

微波技术在乳癖消片液相色谱分析中的应用

李洪书¹, 邓春晖², 陈斌¹

(1. 上海市闸北食品药品检验所, 上海 200435; 2. 复旦大学, 上海 200433)

摘要 目的: 应用微波技术处理后以高效液相色谱法测定乳癖消片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的含量。方法: 以水为溶剂, 以微波回流的方式提取乳癖消片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} , 制成供试品溶液, 以 Agilent Eclipse XDB- C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) 为色谱柱, 乙腈-0.05% 磷酸溶液 (20:80) 为流动相, 流速 0.72 mL \cdot min⁻¹, 柱温 20 $^{\circ}$ C, 检测波长 203 nm, 参比波长 360 nm, 并在 400~190 nm 做全波长扫描。结果: 在本色谱条件下, 三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 可得到完全分离, 三七皂苷 R_1 的浓度在 49.25~492.5 μ g \cdot mL⁻¹, 人参皂苷 R_{g_1} 的浓度在 53.00~530.0 μ g \cdot mL⁻¹ 范围内与峰面积均呈良好的线性关系, 相关系数均为 0.9999, 回收率 ($n=6$) 分别为 98.19% 和 101.5%。结论: 本方法简便、准确, 重复性较好, 其主要特点是快速、节能、节省溶剂、污染小, 从而降低了劳动强度, 改善了工作环境。

关键词: 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_{g_1} ; 乳癖消片; 微波技术; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0138-04

Application of microwave technique to analysis with HPLC to Rupixiao tablets

LI Hong-shu¹, DENG Chun-hui², CHEN Bin¹

(1. Shanghai Zhabei Food and Drug Control Institute, Shanghai 200435, China; 2. Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective To determine the content of notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g_1} in Rupixiao tablets by HPLC after applying microwave technique to deal with the sample. **Methods** The distilled water as the solvent to extract notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g_1} in Rupixiao tablets with the microwave circumfluence, and receiving the sample solution, an Agilent Eclipse XDB- C_{18} column (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) was adopted with a mixture of acetonitrile and 0.05% phosphoric acid solution (20:80) as the mobile phase at a flow rate of 0.72 mL \cdot min⁻¹ and the column temperature of 20 $^{\circ}$ C with the detection wavelength at 203 nm, the reference wavelength of 360 nm, and the whole wavelength scanning between 400 nm and 190 nm. **Results** With this chromatographic condition, notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g_1} can be separated completely. The calibration curve was linear in the range of 49.25 - 492.5 μ g \cdot mL⁻¹ for notoginsenoside R_1 with $r=0.9999$ and 53.00-530.0 μ g \cdot mL⁻¹ for ginsenoside R_{g_1} with $r=0.9999$. The average recoveries ($n=6$) of notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g_1} were 98.19% and 101.5%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible, the primary characteristic is fast saving on the energy and the solvent and the contamination is fewer so it can reduce the labor intensity and improve the work circumstance.

Key words notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_{g_1} ; Rupixiao tablets; microwave technology; HPLC

乳癖消片由三七、赤芍、鹿角、蒲公英等 15 味中药制成, 是临床上治疗乳腺增生的首选药物^[1]。中国药典 2005 年版一部所载的乳癖消片质量标准采用薄层色谱法鉴别三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{b_1} 及 R_{g_1} , 没有含量测定项, 不利于药品的质量控制。有

文献报道, 使用常规索氏提取后再萃取的方法处理样品后用 HPLC 法测定乳癖消片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的含量^[2], 但是此方法较复杂, 会有较大的系统误差。

本文采用微波技术对样品前处理方面进行改

进。自 1986 年匈牙利学者 Ganzler K. 首先报道了微波用于天然产物中化学成分的提取后,微波萃取技术已成为近年来发展较快的一种新型提取技术,因它具有速度快、效率高、耗能少、时间短以及有利于环保等优点,目前广泛应用于食品、生物、制药、环境样品及天然产物提取等各领域^[6]。本方法简便、准确,重复性较好,其主要特点是快速、节能、污染小,从而降低了劳动强度,改善了工作环境。

1 仪器与试剂

海尔 MO-2270M1 微波炉,设有 4 档功率调节,即:低火(120 W)、中火(380 W)、中高火(540 W)及高火(700 W)。

Agilent 1100 高效液相色谱系统:在线脱气机,四元泵,二极管阵列检测器(DAD),自动进样器,柱温箱,Agilent 1100 色谱工作站。

甲醇和乙腈均为色谱纯(德国 Merck 公司生产),水为自制重蒸馏水。对照品三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 由中国药品生物制品检定所提供,供含量测定用,批号分别为 110745-200415 及 110703-200726(含量 97.7%)。

