

HPLC-ELSD 测定益心舒分散片中 人参皂苷 Rg_1 , Re, Rb_1 , Rd 和黄芪甲苷

韩宵^{1,2,3}, 闫春风^{2,3}, 朱磊^{2,3}, 董海荣^{2,3*}, 张菁菁^{2,3}, 王凤霞^{2,3}, 孟庆娟²

(1. 承德医学院 中药研究所, 河北 承德 067000; 2. 颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000;
3. 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:建立测定益心舒分散片中人参皂苷 Rg_1 , Re, Rb_1 , Rd 和黄芪甲苷的方法。方法:采用 HPLC-ELSD 法, Shim-pack ODS 色谱柱, 流动相乙腈-水, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果:根据回归方程, 人参皂苷 Rg_1 , Re, Rb_1 , Rd 和黄芪甲苷分别在 $0.685 \sim 3.428 \mu\text{g}$ ($r=0.9995$), $1.819 \sim 9.094 \mu\text{g}$ ($r=0.9990$), $3.717 \sim 18.586 \mu\text{g}$ ($r=1$), $1.042 \sim 5.212 \mu\text{g}$ ($r=0.9995$), $0.388 \sim 1.940 \mu\text{g}$ ($r=0.9998$) 呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 100.05% (RSD 1.6%), 96.21% (RSD 1.1%), 96.20% (RSD 1.1%), 100.52% (RSD 2.5%), 99.26% (RSD 1.6%)。结论:该方法同时测定多种成分, 操作简便, 准确, 重复性好, 可用于益心舒分散片的质量控制。

[关键词] 益心舒分散片; 人参皂苷 Rg_1 ; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb_1 ; 人参皂苷 Rd; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0068-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160068

Determination of Ginsenoside Rg_1 , Re, Rb_1 , Rd and Astragaloside IV in Yixinshu Dispersible Tablets by HPLC-ELSD HAN Xiao^{1,2,3}, YAN Chun-feng^{2,3}, ZHU Lei^{2,3}, DONG Hai-rong^{2,3*}, ZHANG Jing-jing^{2,3}, WANG Feng-xia^{2,3}, MENG Qing-juan² (1. Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM) of Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Jingfukang Pharmaceutical Group Co. Ltd., Chengde 067000, China; 3. New Excipient Engineering Technology Center of TCM of Hebei Province, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining ginsenoside Rg_1 , Re, Rb_1 , Rd and astragaloside IV in Yixinshu dispersible tablets. **Method:** By using HPLC-ELSD, Shim-pack ODS column was eluted with the mobile phase of acetonitrile-water at the flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. **Result:** According to the regression equation, ginsenoside Rg_1 , ginsenoside Re, ginsenoside Rb_1 , ginsenoside Rd and astragaloside IV showed a good linear relationship at $0.685\text{-}3.428 \mu\text{g}$ ($r=0.9995$), $1.819\text{-}9.094 \mu\text{g}$ ($r=0.9990$), $3.717\text{-}18.586 \mu\text{g}$ ($r=1$), $1.042\text{-}5.212 \mu\text{g}$ ($r=0.9995$), $0.388\text{-}1.940 \mu\text{g}$ ($r=0.9998$), respectively. The average recoveries were 100.05% (RSD 1.6%) for ginsenoside Rg_1 , 96.21% (RSD 1.1%) for ginsenoside Re, 96.20% (RSD 1.1%) for ginsenoside Rb_1 , 100.52% (RSD 2.5%) for ginsenoside Rd and 99.26% (RSD 1.6%) for astragaloside IV. **Conclusion:** This method is simple, accurate and highly reproducible and so can be used to simultaneously determine multiple components and control the quality of Yixinshu dispersible tablets.

