

HPLC-UV-ELSD 同时测定散结镇痛胶囊中 5 个指标成分含量

张广仁^{1,2}, 吴云^{2,3}, 吴莎^{2,4}, 萧伟^{1,2,3*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210000; 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001; 4. 北京中医药大学, 北京 100020)

〔摘要〕 目的:建立 HPLC-UV-ELSD 同时测定散结镇痛胶囊中皂苷类和黄酮类成分的方法,比较 15 批散结镇痛胶囊中各成分含量。方法:采用 HPLC-UV-ELSD 联用法, Waters Symmetry[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(1~13 min, 19%~37% A; 13~50 min, 37%~36% A), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 278 nm; 蒸发光散射检测器(ELSD)漂移管温度 45℃, 载气流速 3.7 L·min⁻¹, 同时测定散结镇痛胶囊中三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Rb₁, 龙血素 A 和龙血素 B 的含量。结果:建立了同时测定散结镇痛胶囊中 3 个皂苷类和 2 个黄酮类成分含量的方法, 线性关系良好(0.999 5~0.999 7), 平均回收率为 99.1%~104.2%。结论:该方法简便, 重复性好, 适用于散结镇痛胶囊皂苷类和黄酮类成分的同时测定, 亦适用于散结镇痛胶囊的质量控制。

〔关键词〕 散结镇痛胶囊; 高效液相色谱-紫外-蒸发光散射; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁; 龙血素 A; 龙血素 B

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2015)05-0065-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050065

Simultaneous Determination of Five Compounds in Sanjie Zhentong Capsules by High-performance Liquid Chromatography Coupled with Ultraviolet and Evaporative Light Scattering Detectors

ZHANG Guang-ren^{1,2}, WU Yun^{2,3}, WU Sha^{2,4}, XIAO Wei^{1,2,3*} (1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China; 2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China; 3. Jiangsu Kanion pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China; 4. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To establish a quantitative method of three main saponins and two major active flavonoids in Sanjie Zhentong capsules by high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detectors and evaporative light scattering detectors (HPLC-UV-ELSD), and compare the contents of notogin-senoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, loureirin A, loureirin B among 15 batches of the drugs. **Method:** HPLC-UV-ELSD was conducted on a Waters Symmetry[®] C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with gradient elution, the mobile phase was ACN and H₂O, the temperature of drift tube was 45℃ and the nebulizing gas flow rate was 3.7 L·min⁻¹. **Result:** Five compounds were simultaneously detected with one injection, good linear relationships were found (0.999 5-0.999 7), and the average recovery rates were 99.1%-104.2%. **Conclusion:** The HPLC-UV-ELSD method is simple and reproducible, which can be used for quality control of Sanjie Zhentong capsules.

〔Key words〕 Sanjie Zhentong capsules; HPLC-UV-ELSD; notoginsenoside R₁; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₁; loureirin A; loureirin B

散结镇痛胶囊处方源于名方血竭散及消瘰丸, 由龙血竭、浙贝母等 4 味药材组成, 具有软坚散结、

〔收稿日期〕 20140825(003)
〔基金项目〕 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-20)
〔第一作者〕 张广仁, 硕士, 从事中药新技术研究, Tel:18888130361, E-mail: zhangguangrenme@163.com
〔通讯作者〕 * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel:0518-81152337/13905136437, E-mail: wzhzh-nj@163.net

化瘀定痛之功效,是临床治疗子宫内膜异位首选中成药。方中龙血竭活血化瘀、消肿止痛;三七散瘀止血、消肿定痛,二者为君药^[1]。产品质量标准^[2]中纳入了贝母素甲、乙的含量测定项,但对君药龙血竭和三七指标性成分的研究未在标准中体现。颜月园等^[3-4]用 HPLC-ELSD 测定散结镇痛胶囊中三七药材皂苷类成分含量;秦建平等^[5-6]采用 HPLC 测定散结镇痛胶囊中龙血竭药材黄酮类成分含量,样品处理复杂且测定繁琐,尚未有同时检测散结镇痛胶囊中皂苷类和黄酮类成分的文献报道。本文采集 15 批江苏康缘药业股份有限公司生产的散结镇痛胶囊,用甲醇超声提取法处理,HPLC-UV-ELSD 联用法^[7]同时测定散结镇痛胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、龙血素 A 和龙血素 B 的含量。本文建立的样品处理过程和测定方法为多指标控制散结镇痛胶囊的产品质量,为提升和完善其质量标准提供了实验基础。

