

# HPLC法同时测定芪白平肺颗粒中4种皂苷类成分的含量<sup>Δ</sup>

付娟<sup>1,2\*</sup>, 张海骏<sup>1,2</sup>, 杨素德<sup>1,2</sup>, 靳瑞婷<sup>1,2</sup>, 李雪峰<sup>1,2</sup>, 李家春<sup>1,2</sup>, 黄文哲<sup>1,2</sup>, 王振中<sup>1,2</sup>, 萧伟<sup>1,2#</sup>(1.江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2.中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4698-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.31

**摘要** 目的:建立同时测定芪白平肺颗粒中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法。色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.5 ml/min,柱温为25℃,漂移管温度为40℃,载气为氮气,氮气压力为3.5 bar,进样量为10 μl。结果:人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷检测进样量的线性范围分别为1.395~7.440、1.313~7.000、1.398~7.456、1.427~7.608 μg( $r=0.999\ 8, 0.999\ 9, 0.999\ 9, 0.999\ 5$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为100.80%~103.10%、100.30%~102.70%、99.03%~99.74%、98.33%~99.91%,RSD分别为0.74%、0.97%、0.30%、0.63%( $n=6$ )。结论:该方法灵敏度高、操作简便、重复性好,可用于测定芪白平肺颗粒中4种皂苷类成分的含量。

**关键词** 高效液相色谱-蒸发光散射检测法;芪白平肺颗粒;人参皂苷;黄芪甲苷;含量测定

## Simultaneous Determination of the Contents of 4 Saponins in Qibai Pingfei Granule by HPLC

FU Juan<sup>1,2</sup>, ZHANG Hai-tao<sup>1,2</sup>, YANG Su-de<sup>1,2</sup>, JIN Rui-ting<sup>1,2</sup>, LI Xue-feng<sup>1,2</sup>, LI Jia-chun<sup>1,2</sup>, HUANG Wen-zhe<sup>1,2</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2</sup>(1.Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Lianyungang 222001, China; 2.State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Lianyungang 222001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of the contents of ginsenosides Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> and astragaloside in Qibai pingfei granule. METHODS: HPLC-ELSD was performed on the column of Kromasil C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.5 ml/min, column temperature was 25℃, drift tube temperature was 40℃, carrier gas was nitrogen gas with gas pressure of 3.5 bar, and the volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 1.395-7.440 μg for ginsenoside Rg<sub>1</sub>( $r=0.999\ 8$ ), 1.313-7.000 μg for ginsenoside Re( $r=0.999\ 9$ ), 1.398-7.456 μg for ginsenoside Rb<sub>1</sub>( $r=0.999\ 9$ ) and 1.427-7.608 μg for astragaloside ( $r=0.999\ 5$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility test were no more than 2%; the recoveries were 100.80%-103.10% (RSD=0.74%,  $n=6$ ), 100.30%-102.70% (RSD=0.97%,  $n=6$ ), 99.03%-99.74% (RSD=0.30%,  $n=6$ ) and 98.33%-99.91% (RSD=0.63%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is sensitive, simple and reproducible, and can be used for the contents determination of 4 saponins in Qibai pingfei granule.

**KEYWORDS** HPLC-ELSD; Qibai pingfei granule; Ginsenoside; Astragaloside; Content determination

芪白平肺颗粒是由人参、黄芪等药材组成的中药复方制剂,其组方是在韩明向教授的临床经验方基础上,由安徽中医药大学相关课题组优化而成。该药对改善慢性阻塞性肺疾病(COPD)症状有较好的疗效,适用于COPD急性发作期及缓解期<sup>[1-2]</sup>。

芪白平肺颗粒具有补气、温阳、化痰等功效,其中人参、黄芪为君药,主要成分均为皂苷类,因此本研究选择皂苷类成分为该药质量控制指标。目前,测定皂苷类成分的常用方法包括薄层色谱(TLC)法<sup>[3-4]</sup>、高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)法<sup>[5-7]</sup>、高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法<sup>[8-11]</sup>等。由于皂苷类成分多为末端吸收,使用紫外低波长检测时基线易漂移,微量杂质的干扰大且分析时间较长,故选HPLC-ELSD法。而

笔者查阅相关文献,尚未见有同时测定人参皂苷和黄芪甲苷含量的报道。为此,笔者在本试验中建立了以HPLC-ELSD法同时测定芪白平肺颗粒中人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷含量的方法,以为芪白平肺颗粒的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Ultimate 3000型HPLC仪,包括SEDEX 80 LT-ELSD型检测器、四元低压泵、WPS-3000 Slip-Loop型自动进样器、Chromleon 7工作站(美国Thermo Fisher公司);BP211D型电子天平(德国Satorius公司);XP6型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-250DB型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);Centrifuge 5415D型高速离心机(德国Eppendorf公司)。

