

## HPLC同时测定芪白颗粒中5种活性成分的含量

李晓荣<sup>1,2</sup>, 刘朝勇<sup>1,2</sup>, 沈成英<sup>1,2</sup>, 闵红燕<sup>2,3</sup>, 万露<sup>2,3</sup>, 袁海龙<sup>2\*</sup>, 韩晋<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 中国人民解放军第三〇二医院, 北京 100039;  
3. 江西中医药大学, 南昌 330000)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定芪白颗粒中 5 种成分(黄芩苷、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 和特女贞苷)含量的方法。方法:Prevail C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 45% A; 5~15 min, 45%~50% A; 15~60 min, 50% A), 柱温室温, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 203 nm。结果:黄芩苷、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 和特女贞苷分别在 2.16~21.6, 1.95~19.5, 2.64~26.4, 3.51~35.1 和 1.01~10.1 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好( $r > 0.999$ ), 精密性、重复性、稳定性的 RSD 均 < 2%, 平均加样回收率 95.92%~101.90%。结论:该方法简便、合理、可靠, 可作为芪白颗粒质量控制的方法。

**[关键词]** 芪白颗粒; 高效液相色谱-二极管阵列检测; 黄芩苷; 人参皂苷 R<sub>g1</sub>; 人参皂苷 R<sub>b1</sub>; 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 特女贞苷

**[中图分类号]** R284.1; R289.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0060-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040060

**HPLC Simultaneous Determination of Five Active Constituents in Qibai Granules** LI Xiao-rong<sup>1,2</sup>, LIU Chao-yong<sup>1,2</sup>, SHEN Cheng-ying<sup>1,2</sup>, MIN Hong-yan<sup>2,3</sup>, WAN Lu<sup>2,3</sup>, YUAN Hai-long<sup>2\*</sup>, HAN Jin<sup>2\*</sup> (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 3. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of baicalin, ginsenosides R<sub>g1</sub>, ginsenoside R<sub>b1</sub>, notoginsenoside R<sub>1</sub> and special privet glycosides five in Qibai granules. **Method:** HPLC analysis was performed on a Prevail C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol (A) - 0.2% phosphoric acid (B) as mobile phase by gradient elution [0-5 min, 45% A, 5-15 min, 45%-50% A, 15-60 min, 50% A]. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was maintained at room temperature, and the detection wavelength was set at 203 nm. **Result:** The linear ranges of baicalin, ginsenosides R<sub>g1</sub>, ginsenoside R<sub>b1</sub>, notoginsenoside and special privet glycosides were 2.16-21.6, 1.95-19.5, 2.64-26.4, 3.51-35.1 and 1.01-10.1 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. The RSD of precision, reproducibility and stability tests were less than 2%, the average recoveries were ranging from 95.92% to 101.90%. **Conclusion:** This method is simple, reasonable, reliable and could be used for quality control of Qibai granules.

**[Key words]** Qibai granules; HPLC; baicalin; ginsenosides R<sub>g1</sub>; ginsenoside R<sub>b1</sub>; notoginsenoside R<sub>1</sub>; special privet glycosides

芪白颗粒是由黄芪、白术、黄芩、女贞子、三七等 12 味中药组成, 为解放军 302 医院院内制剂, 具有健脾补肾, 清热益气的功能, 用于各种原因所致的白

细胞减少症。当前该制剂仅以测定黄芩苷含量作为质量控制标准, 然而该制剂处方药材种类多、药效成分复杂, 仅对单一活性成分进行含量测定, 并不能全

**[收稿日期]** 20140707(002)

**[基金项目]** 军队卫生重点项目(13ZJ12)

**[第一作者]** 李晓荣, 在读硕士, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel:010-66933312, E-mail: 413029879@qq.com

**[通讯作者]** \*袁海龙, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药新型给药系统研究, Tel:010-66933367, E-mail: yhlpharm@126.com;

\*韩晋, 主任药师, 博士生导师, 从事中药剂型与工程技术研究, Tel:010-66933225, E-mail: hanjin302emba@163.com

面的反映芪白颗粒的质量情况。目前,多指标的质量控制模式主要应用在对中药单味药的质量评价,该方法已成功应用于三七、黄连药材的质量控制<sup>[1-3]</sup>;但是该质控方法在中药制剂质量评价中的应用并不广泛,目前仅有少量关于中药制剂多指标质量控制的研究报道<sup>[4-5]</sup>。