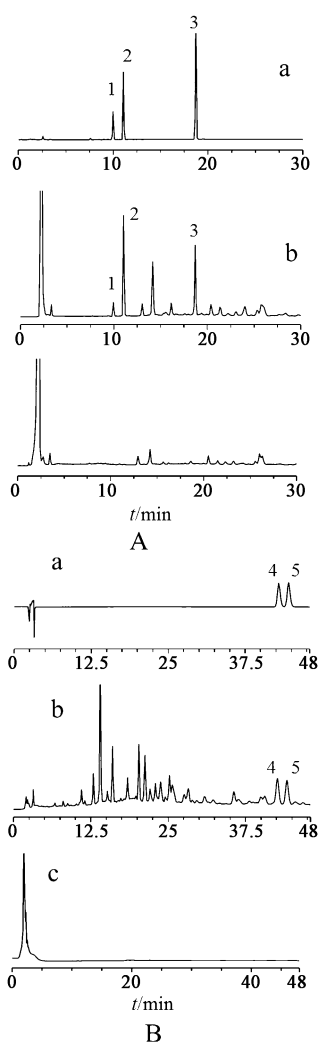
1 材料

DIONEX UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(Thermo scientific),SEDEX 80 型 LT-ELSD 检测器(法国 SEDERE 公司),XP6,BP211D 型电子分析天平(Mettler Toledo)。

散结镇痛胶囊(江苏康缘药业股份有限公司提供);三七皂苷 R₁(批号 110745 ~ 200617),人参皂苷 R_{g₁}(批号 110703 ~ 201128),人参皂苷 R_{b₁}(批号 110704 ~ 201223);龙血素 A(批号 111660 ~ 200402),龙血素 B(批号 111558 ~ 201006)对照品,均购于中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司),水为 Milli-Q 超纯水。其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

- 2.1 色谱条件 Waters Symmetry[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(1 ~ 13 min,19% ~ 37% A;13 ~ 50 min,37% ~ 36% A),检测波长 278 nm,进样量 10 μL,柱温 30 ℃,ELSD 漂移管温度 45 ℃,增益值 7。见图 1。
- 2.2 供试品溶液的制备 取散结镇痛胶囊粉末(过二号筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 50 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用 75% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤后备用。
- 2.3 对照品溶液的制备 精密称取三七皂苷 R₁,人参皂苷 R_{g₁},人参皂苷 R_{b₁},龙血素 A 和龙血素 B



A. HPLC-ELSD 检测;B. HPLC-UV 检测;a. 对照品;b. 样品;c. 阴性样品;1. 三七皂苷 R₁;2. 人参皂苷 R_{g₁};3. 人参皂苷 R_{b₁};4. 龙血素 A;5. 龙血素 B

图 1 散结镇痛胶囊 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of Sanjie Zhentong capsules

- 对照品适量,分别加甲醇制成 0.820 0,1.533 0,1.677 5,0.316 5,0.402 9 g·L⁻¹的混合对照品储备液,备用。
- 2.4 方法学考察
- 2.4.1 线性关系考察 分别取 2.3 项下对照品储备液,用甲醇逐级稀释成一系列不同质量浓度的对照品溶液,进样 10 μL 测定。三七皂苷 R₁,人参皂苷 R_{g₁} 和人参皂苷 R_{b₁} 分别以进样量的对数值 X 为横坐标,峰面积的对数值 Y 为纵坐标进行线性回归;龙血素 A 和龙血素 B 分别以进样量 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,各回归方程呈良好的线性关系。见表 1。
- 2.4.2 稳定性考察 取同一供试品溶液分别在 0,

表 1 5 种对照品的回归方程

Table 1 Regression equations of five reference substances

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / μg
三七皂苷 R_1	$Y = 1.571\ 4X + 0.537\ 5$	0.999 5	0.256 ~ 8.200
人参皂苷 Rg_1	$Y = 1.538\ 6X + 0.451\ 5$	0.999 7	0.479 ~ 15.330
人参皂苷 Rb_1	$Y = 1.493\ 3X + 0.731\ 3$	0.999 5	1.048 ~ 8.388
龙血素 A	$Y = 650.9X - 0.659\ 8$	0.999 5	0.099 ~ 3.165
龙血素 B	$Y = 501.55X + 1.979\ 9$	0.999 5	0.126 ~ 4.029