3 个厂家各 1 个批次乳癖消片均为市场上采购。

2 方法

2.1 微波条件 选择中高火(540 W)作为微波功率,微波加热时间设置为 1 min。

2.2 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05% 磷酸溶液(20:80);流速:0.72 mL·min⁻¹;柱温:20 °C;检测波长:203 nm,参比波长:360 nm,并在 400~190 nm 做全波长扫描;进样量:20 μL。理论板数按人参皂苷 R_g 峰计算应不低于 3000。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷真空干燥 24 h 的对照品三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 适量,加甲醇溶解并制成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 0.1970 mg 和人参皂苷 R_g 0.5300 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 取本品 20 片,精密称定,研细,取约 0.6 g 精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入水 5 mL,微波回流处理后,冷却,用离心管离心(14000 r·min⁻¹, 5 min)后,用 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.5 测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,测定峰面积积分值,按外标法以峰面积计算,即得。

3 结果

3.1 色谱分离结果 在上述色谱条件下,三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 的保留时间分别约为 13.5 min 和 19.5 min,与共存的其他化学成分达到良好的分离。色谱图见图 1。

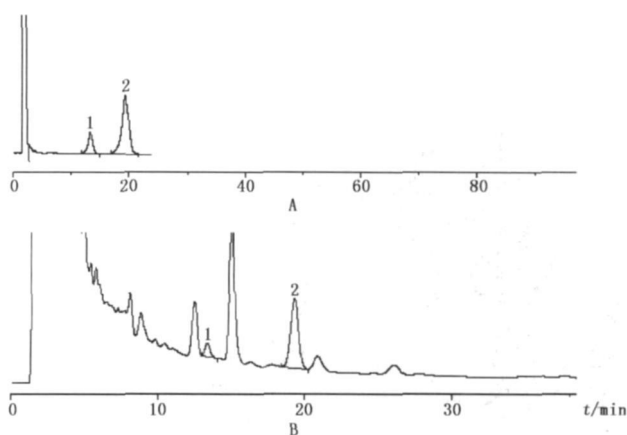


图 1 对照品(A)及乳癖消片样品(B)高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of chemical reference substances(A) and Rupixiao tablets sample(B)

1. 三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1) 2. 人参皂苷 R_g (ginsenoside R_g)

3.2 线性关系考察 精密称取经五氧化二磷真空干燥 24 h 的对照品三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 适量,加甲醇溶解并制成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 0.4925 mg 和人参皂苷 R_g 0.5300 mg 的溶液,作为对照品储备液,精密吸取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取上述溶液各 20 μL,依次注入高效液相色谱仪,计算峰面积积分值。由溶液质量浓度($C, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对峰面积(A)作线性回归,得三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 回归方程($n=6$)分别为:

$$A = 5.831C + 9.392 \quad r = 0.9999$$

$$A = 9.157C - 6.653 \quad r = 0.9999$$

线性范围分别为 49.25~492.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 53.00~530.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 精密度试验 取同一份供试品溶液,按上述色谱条件,连续进样 6 次,测定峰面积积分值,计算三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 峰面积的 RSD 分别为 3.8% 和 0.6%,表明仪器精密度较好。

3.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10 h 按上述色谱条件,分别进样测定峰面积积分值,计算三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 的 RSD 分别为 3.8% 和 0.6%,表明供试品溶液在放置

10 h内稳定。

3.5 重复性试验 精密称取I号样品6份,按上述方法试验,分别测定样品中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的含量。结果($n=6$)分别为 $0.274 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$ 和 $1.34 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$, RSD分别为 4.9%和 3.9%,表明本方法的重复性较好。

3.6 加样回收率试验 精密称取经五氧化二磷真空干燥 24 h的对照品三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 适量,加水溶解并制成每 1 mL含三七皂苷 R_1 0.3280 mg 和人参皂苷 R_{g_1} 0.4240 mg 的溶液,作为对照品溶液,再取已知含量的II号样品,研细,精密称取6份,每份约 0.3 g 分别精密加入上述对照品溶液 2 mL,再精密加入水 3 mL,微波处理后,冷却,用离心管离心后,用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,取续滤液按上述色谱条件进行试验,分别测得样品中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 回收率($n=6$)分别为 98.19%和 101.5%, RSD分别为 3.9%和 3.2%。结果表明本方法较准确、可靠。

3.7 含量测定 按本文方法,分别测定3批样品中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的含量,结果见表 1。

表 1 乳癖消片样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$)

Tab 1 Determination result of Rupixiao tablets (mg per tablet)

样品号 (sample No)	三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1)	人参皂苷 R_{g_1} (ginsenoside R_{g_1})	总含量 (total content)
I	0.274	1.34	1.61
II	0.223	1.42	1.64
III	0.709	1.88	2.59

表 2 微波提取方法和常规方法比较 ($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$)

Tab 2 Compare microwave extraction method with conventional method (mg per tablet)

方法 (method)	优缺点 (advantage and disadvantage)	三七皂苷 R_1 (notoginsenoside R_1)			人参皂苷 R_{g_1} (ginsenoside R_{g_1})			总含量 (total content)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
微波提取 (microwave extraction)	操作简单,快速安全,环保,节能,不会损失有效成分 (simple, fast and safety, environmental protection and energy saving, no loss of the active ingredients)	0.274	0.223	0.709	1.34	1.42	1.88	1.61	1.64	2.59
常规 (conventional) [2]	操作复杂,使用大量的有机溶剂,会损失有效成分 (complicated, the use of many organic solvents, the active ingredients will be lost)	0.242	0.094	0.325	1.09	0.411	1.33	1.33	0.505	1.66

