

## HPLC-ELSD 同时测定参芪复方颗粒中 皂苷类成分的含量

单丽芳<sup>1</sup>, 袁彩<sup>1</sup>, 杨红梅<sup>1</sup>, 曹蕾<sup>1</sup>, 谈静<sup>2</sup>, 高天<sup>2</sup>, 袁强华<sup>2</sup>, 宋英<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

**[摘要]** 目的:建立同时测定参芪复方颗粒中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 和黄芪甲苷含量的方法,为该制剂的质量控制提供参考。方法:采用 HPLC-ELSD,流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min, 81% A; 3~20 min, 81%~78% A; 20~28 min, 78%~77% A; 28~33 min, 77%~75% A; 33~40 min, 75%~65.7% A; 40~52 min, 65.7%~70% A; 52~62 min, 70% A),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,气体流量 2.6 L·min<sup>-1</sup>,漂移管温度 102 °C。结果:人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 和黄芪甲苷分别在 0.196~2.976, 0.207~3.138, 0.191~2.895, 0.190~2.879 μg 与色谱峰面积呈良好线性关系,平均回收率分别为 99.27% (RSD 1.5%), 99.33% (RSD 1.1%), 99.32% (RSD 1.0%), 99.27% (RSD 2.4%)。结论:该含量测定方法同时测定参芪复方颗粒中多种指标成分时,精密度高、重复性好,可用于该制剂的质量控制。

**[关键词]** 参芪复方颗粒; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 黄芪甲苷

**[中图分类号]** R284.1; R283.6; R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0102-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140102

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160215.1125.004.html>

**[网络出版时间]** 2016-02-15 11:25

### Simultaneous Determination of Saponins in Shenqi Compound Granules by HPLC-ELSD

SHAN Li-fang<sup>1</sup>, YUAN Cai<sup>1</sup>, YANG Hong-mei<sup>1</sup>, CAO Lei<sup>1</sup>, TAN Jing<sup>2</sup>,  
GAO Tian<sup>2</sup>, YUAN Qiang-hua<sup>2</sup>, SONG Ying<sup>2\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method for determining four kinds of saponins in Shenqi compound granules. **Method:** Quantitative analysis was carried out on a column of Phenomenex C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by HPLC-ELSD with mobile phase of acetonitrile-water under a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was 25 °C, flow rate of carrier gas was 2.6 L·min<sup>-1</sup>, drift tube temperature was 102 °C. **Result:** Linear ranges of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Re, ginsenoside Rb<sub>1</sub> and astragaloside IV were 0.196-2.976, 0.207-3.138, 0.191-2.895, 0.190-2.879 μg; their recoveries were 99.27%, 99.33%, 99.32%, 99.27%, RSDs were 1.5%, 1.1%, 1.0% and 2.4%, respectively. **Conclusion:** This method is accurate, reproducible and convenient for quality control over Shenqi compound granules.

**[Key words]** Shenqi compound granules; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Re; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; astragaloside IV

参芪复方为成都中医药大学谢春光教授的临床经验方,由人参、黄芪、地黄、天花粉、丹参、山茱萸、

**[收稿日期]** 20150626(010)

**[基金项目]** 四川省科技支撑项目(2014SZ0140)

**[第一作者]** 单丽芳,在读硕士,从事中药理论应用与新制剂研究, Tel:18380228289, E-mail:465352726@qq.com

**[通讯作者]** \* 宋英,主任药师,硕士生导师,从事中药炮制与制剂研究, Tel:028-87783735, E-mail: songying624@163.com

山药、制大黄 8 味药材组成,具有益气养阴、清热生津、活血化瘀的作用<sup>[1]</sup>,主要用于调节血糖、改善症状、防治糖尿病大血管病变等<sup>[2]</sup>。临床以汤剂入药多年,疗效显著,在保障药效的前提下,为使患者用药方便,且考虑颗粒剂吸收快、易于携带等特点<sup>[3]</sup>,拟将该方开发成颗粒剂。人参、黄芪为方中君药,现代药理研究表明二者的主要有效成分为皂苷类化合物(人参皂苷  $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rb_1$  及黄芪甲苷)<sup>[4-6]</sup>,这些成分具有降血糖、改善血管内皮细胞损伤等作用<sup>[7-8]</sup>,故以该 4 类成分为指标,表征参芪复方颗粒的质量。近年来,单独测定制剂中人参皂苷类成分<sup>[9-11]</sup>或黄芪甲苷的研究<sup>[12-14]</sup>已有大量报道,但二者同时测定的研究却少有报道<sup>[15]</sup>。本实验采用 HPLC-ELSD,建立了同时测定人参皂苷  $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rb_1$  和黄芪甲苷含量的方法,探讨了适于其化学性质和该制剂特点的样品提取方法,为参芪复方颗粒的质量控制提供参考。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器(美国格雷斯科公司),BP-211D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。人参皂苷  $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rb_1$  和黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110703-201128, 110754-201324, 110704-201424, 110781-201314);参芪复方颗粒(成都中医药大学附属医院药剂室,批号 20150508, 20150509, 20150510),乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Phenomenex  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min, 81% A; 3~20 min, 81%~78% A; 20~28 min, 78%~77% A; 28~33 min, 77%~75% A; 33~40 min, 75%~65.7% A; 40~52 min, 65.7%~70% A; 52~62 min, 70% A),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25  $^{\circ}$ C,气体流量 2.6 L·min<sup>-1</sup>,漂移管温度 102  $^{\circ}$ C,进样量 10  $\mu$ L。