为准确评价芪白颗粒的质量,本研究拟采用多指标质量控制模式对其进行质量控制,建立一种同时测定芪白颗粒臣药黄芩、女贞子以及贵重药材三七中的黄芩苷、特女贞苷、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub> 5 种指标成分含量的方法,并对 3 批芪白颗粒进行含量测定,为全面控制芪白颗粒的质量以及提高其质量标准的研究提供科学依据。

### 1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(包括 SPD-M20A 型二极管阵列检测器,日本岛津),BAS124S 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。黄芩苷、特女贞苷和人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>,人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>,三七皂苷 R<sub>1</sub> 对照品(批号分别为 110715-201117,111926-201203,110703-201128,110704-201223,110745-201117,中国食品药品检定研究院);芪白颗粒(由解放军 302 医院研制,批号 20130605,20130606,20130607);甲醇为色谱纯;水为娃哈哈纯净水,其他试剂为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[6-7]</sup> Prevail C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水(B)梯度洗脱(0~5 min, 45% A; 5~15 min, 45%~50% A; 15~60 min, 50% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL,柱温室温。

#### 2.2 溶液的制备

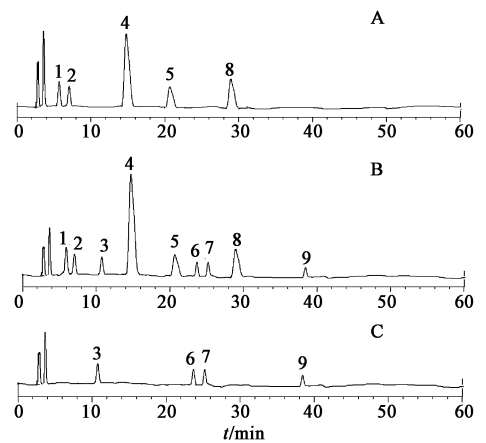
**2.2.1 混合对照品溶液** 分别取黄芩苷、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>,人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>,三七皂苷 R<sub>1</sub> 和特女贞苷适量,精密称定,加甲醇制备成质量浓度分别为 21.6, 19.5, 26.4, 35.1, 10.1 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,于 4℃ 保存备用。

**2.2.2 供试品溶液** 取芪白颗粒(20130605)内容物,研细,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)30 min,放冷,用 70% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.2.3 阴性溶液** 按芪白颗粒处方与生产工艺,制备不含黄芩、女贞子、三七的阴性样品,按 2.2.2 项

下方法制备,即得。

**2.3 检测波长的选择及专属性试验** 《中国药典》2010 年版一部,关于女贞子、黄芩和三七药材的含量测定检测波长分别为 224, 280, 203 nm,在上述前两个波长条件下人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>,人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 及三七皂苷 R<sub>1</sub> 无吸收,而在 203 nm 波长下特女贞苷和黄芩苷均可检测到一定的吸收峰,且干扰较小,故本文选择 203 nm 作为检测波长。分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,5 种待检测成分均可实现基线分离,且阴性无干扰,说明方法具有专属性,见图 1。



1. 特女贞苷; 2. 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 4. 黄芩苷; 5. 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>; 8. 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>; A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品

图 1 芪白颗粒 HPLC

Fig1 HPLC chromatogram of Qibai granules

**2.4 线性关系考察** 取混合对照品溶液进行稀释,制得黄芩苷的质量浓度分别为 2.16, 2.7, 3.6, 7.2, 14.4, 21.6 mg·L<sup>-1</sup>; 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 的质量浓度分别为 1.95, 2.43, 3.25, 6.5, 13.0, 19.5 mg·L<sup>-1</sup>; 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的质量浓度分别为 2.64, 3.3, 4.4, 8.8, 17.6, 26.4 mg·L<sup>-1</sup>; 三七皂苷 R<sub>1</sub> 的质量浓度分别为 3.51, 4.38, 5.85, 11.7, 23.4, 35.1 mg·L<sup>-1</sup>; 特女贞苷的质量浓度分别为 1.01, 1.26, 1.68, 3.37, 6.73, 10.1 mg·L<sup>-1</sup>。依照 2.1 项下色谱条件进样 10 μL,以对照品的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果表明黄芩苷,人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>,人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>,三七皂苷 R<sub>1</sub> 和特女贞苷在范围内线性关系良好。见表 1。

**2.5 精密度试验** 取同一供试品溶液(20130605),依照 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录黄芩苷,人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>,人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>,三七