2,4,6,12,24 h 进样 10 μL ,记录峰面积,三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 Rg_1 ,人参皂苷 Rb_1 ,龙血素 A 和龙血素 B 峰面积的 RSD 分别为 1.9% ,0.7% ,0.7% ,1.7% ,2.0% 。

2.4.3 精密度试验 取同一供试品溶液 1 d 内重复进样 6 次,计算精密度,三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 Rg_1 ,人参皂苷 Rb_1 ,龙血素 A 和龙血素 B 的 RSD 分别为 1.6% ,2.0% ,1.9% ,0.3% ,0.3% 。

2.4.4 重复性试验 取同一批次散结镇痛胶囊 6 份,精密称定,按 **2.2** 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL ,按 **2.1** 项下方法测定。测得的三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 Rg_1 ,人参皂苷 Rb_1 ,龙血素 A 和龙血素 B 的平均质量分数分别为 1.52,6.20,3.54,1.05,0.70 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.9% ,1.7% ,1.7% ,1.6% ,1.7% 。

2.4.5 加样回收率试验 采用加样回收率法考察准确度,取已知含量的同一批次散结镇痛胶囊粉末 6 份,每份 0.5 g,精密称定,各加入混合对照品溶液(三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 Rg_1 ,人参皂苷 Rb_1 ,龙血素 A 和龙血素 B 的质量浓度分别为 0.698,3.210,1.675,0.541,0.361 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 1 mL,按 **2.2** 项下方法制备供试品溶液,计算 5 个成分的加样回收率。见表 2。

2.5 样品测定 取 15 批散结镇痛胶囊,按 **2.2** 项下方法制备样品溶液,精密吸取 10 μL 进样,测定结果见表 3。

3 讨论

本实验优选了同时测定散结镇痛胶囊中皂苷类和黄酮类成分的提取溶剂和提取方式,经批次验证,优选出最佳提取溶剂为 75% 甲醇,最佳提取方式为超声 30 min,最终确定样品的处理方式取本品内容物约 2 g,精密称定,用 75% 的甲醇 50 mL 超声提取 30 min。

HPLC 分别检测三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 Rg_1 ,人

表 2 散结镇痛胶囊中 5 种成分的加样回收率试验

Table 2 Recovery test of five components in Sanjie Zhentong capsules

成分	样品 中量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	加样 回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
三七皂苷 R_1	0.767	0.689	1.454	99.7	99.8	2.6
	0.759	0.689	1.423	96.4		
	0.763	0.689	1.448	99.4		
	0.764	0.689	1.449	99.4		
	0.754	0.689	1.473	104.1		
人参皂苷 Rg_1	0.754	0.689	1.439	99.4		
	3.129	3.21	6.570	103.2	104.2	2.0
	3.097	3.21	6.339	101.0		
	3.111	3.21	6.413	102.9		
	3.117	3.21	6.470	104.1		
人参皂苷 Rb_1	3.074	3.21	6.434	104.2		
	3.076	3.21	6.455	103.3		
	1.787	1.675	3.505	102.6	99.2	2.2
	1.768	1.675	3.386	96.6		
	1.776	1.675	3.402	97.1		
龙血素 A	1.78	1.675	3.455	100.0		
	1.755	1.675	3.420	99.4		
	1.757	1.675	3.428	99.8		
	0.53	0.541	1.074	100.6	99.1	1.3
	0.524	0.541	1.055	98.2		
龙血素 B	0.527	0.541	1.067	99.8		
	0.528	0.541	1.069	100.0		
	0.521	0.541	1.057	99.1		
	0.521	0.541	1.046	97.0		
	0.353	0.361	0.711	99.2	99.3	1.2
	0.35	0.361	0.701	97.2		
	0.351	0.361	0.709	99.2		
	0.352	0.361	0.713	100.0		
	0.347	0.361	0.711	100.8		
	0.347	0.361	0.706	99.4		

