

HPLC-ELSD 同时测定益心血脂康胶囊中 4 种皂苷类活性成分

张留记^{1,2}, 徐贞贞¹, 屠万倩^{2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450008; 2. 河南省中医药研究院, 郑州 450004)

[摘要] 目的:建立 HPLC-ELSD 同时测定益心血脂康胶囊中人参皂苷 R_{g1}, R_{b1}, R_d 和黄芪甲苷含量的方法。方法:采用 SHIMADZU C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速 1 mL·min⁻¹, 蒸发光检测器(ELSD)漂移管温度 60 °C, 雾化室温度 30 °C, 载气压强 23.0 psi。结果:益心血脂康胶囊中活性成分人参皂苷 R_{g1}, R_{b1}, R_d 和黄芪甲苷的分离度良好, 各成分质量浓度与峰面积在测定范围内呈良好的对数线性关系($r \geq 0.9991$), 平均回收率分别为 99.60% (RSD 1.6%), 99.89% (RSD 2.8%), 98.13% (RSD 2.7%), 98.36% (RSD 2.5%)。结论:该方法简便易行、准确度高、重复性好, 可作为益心血脂康胶囊的质量控制方法。

[关键词] 益心血脂康胶囊; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器; 人参皂苷 R_{g1}; 人参皂苷 R_{b1}; 人参皂苷 R_d; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0089-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110089

Simultaneous Determination of Four Active Saponins Compounds in Yixin Xuezhikang Capsules by HPLC-ELSD

ZHANG Liu-ji^{1,2}, XU Zhen-zhen¹, TU Wan-qian^{2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Henan Province Chinese Medicine Research Institute, Zhengzhou 450004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method for simultaneous determination of ginsenosides R_{g1}, R_{b1}, R_d and astragaloside IV in Yixin Xuezhikang capsules. **Method:** Shimadzu C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used, with acetonitrile - water as the mobile phase for gradient elution. The column temperature was 35 °C, with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The temperature of ELSD drift tube was set at 60 °C, temperature of atomizing chamber at 30 °C and the gas pressure was 23.0 psi. **Result:** Excellent chromatographic separation was achieved for four active compounds (ginsenosides R_{g1}, R_{b1}, R_d, and astragaloside IV) with good linearity ($r \geq 0.9991$) within the measurement range between mass concentration and peak area. The average recovery rate was 99.60% (RSD 1.6%), 99.89% (RSD 2.8%), 98.13% (RSD 2.7%) and 98.36% (RSD 2.5%) respectively for these four compounds. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reproducible, and can be used as the quality control method for Yixin Xuezhikang capsules.

[Key words] Yixin Xuezhikang capsules; HPLC-ELSD; ginsenoside R_{g1}; ginsenoside R_{b1}; ginsenoside R_d; astragaloside IV

益心血脂康胶囊是河南省中医药研究院附属医院院内制剂,由黄芪、三七、川芎 3 味中药经提取制

成,临床用于气虚血瘀的胸痹、心痛病,证见胸痛、痛有定处、反复发作,胸闷气短、动则喘息,心悸易汗,

[收稿日期] 20150504(011)

[基金项目] 河南省中医药科学研究专项(2013ZY02009)

[第一作者] 张留记,博士,研究员,从事中药、天然药物质量控制及新药开发研究, Tel:0371-66331598, E-mail: zlj6666671@163.com

[通讯作者] *屠万倩,硕士,副研究员,从事中药分析、天然药物化学成分研究, Tel:0371-66331718, E-mail: wqtu632@126.com