[Key words] Yixinshu dispersible tablets; ginsenoside Rg_1 ; ginsenoside Re; ginsenoside Rb_1 ; ginsenoside Rd; astragaloside IV

益心舒分散片由益心舒胶囊改剂型而得, 由人参、黄芪、丹参、五味子、麦冬等 7 味药组成的中药复方制剂, 具有益气复脉、活血化瘀、养阴生津的功效。

《中国药典》2010 年版一部中益心舒胶囊均采用高效液相色谱-紫外检测器(HPLC-UV)法 203 nm 下检测人参皂苷 Rg_1 , Re 总量^[1], 而未见该处方制剂有

[收稿日期] 20141009(017)

[第一作者] 韩宵, 在读硕士, 从事制剂工艺及质量标准研究, Tel:18231492496, E-mail:yuxiangpini@126.com

[通讯作者] * 董海荣, 硕士, 正高级工程师, 从事中药新药研发工作, Tel:0314-2292392, E-mail:donghairong312@163.com

人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rd 和黄芪甲苷含量测定的相关报道。人参和黄芪中皂苷类成分的紫外吸收为末端吸收或无吸收, HPLC-UV 检测时存在梯度洗脱基线漂移、干扰较大、检测时间长的问题。蒸发光检测器(ELSD)作为一种通用型质量检测器,其响应值与被检测物质的颗粒大小和数量有关,不存在紫外末端吸收问题,且梯度洗脱时基线很平稳。参考相关文献^[2-14],本文采用 HPLC-ELSD 同时测定益心舒分散片中人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd 和黄芪甲苷的含量,为益心舒分散片质量标准的研究奠定基础。

1 仪器与试剂

1260 系列高效液相色谱仪(Agilent), 3300 型蒸发光散射检测器(Alltech), AE240 型 1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒); 人参皂苷 Rg_1 (批号 110703-201027), 人参皂苷 Re (110754-200822), 人参皂苷 Rb_1 (110704-201223), 人参皂苷 Rd (11818-201302), 黄芪甲苷(110781-200613)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。益心舒分散片由颈复康药业集团有限公司自制(批号 140101, 140102, 140103)。

2 方法与结果

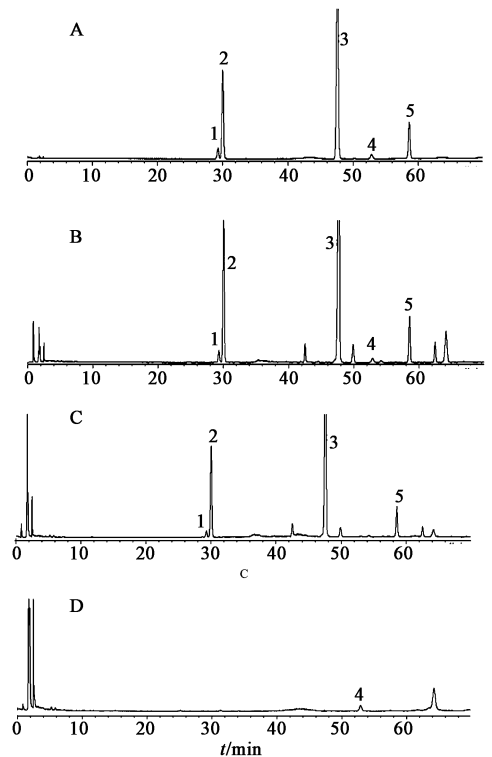
2.1 色谱条件 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 19.5% A; 20 ~ 32 min, 19.5% ~ 27% A; 32 ~ 40 min, 27% ~ 32% A; 40 ~ 50 min, 32% ~ 33% A; 50 ~ 60 min, 33% ~ 38% A; 60 ~ 70 min, 38% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, ELSD 参数漂移管温度为 75 °C, 气体流速 1 L·min⁻¹, 增益为 2, 进样量 5 ~ 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd 和黄芪甲苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.171 4, 0.454 7, 0.929 3, 0.260 6, 0.097 0 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 10 片, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 加入 80% 甲醇 50 mL, 置 85 °C 水浴上回流提取 2 h, 滤过, 蒸干, 残渣加水 15 mL, 微热使溶解; 用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次(15, 15, 10, 10 mL), 合并正丁醇提取液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 15 mL, 弃去氨试液, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 分别取不加入参、黄芪的空白样品, 按 2.3 项下的方法, 制成阴性样品溶液, 即得。