参皂苷 Rb_1 和龙血素 A,龙血素 B 的报道有很多,但同时检测三七药材皂苷类成分和龙血竭药材黄酮类成分的方法尚未有报道。由于样品色谱峰较多,分离度要求高,故对流动相种类和配比进行考察,最终确定以乙腈-水作为流动相,采用梯度洗脱的方法可以得到较好的分离度。本法同样适用于三七和龙血竭药材的含量测定,并且可在 25 min 之内获得理想分离度的三七皂苷 R_1 ,人参皂苷 Rg_1 ,人参皂苷 Rb_1 单峰。

表 3 15 批次散结镇痛胶囊中 5 个成分的含量

Table 3 The contents of the five compounds in15 batches of Sanjie Zhentong capsules

产品编号	三七皂苷	人参皂苷	人参皂苷	龙血素 A	龙血素 B
	R ₁	R _{g₁}	Rb ₁		
130501	0. 823 3	2. 052 8	1. 118 4	0. 167 4	0. 555 8
130502	0. 884 0	2. 077 5	1. 080 9	0. 172 9	0. 522 2
130503	0. 863 5	2. 060 9	1. 090 6	0. 168 3	0. 540 1
130504	0. 884 7	1. 861 9	1. 150 0	0. 164 10	0. 540 8
130505	0. 729 7	1. 949 3	1. 096 7	0. 178 5	0. 492 0
130601	0. 758 3	2. 100 4	1. 180 9	0. 171 7	0. 493 8
130602	0. 737 7	1. 812 0	1. 111 8	0. 178 4	0. 502 6
130603	0. 716 4	1. 957 3	1. 142 5	0. 174 6	0. 508 3
130604	0. 792 6	1. 895 7	1. 107 3	0. 166 3	0. 491 4
130610	0. 706 6	1. 931 7	1. 183 4	0. 171 8	0. 502 7
130611	0. 718 3	1. 879 5	1. 149 3	0. 174 8	0. 501 2
130612	0. 771 3	1. 882 7	1. 197 3	0. 176 8	0. 501 6
130613	0. 689 1	1. 910 6	1. 123 7	0. 188 0	0. 518 2
130703	0. 699 6	2. 025 1	1. 180 7	0. 176 4	0. 492 9
130704	0. 702 0	2. 000 9	1. 158 8	0. 160 4	0. 477 8

皂苷类和黄酮类为散结镇痛胶囊的主要组成成分,皂苷类成分仅在 200 nm 左右有弱紫外吸收,仅用紫外检测器无法同时检测这两类不同性质的化合物^[8]。ELSD 是一种通用型检测器,尤其适用于皂苷类化合物的测定。本文将 UV 和 ELSD 结合起来,使供试品溶液依次通过 UV 和 ELSD 检测器,建立同时测定散结镇痛胶囊中三七皂苷 R₁,人参皂苷

Rg₁,人参皂苷 Rb₁ 和龙血素 A,龙血素 B 的含量检测方法,为多指标成分同时控制散结镇痛胶囊的质量提供研究基础。

[参考文献]

[1] 鹿丽丽,萧伟,徐连明,等. HPLC 测定散结镇痛胶囊中龙血素 A、B 含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14):105-107.

[2] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准[WS₃-232 (Z-38)-2009(Z)]散结镇痛胶囊[S]. 2009.

[3] 颜月园,萧伟,吴云,等. 散结镇痛胶囊中皂苷类成分的指纹图谱研究[J]. 中草药, 2012, 43(3): 496-500.

[4] 唐云,倪玮烨,束志凌. HPLC 法测定散结镇痛胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁} 及人参皂苷 Rb₁ 的含量[J]. 药学进展, 2009, 33(7):328-329.

[5] 秦建平,吴建雄,李家春,等. 散结镇痛胶囊中酚酸类成分的指纹图谱研究和多指标成分定量测定[J]. 中草药, 2014, 45(1):59-63.

[6] 颜月园,萧伟,吴云,等. 散结镇痛胶囊中黄酮类成分的指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):58-61.

[7] Bao K D, Li P, Li H J, et al. Simultaneous determination of flavonoids and saponins in Semen Ziziphi Spinosae (Suanzaoren) by High performanceliquid chromatography with evaporative light ccattering detection [J]. Chin J Nat Med, 2009, 7(1):47-53.

[8] 梁瑾,刘小花,任远,等. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定黄芪中 5 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 33(2):210-213.

[责任编辑 顾雪竹]