倦怠懒言,舌质紫黯或舌边有齿痕或瘀点、瘀斑,苔薄白,脉沉细弱或结代等,以及冠心病、心绞痛见上述症状者。

据报道,黄芪化学成分主要有黄酮、皂苷、多糖、氨基酸等,皂苷类是比较重要的药效成分,而黄芪甲苷的含量最高^[1-2],也是黄芪药材的定性定量指标性成分^[3],研究表明,黄芪甲苷在心血管、免疫和内分泌系统等均具有广泛的药理作用,如通过钙拮抗作用达到护心、强心的目的^[4]。三七化学成分有皂苷类、三七素、黄酮类、多糖、炔醇类、挥发油等,其中皂苷类成分是其活性成分,以人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 含量最高,三七总皂苷可保护心肌细胞、抗血栓、抗心律失常、降血脂、延缓衰老、提高记忆等^[5-6]。在成药中人参皂苷类成分的测定研究报道中,多参照 2010 年版《中国药典》一部人参和三七的含量测定项,选择人参皂苷 Rg_1 , Rb_1 , Re 和三七皂苷 R_1 等成分作为定量指标^[7-10],三七、黄芪合用的成药中皂苷类成分的测定则多选择黄芪甲苷作为黄芪的定量指标^[11],较少有用人参皂苷 Rd 作为人参皂苷类指标成分的报道,人参皂苷 Rd 是活性较高、药效较强的单体皂苷^[12],并且据文献^[12-14]报道,药材经发酵或提取加热,人参皂苷 Rb_1 等皂苷可转化降解为人参皂苷 Rd 。选择人参皂苷 Rd 作为指标成分,不仅可控制制剂中的有效成分含量,还可监控制剂生产工艺的稳定性。因此,本文拟采用 HPLC-ELSD 法同时测定益心血脂康胶囊中黄芪甲苷和人参皂苷 Rg_1 , Rb_1 , Rd 的含量,为评价制剂的内在质量提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 2996 型高效液相色谱仪(包括 2695 型分离单元,2420 型蒸发光散射检测器,Empower II 色谱工作站,美国 Waters 公司),LIBROR-160DPT 型 1/万分析天平(日本岛津公司),AE240 型 1/10 万分之分析天平(瑞士 Mettler 公司)。

1.2 试剂及药物 人参皂苷 Rg_1 (批号 110703-201128),人参皂苷 Rb_1 (批号 110704-201223),人参皂苷 Rd (批号 111818-201201),黄芪甲苷(批号 110781-201112)对照品均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。样品益心血脂康胶囊(批号 20141010, 20141015, 20141022),由河南省中医药研究院附属医院制剂室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Shimadzu C_{18} 色谱柱(4.6 mm ×

150 mm, 5 μ m),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 35 min, 18% A; 35 ~ 45 min, 18% ~ 29% A; 45 ~ 55 min, 29% A; 55 ~ 85 min, 29% ~ 40% A; 85 ~ 90 min, 40% ~ 70% A; 90 ~ 100 min, 70% A),柱温 35 $^{\circ}$ C,流速 1 mL \cdot min⁻¹,对照品溶液进样 10, 20 μ L,供试品溶液进样 8 μ L,ELSD 漂移管温度 60 $^{\circ}$ C,雾化室温度 33 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取人参皂苷 Rg_1 , Rb_1 , Rd 和黄芪甲苷对照品适量,加甲醇溶解并配制成质量浓度分别为 0.553, 0.406, 0.115, 0.043 g \cdot L⁻¹ 的混合对照品溶液。

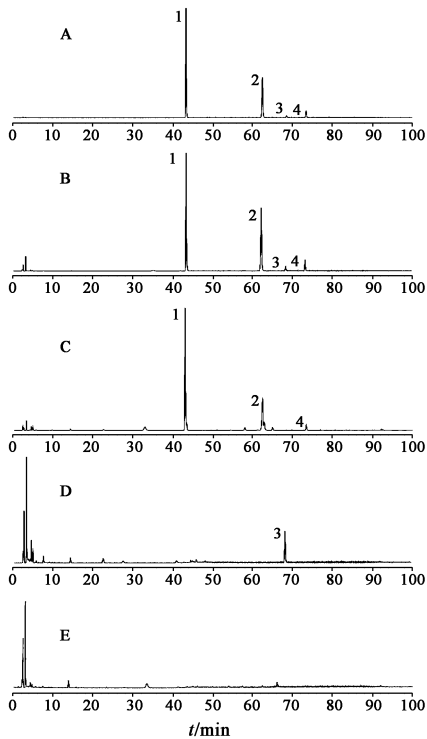
2.2.2 供试品溶液 取益心血脂康胶囊内容物约 10 g,研细,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷 70 mL,加热回流 90 min,取出滤纸筒晾干,弃去三氯甲烷液;再加甲醇 70 mL,加热回流 6 h,提取液回收溶剂并蒸干,残渣加水 15 mL,微热使溶解,用水饱和正丁醇提取 4 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用 40% 氨水洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,柱高 12 cm),依次以水, 40% 乙醇溶液各 50 mL 洗脱,弃去洗脱液,用 70% 乙醇溶液 120 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,用 0.45 μ m 孔径微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按益心血脂康胶囊的处方比例和制备工艺,分别制备缺黄芪阴性、缺三七阴性样品和黄芪、三七双缺阴性样品。再按 2.2.2 项下方法分别制备缺黄芪阴性、缺三七阴性样品溶液和缺黄芪、三七双阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 分别吸取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进行分析。结果显示,人参皂苷 Rg_1 , Rb_1 , Rd 和黄芪甲苷与其他峰分离度良好,阴性无干扰,见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下的混合对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μ L,注入液相色谱仪,测定人参皂苷 Rg_1 , Rb_1 , Rd 和黄芪甲苷的峰面积积分值,以进样量(μ g)的常用对数为横坐标,峰面积的常用对数为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程,见表 1。