### 1.2 药品与试剂

芪白平肺颗粒(江苏康缘药业股份有限公司,批号:140101、140102、140103、140104,规格:3 g/袋);人参皂苷 Rg<sub>1</sub>对照品(批号:110703-201128)、人参皂苷 Re对照品(批号:

<sup>Δ</sup> 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2013ZX094022 03)

\* 助理研究员,硕士。研究方向:中药质量标准。E-mail: jsfjuan@163.com

# 通信作者:研究员级高级工程师,博士。研究方向:中药新药的研发。电话:0518-81152321

110754-200822)、人参皂苷Rb<sub>1</sub>对照品(批号:110704-201122)、黄芪甲苷对照品(批号:110781-201314)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>92.0%;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~20 min, 20%A; 20~28 min, 20%→28%A; 28~46 min, 28%→37%A);流速:1.5 ml/min;柱温:25 ℃;漂移管温度:40 ℃;载气:氮气;氮气压力:3.5 bar;进样量:10 μl。在此色谱条件下,待测成分与其他成分均达到基线分离,理论板数均>8 000,分离度均>2,详见图1。

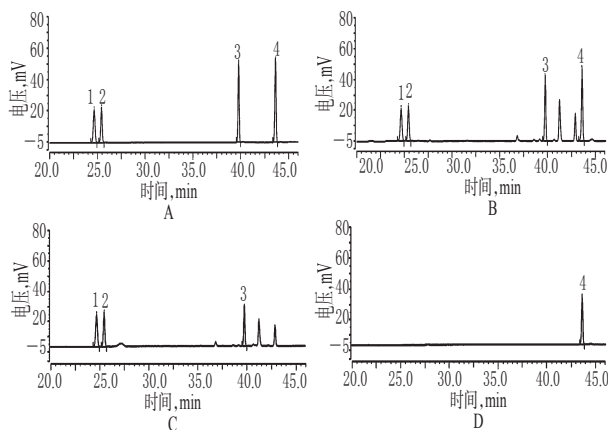


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺黄芪的阴性对照;D.缺人参的阴性对照;  
1.人参皂苷Rg<sub>1</sub>;2.人参皂苷Re;3.人参皂苷Rb<sub>1</sub>;4.黄芪甲苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B.test sample; C.negative control without *Astragalus Radix*; D.negative control without *Panax ginseng*; 1.ginsenoside Rg<sub>1</sub>; 2.ginsenoside Re; 3.ginsenoside Rb<sub>1</sub>; 4.astragaloside

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷对照品各适量,分别精密称定,加甲醇制成每1 ml含人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷各0.400 mg的溶液,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品适量,研细,精密称取5 g,置于具塞锥形瓶中,加入甲醇100 ml,密塞,称定质量,超声处理45 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀;以半径1.5 cm、8 000 r/min离心10 min,精密量取上清液50 ml,置于蒸发皿中蒸干,残渣加水30 ml使溶解,用水饱和正丁醇振摇提取4次,每次30 ml,合并正丁醇层;再用氨试液振摇提取3次,每次30 ml,弃去氨试液,取正丁醇层,置于蒸发皿中蒸干;残渣加甲醇使溶解,移至5 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 阴性对照溶液 按照处方比例,取缺少人参或黄芪的其余药材,按芪白平肺颗粒制备工艺制成阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

### 2.3 线性关系考察

分别取人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每1 ml含人参皂苷Rg<sub>1</sub> 0.930 mg、人参皂苷Re 0.875 mg、人参皂苷Rb<sub>1</sub> 0.932 mg、黄芪甲苷 0.951 mg的混合对照品贮备液。精密吸取上述混合对照品贮备液各

1.5、2、3、4、8 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量的对数值(x)为横坐标,峰面积的对数值(y)为纵坐标进行线性回归,得人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷回归方程分别为 $y=2.531 8x-6.052 4$ ( $r=0.999 8$ )、 $y=2.628 1x-6.128 4$ ( $r=0.999 9$ )、 $y=1.783 1x-3.394 9$ ( $r=0.999 9$ )、 $y=1.643 2x-2.950 6$ ( $r=0.999 5$ )。结果表明,人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷检测进样量线性范围分别为1.395~7.440、1.313~7.000、1.398~7.456、1.427~7.608 μg。

