

# HPLC 法测定复方乌骨藤胶囊中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g1</sub> 和人参皂苷 R<sub>b1</sub> 的含量

张 凯<sup>1,2</sup>, 尹子郡<sup>2</sup>, 张跃进<sup>1</sup>, 梁宗锁<sup>1</sup>, 郭宏波<sup>1\*</sup>

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西省中药指纹图谱与天然产物库研究中心, 陕西 杨陵 712100;  
2. 杨凌无为制药集团有限公司, 陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**建立 HPLC 法测定复方乌骨藤胶囊中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g1</sub> 和人参皂苷 R<sub>b1</sub> 的含量。采用 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 以乙腈(A)–水(B)为流动相进行梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40℃。结果表明:三七皂苷 R<sub>1</sub> 在 0.229~2.29 μg 范围内线性关系良好( $r=0.999\ 6$ ), 平均加样回收率( $n=6$ )为 98.7%; 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 在 0.814~8.14 μg 范围内线性关系良好( $r=1.000\ 0$ ), 平均加样回收率( $n=6$ )为 99.2%; 人参皂苷 R<sub>b1</sub> 在 0.771~7.71 μg 范围内线性关系良好( $r=0.999\ 6$ ), 平均加样回收率( $n=6$ )为 99.3%。本方法操作简便, 结果准确, 灵敏度高, 重现性好, 可作为复方乌骨藤胶囊中所含三七的质量控制方法。

**关键词:**HPLC; 复方乌骨藤胶囊; 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 人参皂苷 R<sub>g1</sub>; 人参皂苷 R<sub>b1</sub>; 质量控制

**中图分类号:**S567.236      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)01-0250-04

## Measurement of the Contents of Notoginsenoside R<sub>1</sub>, Ginsenoside R<sub>g1</sub> and Ginsenoside R<sub>b1</sub> in Compound Wuguteng Capsules by HPLC

ZHANG Kai<sup>1,2</sup>, YIN Zi-jun<sup>2</sup>, ZHANG Yue-jin<sup>1</sup>, LIANG Zong-suo<sup>1</sup>, GUO Hong-bo<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Shaanxi Research Center of TCM Fingerprinting and NP Library, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Wuwei Pharmaceutical Group Co. Ltd., Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** To determine the contents of notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside R<sub>g1</sub> and ginsenoside R<sub>b1</sub> in “Compound Wuguteng Capsules”. High performance liquid chromatography (HPLC) was adopted to conduct the measurement. The chromatographic conditions were as following: column: Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase: acetonitrile (A)–water (B) with gradient elution, flow rate: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature: 40℃. Results, The linear ranges of notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside R<sub>g1</sub> and ginsenoside R<sub>b1</sub> were 0.229–2.29, 0.814–8.14 and 0.771–7.71 μg with average recovery rates of 98.7%, 99.2% and 99.3% ( $n=6$ ), respectively. Conclusion: The method was simple and accurate with high reproducibility. It could be employed as a quality control method for the detection of Notoginseng radix et rhizoma in “Compound Wututeng Capsules”.

**Key words:** HPLC; Compound Wuguteng Capsules; notoginsenoside R<sub>1</sub>; ginsenoside R<sub>g1</sub>; ginsenoside R<sub>b1</sub>; quality control

复方乌骨藤胶囊为杨凌无为制药集团有限公司研究开发的抗癌新药, 是由通关藤、半枝莲、三七等 5 味中药饮片组成的复方制剂, 具有益气扶正, 清热

解毒, 活血消症之功效; 临床用于治疗中晚期肺癌、肝癌、食道癌、胃癌等, 尤其对晚期非小细胞肺癌治疗效果显著; 同时也可改善患者的生存质量, 延长生

收稿日期: 2014-11-25    修回日期: 2015-05-15

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项基金(20100204120027); 陕西省农业科技攻关项目(2011K01-18)。

作者简介: 张 凯, 男, 硕士, 研究方向: 药用植物遗传资源保护与可持续利用、功能基因。E-mail: 36040406@qq.com

\* 通信作者: 郭宏波, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 植物遗传资源保护与可持续利用、功能基因。Email: guohongbo@163.com