2.5 稳定性试验 精密吸取按 2.2.2 项下方法制备的同一供试品溶液 8 μ L,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进行测定并计算,人参皂苷 Rg_1 , Rb_1 , Rd 和黄芪甲



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺黄芪阴性样品; D. 缺三七阴性样品; E. 黄芪、三七双缺阴性样品; 1. 人参皂苷 R_{g_1} ; 2. 人参皂苷 R_{b_1} ; 3. 黄芪甲苷; 4. 人参皂苷 R_d

图 1 益心血脂康胶囊 HPLC-ELSD

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatogram of Yixin Xuezhikang capsules

表 1 4 种成分回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
人参皂苷 R_{g_1}	$Y = 1.49X + 5.13$	0.999 1	2.765 ~ 13.825
人参皂苷 R_{b_1}	$Y = 1.62X + 4.96$	0.999 4	2.030 ~ 10.150
人参皂苷 R_d	$Y = 1.69X + 4.99$	0.999 9	0.575 ~ 2.875
黄芪甲苷	$Y = 1.74X + 5.15$	0.999 7	0.215 ~ 1.075

苷的峰面积 RSD 分别为 3.6% , 4.8% , 3.5% , 2.6% 。结果表明,供试品溶液室温放置 10 h 内稳定性良好。

2.6 精密度试验 精密吸取按 2.2.2 项下方法制备的同一供试品溶液 8 μL ,连续进样测定 6 次,得到人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷的峰面积 RSD 分别为 3.1% , 2.9% , 2.7% , 3.8% 。结果表明,仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批样品(批号 20141022) 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷的平均质量分数分别为 2.503, 2.450, 0.609, 0.286 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.8% , 2.0% ,

2.3% , 3.2% ,表明方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批样品(批号 20141022) 6 份,每份约 5 g,精密称定,置索氏提取器中,精密加入混合对照品溶液(人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} , R_d 和黄芪甲苷的质量浓度分别为 11.27, 10.13, 3.47, 1.32 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL,待加入的溶剂挥干后,按 2.2.2 项下方法制备加样回收供试品溶液,按 2.1 项下方法测定并计算回收率,结果见表 2。

表 2 益心血脂康中 4 种成分的加样回收率测定

Table 2 Results of recovery tests of Yixin Xuezhikang capsules

成分	称样量 /g	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
人参皂苷 R_{g_1}	5.006 1	12.54	11.27	23.66	98.67	99.60	1.6
	4.997 0	12.52	11.27	23.55	97.87		
	5.010 8	12.55	11.27	23.73	99.20		
	5.009 4	12.55	11.27	24.08	102.31		
	4.999 4	12.52	11.27	23.66	98.85		
人参皂苷 R_{b_1}	5.005 1	12.54	11.27	23.89	100.71		
	5.006 1	12.25	10.13	22.64	102.57	99.89	2.8
	4.997 0	12.23	10.13	22.50	101.38		
	5.010 8	12.27	10.13	22.14	97.43		
	5.009 4	12.26	10.13	22.71	103.16		
人参皂苷 R_d	4.999 4	12.24	10.13	22.13	97.63		
	5.005 1	12.25	10.13	22.09	97.14		
	5.006 1	3.06	3.47	6.50	99.14	98.13	2.7
	4.997 0	3.05	3.47	6.35	95.10		
	5.010 8	3.06	3.47	6.43	97.12		
黄芪甲苷	5.009 4	3.06	3.47	6.40	96.25		
	4.999 4	3.05	3.47	6.47	98.56		
	5.005 1	3.06	3.47	6.62	102.59		
	5.006 1	1.45	1.32	2.71	95.45	98.36	2.5
	4.997 0	1.44	1.32	2.74	98.48		
	5.010 8	1.45	1.32	2.75	98.48		
	5.009 4	1.45	1.32	2.80	102.27		
	4.999 4	1.44	1.32	2.71	96.21		
	5.005 1	1.45	1.32	2.76	99.24		

2.9 样品含量测定 取 3 批益心血脂康胶囊内容物,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 8 μL ,对照品溶液 10, 20 μL ,分别注入液相色谱仪,测定,外标两点法对数方程计算各成分的含量,结果见表 3。