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 混合对照品溶液

分别精密称取人参皂苷  $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rb_1$  和黄芪甲苷适量,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇制成质量浓度依次为 0.109 7, 0.099 7, 0.112 6, 0.072 6 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

#### 2.2.2 供试品溶液<sup>[16-18]</sup>

取本品适量,研细,精密称取约 2 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 60 mL,密塞,超声 1 h,摇匀,滤过,滤液回收甲醇至干,

残渣加水 50 mL 使溶解,用水饱和的正丁醇振荡提取 5 次,每次 60 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 3 次,每次 60 mL,弃去氨液,正丁醇液减压回收至干,残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 2.2.3 阴性样品溶液

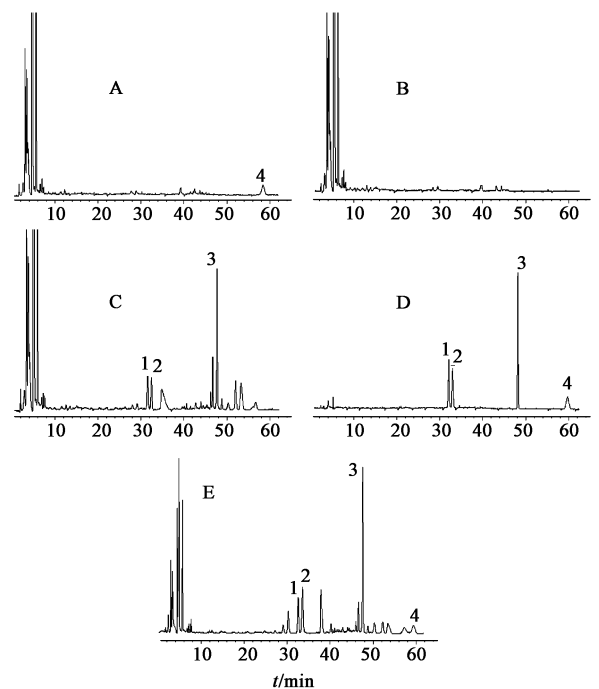
分别按处方比例称取缺人参、黄芪的阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备阴性样品溶液。

#### 2.2.4 双阴性样品溶液

取缺人参和黄芪的双阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备双阴性样品溶液。

### 2.3 专属性考察

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及人参阴性、黄芪阴性、双阴性样品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,见图 1。结果表明人参皂苷  $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rb_1$  和黄芪甲苷与相邻色谱峰的分离度均 > 1.5,且对称性良好,阴性无干扰。



A. 人参阴性样品; B. 双阴性样品; C. 黄芪阴性样品; D. 混合对照品; E. 供试品; 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

图 1 参芪复方颗粒 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Shenqi compound granules

### 2.4 线性关系考察

精密量取人参皂苷  $Rg_1$ ,  $Re$ ,  $Rb_1$  和黄芪甲苷的混合溶液(质量浓度分别为 297.60, 313.82, 289.54, 287.88 mg·L<sup>-1</sup>),用甲醇依次稀释成系列混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,以进样量的对数值为横坐标,峰面积的对数值为纵坐标,得回归方程依次为  $Y = 1.200X + 3.190$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 1.070X + 3.272$  ( $r = 0.9990$ ),

$Y = 1.071X + 3.573 (r = 0.9999)$ ,  $Y = 1.114X + 3.499 (r = 0.9997)$ , 线性范围分别为 0.196 ~ 2.976, 0.207 ~ 3.138, 0.191 ~ 2.895, 0.190 ~ 2.879  $\mu\text{g}$ 。

**2.5 精密度试验** 精密吸取 2.2.1 项下对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Re}$ ,  $\text{Rb}_1$  和黄芪甲苷峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.9%, 0.9%, 0.6%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 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制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定, 计算人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Re}$ ,  $\text{Rb}_1$  和黄芪甲苷峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.4%, 0.6%, 0.8%, 表明供试品溶液室温放置 10 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取同一批次的参芪复方颗粒, 按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Re}$ ,  $\text{Rb}_1$  和黄芪甲苷的平均质量分数分别为 1.572, 1.742, 1.791, 0.484  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 2.7%, 2.6%, 1.4%, 2.2%, 表明该方法重复性良好。