存时间<sup>[1-2]</sup>。处方中所含三七(*Panax notoginseng*)是一味名贵中药材<sup>[3]</sup>,有散瘀止血、消肿定痛的功效<sup>[4]</sup>,并含有对抗致癌启动子的成分,能诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>和分化<sup>[7]</sup>。三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$  为三七的主要成分,同时也是评价三七质量的重要指标<sup>[4]</sup>。为了有效控制复方乌骨藤胶囊中三七的含量,采用三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$  作为其检验指标,对该产品中所含的三七进行质量控制。参照文献[4,8-14],采用高效液相色谱梯度洗脱法,对该产品所含以上 3 种成分同时进行检测,方法准确,灵敏度高,为控制该产品所含三七的质量提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试药

Waters600 型高效液相色谱仪,Waters2487 双波长紫外检测器,Waters717 plus 自动进样器,Empower 色谱工作站,KQ3200E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),BP211D 赛多利斯电子天平。

对照品三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$  均由中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 110745-200516、110703-200726、110704-200420,供含量测定用;复方乌骨藤胶囊 4 批(规格为:0.45 g·粒<sup>-1</sup>;批号分别为:20080801、20080805、20080808、20120501),阴性对照供试品(按照复方乌骨藤胶囊制备工艺制备缺三七的阴性供试品),均由杨凌无为制药集团有限公司提供。乙腈(色谱纯)、水(反渗透高纯水),样品前处理所用甲醇、正丁醇、氨水均为分析纯。

### 1.2 溶液的制备

1.2.1 对照品溶液 取三七皂苷  $R_1$  对照品、人参皂苷  $R_{g_1}$  对照品和人参皂苷  $R_{b_1}$  对照品适量,精密称定,分别置 100 mL 量瓶中,加 50%甲醇溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 中各含三七皂苷  $R_1$  0.115 mg、人参皂苷  $R_{g_1}$  0.407 mg 和人参皂苷  $R_{b_1}$  0.386 mg 的溶液,即得。

1.2.2 混合对照品溶液 分别取三七皂苷  $R_1$  对照品、人参皂苷  $R_{g_1}$  对照品和人参皂苷  $R_{b_1}$  对照品适量,精密称定,置于 200 mL 量瓶中,加 50%甲醇溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 中含三七皂苷  $R_1$  0.110 mg、人参皂苷  $R_{g_1}$  0.370 mg 和人参皂苷  $R_{b_1}$  0.415 mg 的混合对照品溶液,即得。

1.2.3 供试品溶液 取复方乌骨藤胶囊的内容物约 0.6 g,精密称定,置锥形瓶中,加 50%甲醇 50

mL,浸泡过夜,80℃保温 2 h,过滤,用 50%甲醇洗涤滤渣 3 次,每次 10 mL,合并滤液置蒸发皿中,80℃水浴蒸干,残渣分次加水 25 mL,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的氨试液充分洗涤 2 次,每次 30 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣分次加甲醇(5、3、2 mL)溶解,并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

1.2.4 阴性对照供试品溶液 取阴性对照供试品约 0.6 g,照 1.2.3 方法制备阴性对照供试品溶液。

### 1.3 色谱条件与系统适用性

色谱柱为 Kromasil  $C_{18}$  (4.6 mm×250 mm,5  $\mu$ m),流动相为乙腈-水<sup>[4]</sup>,梯度洗脱,洗脱程序见表 1;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 40℃,检测波长 203 nm,进样量 10  $\mu$ L。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase in gradient elution

$t/min$	乙腈/%	水/%
0	19	81
53	19	81
60	31	69
80	31	69
100	47	53

### 1.4 试验方法

按上述色谱条件,分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照供试品溶液各 10  $\mu$ L,注入液相色谱仪,记录色谱图。系统适用性测试结果为:三七皂苷  $R_1$  峰、人参皂苷  $R_{g_1}$  峰和人参皂苷  $R_{b_1}$  峰的理论塔板数均>10 000,供试品中的其他成分对所测成分无干扰。对照品、供试品和阴性对照供试品色谱图结果见图 1、图 2 和图 3。

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系及线性范围考察

分别精密吸取三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$  对照品溶液各 2、6、8、12、16  $\mu$ L 和 20  $\mu$ L,注入液相色谱仪,测定峰面积,以进样量( $\mu$ g)为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ ),计算回归方程分别为:

三七皂苷  $R_1$ :  $Y = 377\ 924\ X + 566, r = 0.999\ 6$ ;

人参皂苷  $R_{g_1}$ :  $Y = 284\ 950X - 16\ 838, r = 1.000\ 0$ ;

人参皂苷  $R_{b_1}$ :  $Y = 284\ 950X - 16\ 838, r = 0.999\ 6$ 。

结果表明,三七皂苷  $R_1$  在 0.229~2.29  $\mu$ g 范

围内线性关系良好,人参皂苷  $R_{g_1}$  在  $0.814\sim 8.14\ \mu\text{g}$  范围内线性关系良好,人参皂苷  $R_{b_1}$  在  $0.771\sim 7.71\ \mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

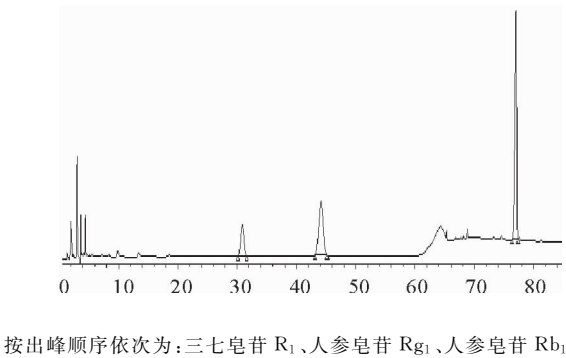


图 1 三七混合对照品溶液色谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of panax notoginseng

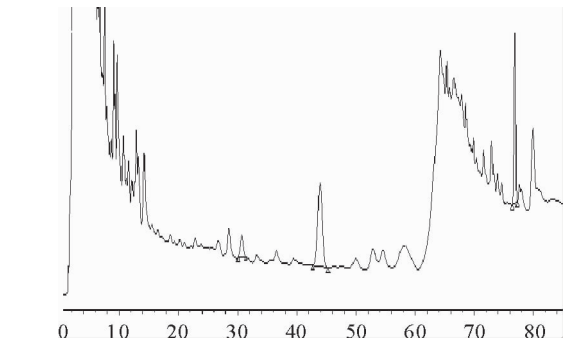


图 2 供试品溶液色谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of the sample solution

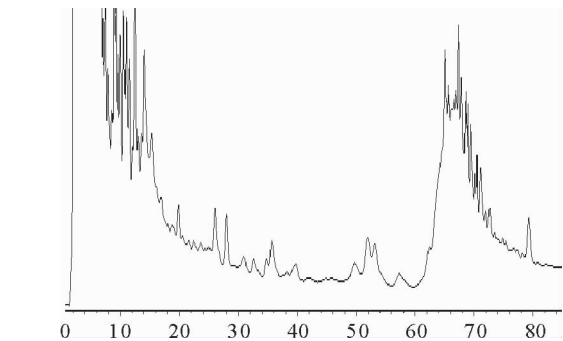


图 3 阴性供试品溶液色谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of the sample solution  
(not including panax notoginseng)

## 2.2 精密度试验

分别精密吸取三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$  对照品溶液各  $10\ \mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,重复进样 5 次,按“1.3”项下的色谱条件检验。结果分别为:三七皂苷  $R_1$  峰面积 RSD 为  $0.61\%$ ,人参皂苷  $R_{g_1}$  峰面积 RSD 为  $0.95\%$ ,人参皂苷  $R_{b_1}$  峰面积 RSD 为  $1.05\%$ 。结果表明本方法精密度良好。

## 2.3 稳定性试验

精密吸取供试品溶液(20120501) $10\ \mu\text{L}$ ,分别于制备后 0、4、8、12、24 h 注入液相色谱仪,按“1.3”项下的色谱条件检验。结果分别为:三七皂苷  $R_1$  峰面积 RSD 为  $0.85\%$ ,人参皂苷  $R_{g_1}$  峰面积 RSD 为  $0.54\%$ ,人参皂苷  $R_{b_1}$  峰面积 RSD 为  $0.71\%$ 。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.4 重复性试验