4 讨论

4.1 分别选择水、10% 甲醇、20% 甲醇、30% 甲醇、40% 甲醇及 50% 甲醇 5 mL作为溶剂,微波 10 min 功率设置为中火 (380 W),进行试验,结果以水和 40% 甲醇为溶剂进行微波处理,得到的三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 含量更高,而且考虑有机溶剂对操作人员的身体健康影响,本文选用水作为溶剂。选择 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 min 的微波加热时间,以水 5 mL作为溶剂,功率仍然设置为中火 (380 W),进行试验,结果加热时间的增加并没有使样品中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的提取效率有明显增加,说明微波是瞬时加热的,本文选择 1 min 作为微波加热的时间。试验采用海尔 MO-2270M1 微波炉,设有 4 档功率调节,即:低火 (120 W)、中火 (380 W)、中高火 (540 W) 及高火 (700 W),选择以水为溶剂,微波加热时间为 1 min,进行试验,结果功率选择为中高火 (540 W) 时,三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的提取效率更高,所以本文选择中高火作为最优化的微波功率。综上,本试验选择水 5 mL为溶剂,微波加热时间为 1 min,微波功率设置为中高火时,三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的提取率达到最大值。

4.2 有文献报道^[2],采用甲醇索氏回流 5 h后,用水饱和的正丁醇萃取的方法制备供试品溶液,然后用 HPLC 法测定有效成分三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的含量,可以用于该制剂的质量控制。作者同时用此方法对上述 3 个批号的乳癖消片进行了样品处理,并按上述的色谱条件进样 20 μL ,测定峰面积积分值,按外标法以峰面积计算出三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 的含量。2 种方法的比较结果见表 2。

4.3 对于 HPLC 测定三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 的含量方法, 文献报道很多, 流动相有乙腈 - 水 (22: 78), 乙腈 - 0.1% 磷酸溶液 (21: 79), 乙腈 - 0.05% 磷酸溶液 (20: 80)^[2], 乙腈 - 水梯度洗脱^[1]等, 本试验经过对各个流动相的验证, 结果发现以乙腈 - 0.05% 磷酸溶液 (20: 80) 为流动相, 三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 的相对保留时间比较适中, 而且样品中这 2 个有效成分能够被完全分离。

4.4 三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 的最大吸收波长为 203 nm, 属于紫外的末端吸收, 所以试验中, 作者均采用色谱纯的试剂, 最大限度地减少溶剂峰的干扰。

4.5 本试验中作者采用 DAD 检测器, 除了 203 nm 检测波长外, 还设置了 360 nm 的参比波长, 以减少噪音干扰, 并在 400~190 nm 作全波长扫描, 从而可以比较对照品及样品中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 的峰纯度及吸收光谱的符合度, 从而确定这 2 种有效成分的真实性。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 502-10
- 2 XU Guo-bing(徐国兵), WANG Zheng-tao(王峥涛), PAN Nie(潘涅), *et al* Determination of notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_g in Rupixiao tablets by RP-HPLC(RP-HPLC 测定乳癖消片中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_g 的含量). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006 31(13): 1067
- 3 Zhu Min, Cao Yan, Fan Guorong Microwave-assisted extraction and fingerprint studies of *Schisandra chinensis*(Turcz.) by high performance liquid chromatography and gas chromatography. *J Sep Sci* 2007, 30: 67
- 4 Mao Yu, Li Yan, Yao Ning Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in extracts of *Rhodiola L.* by microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 45: 510
- 5 Kite GC, Hawes M J, Leon CJ *et al* Liquid chromatography/mass spectrometry of many ginsenosides in the authentication of ginseng. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003 17: 238
- 6 XU Yu-hong(徐玉宏). Application of microwave technique to analytical chemistry (微波技术在分析化学中的应用). *Phys Test Chem Anal(Part B: Chem Anal)* (理化检验 化学分册), 2006 42(11): 960

(本文于 2009 年 2 月 16 日收到)

中检所实验动物管理工作在 2009 年检查中得到好评

为全面贯彻落实全国安全生产工作会议要求, 确保北京地区实验动物的安全使用, 彻底消除人畜共患病的隐患, 并对重大突发事件实施有效监控, 根据北京市科委的要求, 市动管组织北京市实验动物专家委员会全体成员监督抽查了北京地区 47 家实验动物使用单位。

在现场检查和后期总结过程中, 专家充分肯定了中检所实验动物管理工作, 并在实验动物网站发布的 "2009 年北京地区实验动物使用单位安全大检查结果公告" 中, 对中检所实验动物管理工作进行了表扬。

中检所作为代表之一, 其有关人员在北京市实验动物管理工作经验交流会上做了发言。

详见: www.nicpbp.org.cn