**2.8 加样回收试验** 取已知含量的同一批次样品(含人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Re}$ ,  $\text{Rb}_1$  和黄芪甲苷质量分数分别为 1.572, 1.742, 1.791, 0.484  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 6 份, 研细, 每份 1 g, 精密称定, 分别精密加入混合对照品溶液 3 mL(人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Re}$ ,  $\text{Rb}_1$  和黄芪甲苷质量浓度依次为 0.524, 0.580, 0.597, 0.161  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算平均加样回收率分别为 99.27%, 99.33%, 99.32%, 99.27%, RSD 依次为 1.5%, 1.1%, 1.0%, 2.4%。

**2.9 样品测定** 取不同批次的参芪复方颗粒样品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 采用外标两点法计算人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Re}$ ,  $\text{Rb}_1$  和黄芪甲苷的含量, 结果见表 1。

表 1 参芪复方颗粒中指标成分的含量测定

Table 1 Determination of active components in Shenqi compound granules  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	人参皂苷 $\text{Rg}_1$	人参皂苷 $\text{Re}$	人参皂苷 $\text{Rb}_1$	黄芪甲苷
20150508	1.573 1	1.741 1	1.790 1	0.485 4
20150509	1.368 2	1.703 2	1.782 4	0.423 7
20150510	1.543 1	1.680 4	1.541 9	0.465 2

### 3 讨论

**3.1 参芪复方颗粒有效成分的提取** 在成方制剂

中, 样品的前处理可能会显著影响其化学成分含量测定的结果。因此, 在中药质量标准研究时, 不仅要重视指标性成分的含量, 还应重视前处理方法对测定结果的影响。研究过程中采用单因素试验, 以提取溶剂、提取方法、提取时间为考察因素, 对其药效成分的提取方式进行优化。皂苷类成分一般有较强的极性, 易溶于水、甲醇、乙醇等极性溶剂<sup>[16]</sup>, 预试验中以 70% 甲醇、甲醇、乙醇和 70% 乙醇为提取溶剂, 超声 30 min, 考察指标性成分含量的变化。结果不同提取溶剂中人参皂苷类成分提取量依次为 4.183, 5.094, 4.591, 3.498  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 黄芪甲苷提取量依次为 0.457, 0.483, 0.435, 0.313  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明以甲醇作为提取溶剂时有效成分含量较高, 且色谱峰形较好, 故选择甲醇作为提取溶剂。

以甲醇为溶剂, 考察了索氏提取法、超声法、浸渍法对皂苷类成分提取效果的影响。结果超声法和索氏提取法含量测定基本一致, 但后者耗时长且操作不方便, 综合考虑, 选择超声法进行提取。以甲醇为溶剂, 考察了超声 10, 30, 50, 60, 70 min 时皂苷类成分含量的变化, 结果表明随提取时间的增加, 样品中皂苷类成分含量逐渐增加, 但 70 min 较 60 min 增加不明显, 提示当提取时间达 60 min 时, 所需成分已基本提取完全, 故确定提取时间 60 min。

**3.2 碱性洗涤液的选择** 黄芪中 5 种黄芪皂苷类成分以黄芪皂苷 IV 为基本母核, 其糖链上连接 1 ~ 3 个乙酰基, 当用碱处理时, 乙酰基易脱落而成为黄芪皂苷 IV, 黄芪皂苷 IV 为母核的皂苷类成分经碱处理后有可能转化为黄芪甲苷<sup>[19]</sup>。张爱华等<sup>[20]</sup>发现用碱水洗涤与不用碱水洗涤对黄芪甲苷含量有明显的影响, 因此在样品处理时碱水的洗涤不仅可去除杂质, 还对黄芪甲苷含量测定起着至关重要的作用, 且碱强度不同, 含量也有差异。

考察前处理过程中正丁醇萃取液用不同强度碱液洗涤对成分含量的影响进行了比较, 考察了浓氨试液, 1% 氢氧化钠溶液及氨试液对黄芪甲苷含量的影响, 结果黄芪甲苷质量分数依次为 0.420, 0.482, 0.485  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表明氨试液和 1% 氢氧化钠溶液洗涤时, 黄芪甲苷的含量较高且差异小, 但因氨试液洗涤时色谱峰形较好, 故采用氨试液为正丁醇萃取液的洗涤溶剂。

**3.3 流动相的选择** 本文尝试了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水等流动相系统, 因在乙腈-水系统中, 人参皂苷类成分和黄芪甲苷的分离度及对称性均良好, 故选用此系统。参考文献[9-15]及 2010 年