2.5 专属性 分别精密吸取对照品溶液, 供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL, 按 2.1 项色谱条件进行测定, 结果人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rd 和黄芪甲苷与相邻色谱峰的分度均 > 1.5, 理论塔板数以各峰计均在 5 000 以上, 阴性样品溶液在相应位置上未见色谱峰, 益心舒分散片中其他组分不干扰 5 种成分的测定, 方法专属性良好, 见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品; C. 缺黄芪阴性样品; D. 缺人参阴性样品; 1. 人参皂苷 Rg_1 ; 2. 人参皂苷 Re ; 3. 人参皂苷 Rb_1 ; 4. 黄芪甲苷; 5. 人参皂苷 Rd

图 1 益心舒分散片 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Yixinshu Dispersible tablet

2.6 线性关系考察 精密量取对照品溶液, 分别进样 4, 6, 8, 10, 15, 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件, 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, 得回归方程。人参皂苷 Rg_1 回归方程为 $Y = 1.519 8X - 2.414 9$ ($r = 0.999 5$), 人参皂苷 Re 回归方程为 $Y = 1.294 2X - 1.342 5$ ($r = 0.999 0$), 人参皂苷 Rb_1 的回归方程为 $Y = 1.369 3X - 1.604 8$ ($r = 1$), 人参皂苷 Rd 的回归方程为 $Y = 1.455 2X - 1.907 2$ ($r = 0.999 5$), 黄芪甲苷的回归方程为 $Y = 1.199 5X - 1.314 9$ ($r = 0.999 8$)。结果表明人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 、 Rd 和黄芪甲苷分别在 0.685 ~ 3.428, 1.819 ~ 9.094, 3.717 ~ 18.586,

1.042 ~ 5.212, 0.388 ~ 1.940 μg 线性关系良好。

2.7 检测限和定量限 按 2.1 项下色谱条件用对照品溶液稀释进行测定, 确定检测限和定量限。结果人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷定量限分别为 315 ($S/N = 10.92$), 227 ($S/N = 10.47$), 232 ($S/N = 10.17$), 251 ($S/N = 9.89$), 205 ng ($S/N = 9.69$), 检测限分别为 86 ($S/N = 3.09$), 91 ($S/N = 4.39$), 103 ($S/N = 3.24$), 50 ($S/N = 3.49$), 102 ng ($S/N = 3.53$)。

2.8 精密度考察 精密吸取 2.2 项下制备的对照品溶液 10 μL , 按 2.1 项下色谱条件分析, 连续进样 6 次, 测定峰面积值, 结果人参皂苷 R_{g_1} , 人参皂苷 R_e , 人参皂苷 R_{b_1} , 人参皂苷 R_d 和黄芪甲苷的 RSD 分别为 1.9%, 1.4%, 2.1%, 1.7%, 1.8%, 表明精密度良好。

2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样, 测定人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷的峰面积, 结果峰面积积分值 RSD 分别为 0.9%, 0.2%, 0.1%, 0.6%, 0.6%, 表明样品溶液中人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷在 24 h 内稳定。

2.10 重复性试验 取同一批益心舒分散片 (批号 140102), 按 2.3 项下方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件分析, 结果人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷的质量分数分别为 0.717 6, 3.113 9, 6.235 9, 1.190 6, 0.454 0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 2.0%, 2.1%, 2.0%, 1.7%, 1.5%。表明方法的重复性良好。

2.11 加样回收试验 取已知含量的益心舒分散片适量, 精密量取 6 份, 每份约 0.5 g, 精密加入对照品溶液 (含人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷分别为 0.704, 3.090, 6.306, 1.320, 0.512 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 mL, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 并按 2.1 项下色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。