表 1 5 种成分的线性关系考察

Table 1 Results of linear relationships for 5 constituents

对照品	回归方程	r	线性范围 /mg·L <sup>-1</sup>
黄芩苷	$Y = 45.74 \times 10^3 X - 0.27 \times 10^3$	0.999 8	2.16 ~ 21.6
人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	$Y = 10.41 \times 10^3 X + 0.43 \times 10^3$	0.999 9	1.95 ~ 19.5
人参皂苷 R <sub>b<sub>1</sub></sub>	$Y = 12.78 \times 10^3 X + 1.71 \times 10^3$	0.999 9	2.64 ~ 26.4
三七皂苷 R <sub>1</sub>	$Y = 9.10 \times 10^3 X - 0.08 \times 10^3$	0.999 9	3.51 ~ 35.1
特女贞苷	$Y = 16.78 \times 10^3 X - 1.78 \times 10^3$	0.999 9	1.01 ~ 10.1

皂苷 R<sub>1</sub> 和特女贞苷的峰面积, RSD 分别为 1.4%, 1.3%, 1.9%, 1.2%, 1.4%, 表明仪器精密度高。

**2.6 重复性试验** 平行制备 6 份供试品(20130605)溶液, 依照 2.1 项下色谱条件, 测定样品中黄芩苷, 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 和特女贞苷的质量分数分别为 6.267 2, 0.864 5, 0.812 5, 0.889 2, 0.396 3 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.4%, 1.9%, 1.5%, 1.7%, 1.3%, 表明方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 精密吸取上述同一供试品溶液 10 μL, 分别于配制后的 0, 4, 8, 12, 24 h 测定峰面积积分值, 黄芩苷, 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>, 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 和特女贞苷在 24 h 内峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 1.3%, 1.5%, 1.4%, 1.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 称取已知含量的芪白颗粒(20130605)内容物 6 份, 每份约 0.5 g, 按对照品加入量为样品含量的 80%, 100%, 120% 分别准确加入黄芩苷 1 082 mg·L<sup>-1</sup>, 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 109.5 mg·L<sup>-1</sup>, 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 98.8 mg·L<sup>-1</sup>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 106.8 mg·L<sup>-1</sup> 和特女贞苷 52.7 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品(每个质量浓度平行 2 份), 按供试品溶液处理方法制备, 依照 2.1 项下色谱条件进样分析, 计算回收率, 结果见表 2。

**2.9 样品测定** 取 3 批芪白颗粒(批号 20130605, 20130606, 20130607)内容物, 研细, 约 1.0 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下供试品制备方法制备, 见表 3。

### 3 讨论

中药制剂的质量控制问题关乎着其临床疗效、安全性和稳定性, 高标准的质量要求可严格控制产品的质量, 保证疗效和安全, 很大程度上杜绝劣质、甚至无效产品以假乱真、鱼目混珠等现象的发生<sup>[8]</sup>。目前我国中药制剂的质量控制方法主要借鉴化学药物和天然药物的质量控制模式, 针对某一

表 2 芪白颗粒中 5 种成分的加样回收率

Table 2 Recoveries for 5 constituents of Qibai granules

成分	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
黄芩苷	0.500 1	3.134 2	2.705 0	5.802 8	98.65	99.04	0.9
	0.501 3	3.141 7	2.705 0	5.848 9	100.08		
	0.514 6	3.225 1	3.246 0	6.413 4	98.22		
	0.509 8	3.195 0	3.246 0	6.424 8	99.50		
	0.513 5	3.218 2	3.570 6	6.715 6	97.95		
人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	0.500 1	0.432 3	0.349 6	0.770 3	96.68	99.59	2.0
	0.501 3	0.433 4	0.349 6	0.780 7	99.34		
	0.514 6	0.444 9	0.428 0	0.880 4	101.75		
	0.509 8	0.440 7	0.428 0	0.862 1	98.46		
	0.513 5	0.443 9	0.512 5	0.954 5	99.63		
人参皂苷 R <sub>b<sub>1</sub></sub>	0.500 1	0.406 3	0.326 0	0.728 7	98.90	98.43	2.2
	0.501 3	0.407 3	0.326 0	0.721 8	96.47		
	0.514 6	0.418 1	0.404 5	0.816 6	98.52		
	0.509 8	0.414 2	0.404 5	0.802 2	95.92		
	0.513 5	0.417 2	0.494 0	0.920 6	101.90		
三七皂苷 R <sub>1</sub>	0.500 1	0.444 7	0.363 1	0.796 9	96.99	97.53	1.5
	0.501 3	0.445 8	0.363 1	0.791 8	95.29		
	0.514 6	0.457 6	0.448 6	0.892 4	96.92		
	0.509 8	0.453 3	0.448 6	0.896 2	98.73		
	0.513 5	0.456 6	0.534 0	0.980 1	98.03		
特女贞苷	0.500 1	0.198 2	0.158 1	0.351 8	97.15	98.87	1.6
	0.501 3	0.198 7	0.158 1	0.358 9	101.33		
	0.514 6	0.203 9	0.200 3	0.399 2	97.50		
	0.509 8	0.202 0	0.200 3	0.399 5	98.60		
	0.513 5	0.203 5	0.237 2	0.438 0	98.86		
	0.503 7	0.199 6	0.237 2	0.436 2	99.75		