版《中国药典》<sup>[18]</sup>,以水为流动相A,乙腈为流动相B,采用梯度洗脱,筛选出3个效果较好的色谱条件。色谱条件1(0~3 min,81% A;3~20 min,81%~78% A;20~28 min,78%~77% A;28~33 min,77%~74% A;33~45 min,74%~60% A;45~52 min,60%~81% A),此条件所需成分分离度及对称性均良好,但黄芪阴性有干扰。色谱条件2(0~3 min,81% A;3~20 min,81%~78% A;20~28 min,78%~77% A;28~33 min,77%~75% A;33~40 min,75%~65% A;40~52 min,65%~70% A),此时人参皂苷 R<sub>g1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 各色谱峰之间互不干扰,但黄芪甲苷与杂质峰有部分重叠,分离效果较差。色谱条件3(0~3 min,81% A;3~20 min,81%~78% A;20~28 min,78%~77% A;28~33 min,77%~75% A;33~40 min,75%~65% A;40~52 min,65.7%~70% A;52~62 min,70% A),此条件下,成分分离度及对称性均良好,阴性无干扰,故确定采用色谱条件3。

**3.4 ELSD 参数的优化** 本文考察了漂移管温度60,80,102,105℃和气体流量2.0,2.5,2.6,2.7 L·min<sup>-1</sup><sup>[12-14]</sup>,综合测定结果,从噪音声大小对基线影响情况来看,选择漂移管温度102℃,气体流量2.6 L·min<sup>-1</sup>效果最好。

[参考文献]

[1] 朱海燕,高泓,郭保根,等.参芪复方对2型糖尿病大血管病变小鼠糖脂代谢及骨骼肌病变的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):124-128.  
[2] 呼永河,侯君,郑德志,等.参芪复方对糖尿病模型大鼠血管病变的保护作用及机制[J].中国中西医结合杂志,2014,34(9):1078-1085.  
[3] 张惠,胡敏.中药配方颗粒剂的临床应用评价[J].西部医学,2011,23(7):1355-1358.  
[4] 孟凡丽,苏晓田,郑毅男,等.人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对糖尿病模型小鼠的降血糖和抗氧化作用[J].华南农业大学学报,2013,34(4):553-557.  
[5] 张晟,陈祥贵.降血糖植物皂苷研究进展[J].中药材,2007,30(5):617-620.

[6] 谢春英.黄芪甲苷降血糖作用的实验研究[J].中药材,2010,33(8):1319-1320.  
[7] 邬伟魁,张海燕,宋伟,等.糖尿病血管并发症的中药防治[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):292-296.  
[8] 陈泓艳.中药活性成分治疗糖尿病研究进展[J].亚太传统医药,2009,5(4):126-127.  
[9] 曾伟杰,梁淑明,高凯雯,等.HPLC法快速测定人参提取物中7种人参皂苷含量[J].农业工程,2012,2(3):47-50.  
[10] 曹俊岭,李祖伦,付强,等.人参中8种皂苷的HPLC测定[J].中药材,2006,29(10):1038-1039.  
[11] 马慧萍,舒晓玲,董志臣,等.HPLC测定人参固本胶囊中人参皂苷 R<sub>g1</sub>, Re 的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):158-160.  
[12] 朱虹云,徐文峥,刘帅英,等.HPLC-ELSD法测定补血颗粒中黄芪甲苷[J].中草药,2009,40(8):1247-1249.  
[13] 张金红,周晶,吴志丽,等.HPLC-ELSD法测定黄芪及金芪降糖片中黄芪甲苷的含量[J].天津医科大学学报,2010,16(1):26-29.  
[14] 郑义,陈晓兰,陆辉,等.HPLC-ELSD法测定黄芪与复方提取物中黄芪甲苷的含量[J].畜牧与兽医,2014,46(12):74-77.  
[15] 林林,刘广楨. HPLC-ELSD法同时测定心脑血管舒口服液中7种皂苷类成分[J].中成药,2014,36(1):90-94.  
[16] 季宇彬,崔荣田,于蕾.中药皂苷类成分的提取及其抗肿瘤机制的研究进展[J].中草药,2007,38(增刊):37-40.  
[17] 崔宇宏.人参制剂中皂苷类成分的含量测定研究[D].太原:山西医科大学,2007.  
[18] 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,2010:8,283-284.  
[19] 冯小权,黄可儿,魏刚,等.黄芪总皂苷与黄芪甲苷在酸碱中的含量变化分析[J].中药新药与临床药理,2010,21(5):533-537.  
[20] 张爱华,余华,陈新菊,等.高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定爱婴催乳液中黄芪甲苷的含量[J].药物分析杂志,2000,20(6):415-417.

[责任编辑 刘德文]