2.12 样品的测定 取 3 批益心舒分散片, 按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 并按 2.1 项下色谱条件进样, 两点法计算益心舒分散片中人参皂苷 R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷的含量, 结果见表 2。

3 讨论

皂苷类成分绝大多数仅在近紫外区有末端吸收或无紫外吸收, 高效液相色谱检测器的响应问题尤为重要。人参中所含的皂苷类成分的紫外吸收均为末端吸收, 常使用 203 nm 波长检测, 易受噪音和梯度洗脱的影响, 灵敏度低, 基线噪音大; 黄芪及其制

表 1 益心舒分散片中 5 种成分的加样回收试验

Table 1 Recovery test of 5 ingredients within Yixinshu dispersible tablet

成分	样品中量 /mg	测得量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	平均值/% (RSD/%)
人参皂苷 R_{g_1}	0.366 6	0.714 6	0.352	98.86	100.05 (1.6)
	0.360 8	0.712 6	0.352	99.94	
	0.366 5	0.718 0	0.352	99.86	
	0.359 3	0.715 3	0.352	101.14	
	0.359 0	0.720 0	0.352	102.56	
人参皂苷 R_e	0.358 9	0.703 6	0.352	97.93	96.21 (1.1)
	1.590 6	3.068 3	1.545	95.64	
	1.565 7	3.058 8	1.545	96.64	
	1.590 6	3.085 1	1.545	96.73	
	1.559 1	3.070 6	1.545	97.83	
人参皂苷 R_{b_1}	1.557 9	3.028 2	1.545	95.16	96.20 (1.1)
	1.557 6	3.029 2	1.545	95.25	
	3.185 3	6.243 9	3.153	97.01	
	3.135 4	6.218 7	3.153	97.79	
	3.185 3	6.224 5	3.153	96.39	
人参皂苷 R_d	3.122 3	6.118 0	3.153	95.01	100.52 (2.5)
	3.119 8	6.118 1	3.153	95.09	
	3.119 2	6.142 5	3.153	95.89	
	0.608 2	1.279 0	0.660	101.64	
	0.598 6	1.274 4	0.660	102.39	
黄芪甲苷	0.608 2	1.285 3	0.660	102.59	99.26 (1.6)
	0.596 1	1.266 0	0.660	101.50	
	0.595 6	1.229 5	0.660	96.04	
	0.595 5	1.248 6	0.660	98.95	
	0.231 9	0.480 4	0.256	97.07	
	0.228 3	0.482 3	0.256	99.22	99.26 (1.6)
	0.231 9	0.486 7	0.256	99.53	
	0.227 3	0.486 7	0.256	101.33	
	0.227 1	0.477 8	0.256	97.93	
	0.227 1	0.484 3	0.256	100.47	

表 2 益心舒分散片样品中 5 种成分含量测定 ($n=3$)

Table 2 Determination of 5 ingredients within Yixinshu dispersible tablet ($n=3$)

批号	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$				
	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_e	人参皂苷 R_{b_1}	人参皂苷 R_d	黄芪甲苷
140101	0.694 3	2.976 0	6.135 0	0.980 1	0.439 1
140102	0.717 6	3.113 9	6.235 9	1.190 6	0.454 0
140103	0.718 1	3.159 5	6.273 9	1.041 5	0.418 2

剂中黄芪甲苷的含量多采用 ELSD 测定。ELSD 仅

对不挥发成分产生信号,其信号响应值仅取决于被分析物质颗粒的大小和数量,不存在紫外末端吸收的问题,通过调节漂移管温度、气体流速等参数可以使基线平稳;流动相必须是挥发性的,在检测前都已挥发,可以用于梯度洗脱。ELSD的流动相不能使用非挥发性的试剂,可以使用的流动相仅有乙腈-水、甲醇-水。本文考察了两种流动相,发现采用乙腈-水梯度洗脱更为理想。故本文采用HPLC-ELSD法以乙腈-水为流动相梯度洗脱进行测定。