表 3 芪白颗粒样品中 5 种成分的含量测定

Table 3 Contents of 5 constituents in Qibai mg·g<sup>-1</sup>

批号	黄芩苷	人参皂苷 R <sub>g<sub>1</sub></sub>	人参皂苷 R <sub>b<sub>1</sub></sub>	三七皂苷 R <sub>1</sub>	特女贞苷
20130605	6.267 2	0.864 5	0.812 5	0.889 2	0.396 3
20130606	6.384 3	0.875 6	0.836 8	0.865 4	0.381 8
20130607	6.027 5	0.863 7	0.821 6	0.876 8	0.370 4

指标成分进行分析测定,忽略了中药多成分、多靶点的作用特点,忽视了中医药理论在中药制剂中的指导性作用,所建立的质量标准不能准确反映制剂的质量疗效<sup>[9]</sup>,因此很有必要对中药制剂进行多指标的分析测定,提高中药制剂质量控制标准。芪白颗粒成分复杂,主要通过多成分之间的协调作用发挥药效,而目前仅以黄芩苷的含量测定作为其质控标准,难以准确评价其质量、确保临床疗效。

黄芩甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为君药黄芪中的指标成分,由于在药材中的含量仅有万分之几,导致在芪白颗粒中检测困难,故不以二者作为该制剂的含量检测指标。黄芩苷作为臣药黄芩药材的指标成分,具有抑菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等作用<sup>[10]</sup>;特女贞苷作为女贞子药材的指标成分,具有抗氧化、抗衰老等作用,且对心血管系统有广泛的药理作用<sup>[11]</sup>;三七是该制剂中唯一贵重药材,具有抗炎、抗氧化、抗凝血、免疫调节作用<sup>[12]</sup>,主要药效成分为人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和三七皂苷 R<sub>1</sub>。因此,本文选择黄芩中的黄芩苷,三七中的人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 三七皂苷 R<sub>1</sub> 以及女贞子中的特女贞苷含量作为芪白颗粒的质量控制标准。

以上5种成分的液相定量分析,往往需要不同的前处理方法和流动相体系。本研究在预实验的基础上,简化前处理过程,首次使用同一种流动相体系,对5种待测成分采用梯度洗脱方式,使在同一色谱条件下能够有效分离。通过检测器对样品液相色谱图进行紫外全波长扫描,确定最佳的检测波长;在该检测波长下,5种待测成分均表现出一定的吸收强度。该方法操作简单,避免了多波长检测繁琐操作等难题,精密度、重复性、回收率均达到定量分析要求,为芪白颗粒提供了更全面的质控方法。此方法对于同一样品中不同组分的同时定量,对中药制

剂质量评价具有一定的参考意义。

#### [参考文献]

- [1] 丰加涛,金郁,王金成,等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制[J]. 色谱,2008,26(2):180-185.
- [2] 邹桂新,尤献民,张颖,等. 一测多评法在冠脉康胶囊多种成分检测中的应用研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(15):1828-1831.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:11,285.
- [4] 张蕙,李祥,周红燕,等. 反相高效液相色谱法同时测定脉络宁注射液中6种酚酸类成分的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(2):54-56.
- [5] 张乔,俞洋洋,王勤辉,等. 六味地黄制剂多类型成分快速分析和“一测多评”方法建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):81-85.
- [6] 朱晶晶,王智民,匡艳辉,等. 一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J]. 药学学报,2008,43(12):1211-1216.
- [7] 刘志辉,顾玮,常星洁,等. “一测多评”法测定麦贞花颗粒中不同类型成分的含有量[J]. 中成药,2012,34(12):2342-2347.
- [8] 伍振峰,郑琴,杨明,等. 中药制剂质量控制的方法模式分析和研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1332-1336.
- [9] 李文烈,曹海芳,魏刚,等. 中药制剂质量控制的研究进展[J]. 中国执业药师,2012,9(7):32-35.
- [10] 辛文好,宋俊科,何国荣,等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志,2013,22(6):647.
- [11] 邱蓉丽,李璘. 中药女贞子化学与药理研究进展[J]. 中药材,2007,30(7):891-893.
- [12] 朴春花. 三七的药理作用研究进展概述[J]. 中国医药指南,2011,9(13):209-210.

[责任编辑 顾雪竹]