表 3 3 批益心血脂康样品 4 种成分的含量测定

Table 3 Determination results of Yixin Xuezhikang capsules

批号	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}	人参皂苷 R _d	黄芪甲苷
20141010	2.604	2.508	0.634	0.272
20141015	2.430	2.384	0.605	0.294
20141022	2.505	2.448	0.611	0.289

3 讨论

在试验中,曾采用 HPLC-DAD-ELSD 串联同时测定人参皂苷 R_{g1}, R_{b1}, R_d 和黄芪甲苷的含量,经比较色谱图并计算分析,紫外检测器和蒸发光散射检测器测得的人参皂苷 R_{g1}, R_{b1}, R_d 的含量基本一致,但由于人参皂苷和黄芪甲苷的紫外吸收均在 200~203 nm,属紫外末端吸收,待测成分的吸收峰小,基线噪声较大,试验 RSD 偏大;而蒸发光散射色谱图基线相对平稳,ELSD 检测器对皂苷类成分均有较好响应,且不受流动相溶剂与样品中其他成分的干扰,因而本试验采用 HPLC-ELSD 法同时测定人参皂苷 R_{g1}, R_{b1}, R_d 和黄芪甲苷的含量,结果表明分离度好,精密性、稳定性、重复性和回收率均符合含量测定要求,可作为益心血脂康胶囊中人参皂苷 R_{g1}, R_{b1}, R_d 和黄芪甲苷定量方法。

参考有关文献^[15-16]并经过反复试验,确定了流动相乙腈-水的梯度洗脱程序,可使待测成分与干扰物质较好分离,阴性无干扰,并在待测成分出峰后通过提高流动相中乙腈的比例来达到消除样品中杂质可能对连续进样带来的干扰,同时起到保护色谱柱的作用。

在选择供试品溶液制备方法时,参照 2010 年版《中国药典》一部中黄芪含量测定项下供试品溶液的制备方法,试验中也分别比较了三氯甲烷脱脂与过大孔吸附树脂柱对含量测定的影响,经 HPLC 检测,未经脱脂与未过大孔吸附树脂柱的样品色谱图中杂质峰较多,影响了待测成分的准确定量。另外,在试验中,还对索氏提取时间、水饱和的正丁醇提取次数和氨试液洗涤次数等进行了考察,以本文所选供试品制备方法操作较简单,重复性较好。

本文建立了同时测定益心血脂康胶囊中人参皂苷 R_{g1}, R_{b1}, R_d 和黄芪甲苷 4 种活性成分含量的方法,该方法准确可靠,可用于益心血脂康胶囊的质量控制,同时也为含人参、三七和黄芪的复方制剂的定

量控制研究提供了参考。

[参考文献]

[1] 梁丽娟,谢俊大,赵奎君. 黄芪中化学成分比较的研究进展[J]. 中国药房, 2009, 20(36): 2877-2878.

[2] 张蕾,高文远,满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.

[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: 283.

[4] 石海莲,吴大正,胡之璧. 黄芪皂苷甲的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(8): 565-567.

[5] 夏鹏国,张顺仓,梁宗锁,等. 三七化学成分的研究历程和概况[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2564-2570.

[6] 王海燕,容蓉,田景振. 三七活性成分药理作用及临床应用概述[J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(2): 178-180.

[7] 许勇,诸艳蓉,王柯,等. HPLC 测定复方丹参胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{b1} 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 148-151.

[8] 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 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的含量[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(11): 964-967.

[9] 林林,刘广楨,刘洪超,等. HPLC-ELSD 法同时测定心脑血管舒口服液 7 中皂苷类成分[J]. 中成药, 2014, 36(1): 90-94.

[10] 张建伟,赵倩,何希荣,等. HPLC 测定中成药中人参皂苷类成分含量的应用概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 228-231.

[11] 丁领振,胡容峰,王键,等. 络络欣通胶囊的质量控制研究[J]. 中成药, 2014, 36(2): 296-300.

[12] 陈旸,王义,孙亮,等. 植物乳杆菌发酵转化人参皂苷的研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1435-1440.

[13] 余潇琴,苗青,方翠芬. 人参皂苷水溶液热稳定性研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(12): 1109-1112.

[14] 张留记,杨明杰,屠万倩. HPLC 法同时测定人参-牡丹皮成分组中 6 种有效成分的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(6): 746-749.

[15] 吴笛,叶秋雄,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.

[16] 冯旭,邓家刚,李松. 复方黄根颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房, 2011, 22(15): 1402-1404.

[责任编辑 顾雪竹]