### 2.4 精密度的试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷峰面积的RSD分别为1.83%、1.57%、1.30%、1.87%( $n=6$ ),表明仪器精密度的良好。

### 2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:140101)适量,分别于放置0、1、2、4、6、16 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷峰面积的RSD分别为1.82%、1.91%、1.47%、0.51%( $n=6$ ),表明供试品溶液在16 h内稳定性良好。

### 2.6 重复性试验

取样品(批号:140101)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷的平均含量分别为0.468、0.302、0.387、0.462 mg/g, RSD分别为1.88%、1.95%、1.40%、1.58%( $n=6$ ),表明本方法重复性较好。

### 2.7 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:140101)2.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入一定质量浓度的人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷的混合对照品溶液各1.0 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表1。

### 2.8 样品含量测定

取4批芪白平肺颗粒样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表2。

## 3 讨论

本试验采用HPLC-ELSD法对芪白平肺颗粒中4种皂苷类成分进行定量研究,参考相关文献<sup>[12-13]</sup>,根据相关成分的特点,最终选用乙腈-水为流动相进行梯度洗脱。本试验还考察了不同柱温、流速对各指标成分分离度的影响。结果,待测的4种成分与相邻色谱峰的分度均>2,各色谱峰的对称性均较好,表明对所用柱温、流速无特殊要求,因此本试验采用大多数同类研究的柱温(25 ℃)和流速(1.5 ml/min)条件。

在制备供试品溶液时,以人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub>和黄芪甲苷的提取率为指标,主要考察了不同提取溶剂(甲醇、乙醇、70%乙醇)、提取方式(超声提取和回流提取)、提取溶剂体积(50、100、200 ml)、提取时间(30、45、60 min)以及水饱和正丁醇萃取次数(3、4、5次)、氨试液洗涤次数(2、3、4次)。结果,采用甲醇100 ml超声处理45 min,水饱和正丁醇萃取4次,氨试液洗涤3次的效果最好。

2010年版《中国药典》(一部)中规定,人参主要测定人参

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
人参皂苷R <sub>g</sub>	2.511 7	1.175 0	1.306 0	2.506 0	101.90	101.80	0.74
	2.532 8	1.185 0	1.306 0	2.501 0	100.80		
	2.500 4	1.170 0	1.306 0	2.510 0	101.50		
	2.603 8	1.219 0	1.306 0	2.548 0	101.80		
	2.589 4	1.212 0	1.306 0	2.543 0	101.90		
	2.495 3	1.168 0	1.306 0	2.514 0	103.10		
人参皂苷R <sub>e</sub>	2.511 7	0.759 0	0.862 0	1.627 0	100.70	101.60	0.97
	2.532 8	0.765 0	0.862 0	1.636 0	101.00		
	2.500 4	0.755 0	0.862 0	1.620 0	100.30		
	2.603 8	0.786 0	0.862 0	1.668 0	102.30		
	2.589 4	0.782 0	0.862 0	1.667 0	102.70		
	2.495 3	0.754 0	0.862 0	1.636 0	102.30		
人参皂苷R <sub>b</sub>	2.511 7	0.972 0	1.136 0	2.098 0	99.12	99.24	0.30
	2.532 8	0.980 0	1.136 0	2.113 0	99.74		
	2.500 4	0.968 0	1.136 0	2.096 0	99.30		
	2.603 8	1.008 0	1.136 0	2.141 0	99.74		
	2.589 4	1.002 0	1.136 0	2.127 0	99.03		
	2.495 3	0.966 0	1.136 0	2.094 0	99.30		
黄芪甲苷	2.511 7	1.160 0	1.135 0	2.294 0	99.91	99.25	0.63
	2.532 8	1.170 0	1.135 0	2.299 0	99.47		
	2.500 4	1.155 0	1.135 0	2.289 0	99.91		
	2.603 8	1.203 0	1.135 0	2.326 0	98.94		
	2.589 4	1.196 0	1.135 0	2.319 0	98.94		
	2.495 3	1.153 0	1.135 0	2.269 0	98.33		

表2 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3, mg/g)

批号	人参皂苷R <sub>g</sub>	人参皂苷R <sub>e</sub>	人参皂苷R <sub>b</sub>	黄芪甲苷
140101	0.468	0.302	0.387	0.462
140102	0.561	0.419	0.437	0.918
140103	0.574	0.421	0.420	0.887
140104	0.531	0.385	0.419	0.872