实验时曾采用益心舒胶囊含量测定项下供试品处理的方法,发现供试品溶液在色谱条件下其HPLC图谱在黄芪甲苷处没有出峰或几乎没峰,故本文在保证4种人参皂苷含量的前提下,尝试不同的处理方法以提高供试品溶液中黄芪甲苷的含量。考察甲醇回流提取和超声提取2种方法,结果回流提取方法优于超声提取,且色谱图中黄芪甲苷峰峰形较好。进而考察甲醇回流提取时间及甲醇体积分数的影响,60%,70%,80%,90%,100%甲醇分别回流提取2h,80%甲醇分别回流提取1,2,3h,最终确定80%甲醇回流提取2h。

水饱和正丁醇振摇提取次数考察时,将第4次、第5次提取液单独浓缩在色谱条件下测定,第4次正丁醇提取的色谱图仅在人参皂苷Rd处有一较小峰,而第5次提取液色谱条件下未检测到物质,故正丁醇提取液振摇提取4次即可。由于黄芪甲苷在碱性环境下存在转化的过程,故考察氨试液和浓氨试液洗涤正丁醇提取液,综合实验结果和操作过程,最终选择氨试液为洗涤溶剂。

[参考文献]

[1] 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,2010:1022.
[2] 周超群,周佩. 人参皂苷Rd的研究进展[J]. 中草药,

2009,40(5):832-836.

[3] 王强,莫雪梅,杨小英,等. 人参皂甙治疗心血管疾病的现代研究进展[J]. 心血管病学进展,2006,27(3):325-327.
[4] 刘天一,何观虹,姚丽. 黄芪甲苷治疗心血管疾病研究进展[J]. 中医药信息,2013,30(2):117-120.
[5] 林林,刘广楨,刘洪超,等. HPLC-ELSD法同时测定心脑血管舒口服液液中7种皂苷类成分[J]. 中成药,2014,36(1):90-94.
[6] 徐鹏,冯素香,赵迪,等. HPLC-ELSD法测定血塞通注射液中三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁、Rd[J]. 中成药,2013,35(3):512-524.
[7] 杜佳新,顾玉红,李萌. HPLC法测定益心舒胶囊中人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的含量[J]. 中药实验方剂学杂志,2010,16(11):88-90.
[8] 谭洁萍,姚蓉,苏倩,等. 高效液相色谱法同时测定复方扶芳藤合剂中人参皂苷Rb₁和黄芪甲苷的含量[J]. 中国医院药学志,2012,23(5):353-378.
[9] 黄海欣. ELSD-HPLC法测定生脉饮中人参皂苷Re、Rg₁和Rb₁的含量[J]. 中国药师,2010,13(7):1045-1046.
[10] 胡杰,秦雪梅,郭小青,等. HPLC-ELSD法测定人参茎叶中人参皂苷Rg₁、Re、Rd的含量[J]. 山西医科大学学报,2008,39(12):1095-1098.
[11] 霍理华,谭科. HPLC-ELSD法测定愈伤灵胶囊中5中皂苷类成分[J]. 中南药学,2014,12(5):481-484.
[12] 唐露,李希,冯建安,等. HPLC-ELSD法测定舒络颗粒中黄芪甲苷、三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁的含量[J]. 实用中医药杂志,2012,28(11):964-967.
[13] 吴迪,叶秋熊,王德勤,等. HPLC-ELSD法同时测定复方丹参片中4种皂苷的含量[J]. 世界中医药,2013,8(2):201-204.
[14] 陈祖云,石凌云,黄勇,等. HPLC-ELSD法测定脑络通颗粒中黄芪甲苷和人参皂苷Rb₁的含量及稳定性[J]. 中国药房,2011,22(23):2164-2166.

[责任编辑 顾雪竹]