$

结果表明,三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 进样量分别在 0.150 ~ 3.00 μ g、0.753 ~ 15.1 μ g 和 0.755 ~ 15.1 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.4 精密度的试验 精密吸取对照品溶液 20 μ L, 连续进样 5 次,测定峰面积。结果三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 峰面积的 RSD ($n = 5$) 分别为 0.1%, 0.1%, 0.1%。表明精密度良好。

2.5 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 测定,结果三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.8%, 0.4%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取同一批号的脑得生片(批号 070701),按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,分别进样测定。结果样品中三七皂苷 R_1 及人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 含量平均值 ($n = 6$) 分别为 0.95, 2.25, 1.58 mg·片⁻¹; RSD 分别为 0.9%, 1.3%,

0. 7%。表明本方法重复性良好。

2. 7 回收率试验 精密称定已测知含量的脑得生片(批号 070701) 6份, 每份约 0. 25 g 分别精密加入 0. 150 mg· mL⁻¹三七皂苷 R₁对照品溶液 5 mL、0. 753 mg· mL⁻¹人参皂苷 R_{g₁}对照品溶液 2 mL及 0. 755 mg· mL⁻¹人参皂苷 R_{b₁}对照品溶液 2 mL, 按“2. 1. 2”项下方法制备溶液并进样测定。结果三七皂苷 R₁及人参皂苷 R_{g₁}、R_{b₁}的平均加样回收率(*n* = 6)分别为 98. 3%, 96. 7%, 98. 6%; RSD分别为 1. 0%, 1. 5%, 0. 9%。

2. 8 样品测定 取 3批脑得生片, 按“2. 1. 2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取对照品溶液 1 μL、20 μL及供试品溶液 20 μL, 进样, 测定, 以外标两点法对数方程计算三七皂苷 R₁及人参皂苷 R_{g₁}、R_{b₁}含量, 测定结果见表 1。

表 1 样品测定结果 (mg·片⁻¹)

批号 (Lot No)	三七皂苷 R ₁ (notoginsenoside R ₁)	人参皂苷 R _{g₁} (ginsenoside R _{g₁})	人参皂苷 R _{b₁} (ginsenoside R _{b₁})
070701	0. 94	2. 20	1. 57
070801	0. 96	2. 38	1. 63
070902	1. 07	2. 41	1. 71

3 讨论

3. 1 通过比较 HPLC-UV 和 HPLC-ELSD, 可以看出: HPLC-UV 受噪音和梯度洗脱的影响, 造成基

线漂移及杂质严重干扰, 定量不准确, 对样品需要进一步纯化, 供试品溶液制备方法烦琐。而 HPLC-ELSD灵敏度高, 重复性好, 并不受梯度洗脱的影响, 较 HPLC-UV 优越。

3. 2 本文先后用甲醇、水饱和正丁醇为提取溶剂, 分别超声 10 20 30 40 50 min, 发现超声 20 min 即将脑得生片中三七的有效成分提取完全。由于甲醇提取后制备的供试品溶液杂质含量少, 干扰小, 所以选择甲醇作为提取溶剂。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. VolII (一部): 572
2 ChP(中国药典). 2005. VolII (一部): 10
3 Lau AL, Woo SO, Koh HL. Analysis of saponins in raw and steamed Panax notoginseng using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J Chromatogr A*, 2003, 1011(1-2): 77
4 GUO Jian-ming(郭建明), LI Shun-nong(李顺浓). Content determination of compound Xueshuan tong pill by TLC methods(薄层扫描法测定复方血栓通滴丸中三七的含量). *Strait Pharm J*(海峡药学), 2008, 20(5): 43
5 SUN Yong-hui(孙永慧), WANG Xiao-li(王晓丽), WANG Jian-ming(王健明). Determination of notoginsenoside R₁ and ginsenoside R_{g₁}, R_{b₁} in Naodesheng capsules by HPLC gradient elution method(高效液相色谱法测定脑得生胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}及人参皂苷 R_{b₁}的含量). *Chin J Inf TCM* (中国中医药信息杂志), 2006, 16(3): 50

(本文于 2008年 3月 6日收到)