取供试品(20120501) $0.6\ \text{g}$ ,共 6 份,精密称定,照“1.2.3”项下的方法制备供试品溶液,按“1.3”项下的色谱条件检验。结果该批样品的三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$  的含量分别为  $0.70$ 、 $3.16\ \text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$  和  $3.02\ \text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$ ,RSD 分别为  $0.95\%$ 、 $0.87\%$  和  $1.03\%$ ,结果表明,本方法的重复性良好。

## 2.5 回收率试验

取供试品(20120501) $0.30\ \text{g}$ ,精密称定,精密加入混合对照品溶液  $5\ \text{mL}$ ,再加  $50\%$  甲醇  $45\ \text{mL}$ ,按“1.2.3”项下的方法,自“浸泡过夜”操作,共制成 6 份供试品溶液,按“1.3”项下的色谱条件检验。结果表明,三七皂苷  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$  和人参皂苷  $R_{b_1}$  的平均回收率分别为  $98.7\%$ 、 $99.2\%$  和  $99.3\%$ 。

## 2.6 空白干扰试验

取阴性对照供试品  $0.6\ \text{g}$ ,精密称定,照“1.2.3”项下的方法制备阴性对照溶液。分别取混合对照品溶液、供试品溶液(20120501)和阴性对照溶液,按“1.3”项下的色谱条件检验。结果表明,阴性对照溶液在与混合对照品溶液相应的位置无干扰(图 3)。

## 2.7 供试品测定

分别取上述 3 批供试品各  $0.6\ \text{g}$ ,精密称定,照“1.2.3”项下的方法制备供试品溶液。按“1.3”项下的色谱条件检验(表 2)。

表 2 供试品检测结果

Table 2 Measurement results of the samples $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$			
批号	三七皂苷 $R_1$	人参皂苷 $R_{g_1}$	人参皂苷 $R_{b_1}$
20080801	0.98	3.95	4.07
20080805	0.97	3.96	4.07
20080808	0.98	3.99	3.94
20120501	0.70	3.16	3.02

## 3 结论与讨论

文献中对三七及其制剂的检测方法较多<sup>[4,8-14]</sup>,但复方乌骨藤胶囊因所含成分复杂,无法完全按照相关文献操作,因此,本试验中首先采用甲醇保温回流法制备供试品溶液,因该溶液所含成分多,出现对所测成分的干扰,尤其在三七皂苷  $R_1$  峰处干扰最

大,造成其含量较实际值大。经选用不同浓度的甲醇和乙醇进行提取试验,发现 50% 甲醇所得供试液干扰最少。再通过对温浸法、索氏提取法和加热回流提取法进行比较,发现温浸法虽然没有索氏提取法提取完全,但 2 种方法所得含量测定结果无显著性差异,又因温浸法操作简便,故本法选择 50% 甲醇温浸法进行提取。

在供试品溶液中,发现因存在杂质而经常导致溶液过滤困难的问题,为此,考虑采用水饱和正丁醇萃取法予以去除。经对水饱和正丁醇的萃取次数和正丁醇饱和的氨试液的洗涤次数进行试验,发现使用本文中的方法最为合适,既能解决过滤问题,又能保证所测含量结果的准确性。

在分离度方面,通过对相同规格(4.6 mm×250 mm,5 μm)、不同型号的色谱柱(包括:Kromasil C<sub>18</sub> 柱、Hypersil C<sub>18</sub> 柱、XB-C<sub>18</sub> 柱和 Zorbax C<sub>18</sub> 柱)进行筛选,发现本文所述色谱柱能很好地将供试品中的 3 个成分与其他干扰组分分离,且重复性好;在对柱温的考察过程中,发现色谱柱的温度对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 色谱峰的影响最大,当柱温<40℃时,该色谱峰与其紧邻的色谱峰分离效果不佳,而在≥40℃时,则基本能达到较好的分离效果,考虑到升高温度会影响到色谱柱的使用寿命,因此选择柱温为 40℃。

文献中有报道用蒸发光散射检测器(ELSD)检测三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和人参皂苷 Rb<sub>1</sub><sup>[13-14]</sup>,原因是该皂苷类成分无发色团或仅有末端紫外吸收。但试验中发现,ELSD 在梯度洗脱时其检测限和定量限较 UV 法差<sup>[11]</sup>,且该检测仪器目前仍无国家的计量检定规程<sup>[15]</sup>,灵敏度不理想<sup>[16]</sup>,故本法选择紫外检测器进行检测。