皂苷R<sub>g</sub>、R<sub>e</sub>、R<sub>b</sub>的含量;黄芪主要测定黄芪甲苷的含量。本试验在相关研究的基础上,对分析方法进行改进,大大缩短了分析时间,提高了质量控制水平,为芪白平肺颗粒质量标准的建立提供了依据。

## 国家卫生和计划生育委员会副主任王国强赴内蒙进行督查和调研

本刊讯 根据国务院统一部署要求,2015年10月13日至17日,国家卫生计生委副主任王国强带队赴内蒙古自治区进行卫生计生工作督查和医改调研。王国强同志听取了内蒙古自治区卫生计生委关于落实民生领域重大政策情况和落实深化医改工作任务情况的汇报,实地考察了赤峰市、呼和浩特市4个旗(县、区)的12家基层医疗卫生机构,召开5次座谈会,走访社区群众50余名,了解卫生计生和医改重点任务在基层的落实情况,听取当地政府及卫生计生等部门负责同志、医疗卫生人员和群众的意见建议。

王国强指出,“十二五”期间,内蒙古自治区卫生计生事业得到长足、快速发展和进步,深化医改工作扎实有效推进,人民健康水平得到不断改善和提高。自治区在推进公立医院改革、完善基本医保政策、强化基层能力和机制建设、推动蒙中

综上所述,本方法灵敏度高、操作简便、重复性好,可用于测定芪白平肺颗粒中4种皂苷类成分的含量。

### 参考文献

- [1] 张贺,葛平,王晓玉,等.芪白平肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的保护作用[J].中国药房,2014,25(19):1741.
- [2] 王传博,方莉,王婕琼,等.芪白平肺胶囊对COPD痰瘀阻肺证大鼠肺动脉Rock-1表达的影响[J].中成药,2015,37(5):1096.
- [3] 张春桃,周易,蒋孟良,等.薄层扫描法测定健脾开胃颗粒剂中人参皂苷R<sub>g</sub>的含量[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(1):17.
- [4] 谭军,柴纪严.薄层扫描法测定续骨片中人参皂苷R<sub>b</sub>的含量[J].中成药,2006,28(2):282.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:370.
- [6] 陈世斌,杨文峰,聂曦.HPLC法测定丹鳖胶囊中人参皂苷R<sub>g</sub>的含量[J].药物分析杂志,2009,29(6):1007.
- [7] 王晓燕,朱宝珠.HPLC测定脑脉舒康胶囊中人参皂苷R<sub>g</sub>、人参皂苷R<sub>e</sub>和人参皂苷R<sub>b</sub>的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(13):56.
- [8] 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R<sub>g</sub>和人参皂苷R<sub>b</sub>的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):76.
- [9] 李长新,史红波,吕晓霞,等.HPLC-ELSD法测定田七痛经胶囊中人参皂苷R<sub>g</sub>的含量[J].中医药学报,2009,37(1):44.
- [10] 王斌,孟楣,刘先华,等.高效液相色谱-蒸发光散射法检测芪白平肺胶囊中3种人参皂苷含量[J].安徽中医药大学学报,2014,33(1):78.
- [11] 孟楣,魏良兵,王芳,等.UPLC-ELSD法测定芪白平肺胶囊中黄芪甲苷[J].中成药,2013,35(12):2634.
- [12] 吉丽娜,冯伟红,王智民,等.HPLC-DAD测定人参首乌胶囊中8种人参皂苷类成分[J].中国中药杂志,2013,38(17):2798.
- [13] 刘东辉,黄水清,黄月纯,等.当归补血汤皂苷类成分HPLC指纹图谱研究[J].中药材,2006,29(8):844.

(收稿日期:2015-02-12 修回日期:2015-08-09)

(编辑:刘柳)

医药事业等方面取得了突破,为深入推进医改工作积累了宝贵经验。

王国强强调,现在距年底还有不到3个月时间,一些改革进入紧要关头,完成年度重点工作、实现“十二五”规划完美收官将进入决战决胜阶段,任务艰巨,责任重大。希望自治区以更高的标准、更严的要求、更实的作风,加大力度,加快进度,扎实推进。各级政府要切实加强组织领导,落实政府主体责任。对年底前需全面完成的工作,尤其是“两个全面推开,两个全面实施”,要实行销号式管理,确保责任落实到人,工作计划到位,加强调度和督促检查,动态监测重点工作进展情况,确保按期完成各项工作任务。同时,要紧密结合区情实际,认真总结前期卫生计生和医改经验,进一步积极探索,完善相关政策措施,推动自治区卫生计生和医改工作再上新台阶。