经研究显示,所述方法操作简便,结果准确,灵敏度高,重现性好,可作为复方乌骨藤胶囊中所含三七的质量控制方法。

参考文献:

[1] 张炳谦,伍千国. 复方乌骨藤汤治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 临床医学,2010,30(1):112-114.  
ZHANG B Q, WU Q G. Compound wuguteng decoction in the treatmeat of advanced non-small cell lung cancer[J]. Clinical Medicine,2010,30(1):112-114. (in Chinese)

[2] 张晓双,孙建宁,宋延平,等. 复方乌骨藤胶囊对 Lewis 肺癌小鼠 TNF-α、NK 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(6):220-223.  
ZHANG X S, SUN J N, SONG Y P, *et al.* Effect of compound wuguteng capsule on TNF-α, NK activity in mice with Lewis lung cancer[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2013, 19(6): 220-223. (in Chinese)

[3] 马宏秀,张治祥. 几种名贵中药材的鉴别经验浅谈[J]. 现代中

医药,2010,30(1):61-62.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:11-12.

[5] 石雪迎,赵风志,戴欣,等. 三七总皂甙对转化的人胃粘膜上皮细胞增殖的抑制作用[J]. 北京中医药大学学报,2001,24(5):29-33.  
SHI X Y, ZHAO F Z, DAI X, *et al.* Inhibitory effects of the total saponin of *Panax notoginseng* on the proliferation of the transformed human gastric mucoal epithelial cells[J]. Journal of Beijing University of TCM, 2001, 24(5): 29-33. (in Chinese)

[6] 徐晓玉. 中药药理学[M]. 北京:中国中医药出版社,2010:371.

[7] 席孝贤. 试论中药对肿瘤细胞的多靶点效应[J]. 陕西中医, 2002, 23(7): 641-644.

[8] 刘敏,严萍,詹若挺,等. 反相高效液相色谱法测定三七破壁粉粒的皂苷类含量[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 673-676.  
LIU M, YAN P, ZHAN R T, *et al.* Determination of ginsenosides in cell-broken powder of radix notoginseng by RP-HPLC [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2011, 22(6): 673-676. (in Chinese)

[9] 朱伟伟,王齐. 高效液相色谱法测定不同年限三七根中皂苷含量[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(3): 1407-1408, 1651.

[10] 宋丽丽,张玉萍. HPLC-ELSD 法测定三七中三七素的含量[J]. 北京中医药, 2010, 29(3): 216-217.

[11] 林庆新. HPLC 法测定人参三七颗粒中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(10): 1527-1528.  
LIN Q X. Determination of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> and Notoginsenoside R<sub>1</sub> in renshen sanqi granules by HPLC[J]. China Pharmacist, 2013, 16(10): 1527-1528. (in Chinese)

[12] 崔翰明,张春光,林海,等. HPLC 法测定三七不同药用部位中有效成分含量[J]. 中药材, 2009, 32(12): 1810-1813.  
CUI H M, ZHANG C G, LIN H, *et al.* Determination of effective components in different positions of *Panax notoginseng* by HPLC[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(12): 1810-1813. (in Chinese)

[13] 沙东旭,张满来. HPLC-ELSD 测定三七药材及其制剂中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 及 Rb<sub>1</sub> 的含量[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 112-115.  
SHA D X, ZHANG M L. Determination of notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rb<sub>1</sub> in radix notoginseng and its preparation by HPLC-ELSD[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(2): 112-115. (in Chinese)

[14] 毕晓黎,罗文汇,李素梅. HPLC-ELSD 法测定三七止血胶囊中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 75-77.  
BI X L, LUO W H, LI S M. Determination of notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and ginsenoside Rb<sub>1</sub> in sanqi zhixue capsule by HPLC-ELSD[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(1): 75-77. (in Chinese)

[15] 纪祥娟,王军,杨新光,等. 蒸发光散射检测器的应用概况及检定方法研究进展[J]. 计量与测试技术, 2014, 41(5): 50-53.

[16] 陈秀琳. 蒸发光散射检测器在药物分析中的研究概况[J]. 海峡药学, 2007, 19(11): 93-94.