

HPLC法同时测定参芪扶正注射液中6种成分的含量

舒娟^{1*},杨胜斌²(1.铜仁市食品药品检验所,贵州 铜仁 554300;2.铜仁市人民医院,贵州 铜仁 554300)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4275-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.32

摘要 目的:建立同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV和党参炔苷、芒柄花素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈,检测器为蒸发光散射检测器,流动相为乙腈-0.5%甲酸(梯度洗脱),流速为 1.2 ml/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:黄芪皂苷 I、II、III、IV、党参炔苷和芒柄花素检测进样量线性范围分别为 0.62~5.67 μg($r=0.999\ 6$)、0.78~6.31 μg($r=0.999\ 6$)、0.36~3.48 μg($r=0.999\ 7$)、0.81~6.72 μg($r=0.999\ 5$)、0.82~7.03 μg($r=0.999\ 8$)、0.58~6.62 μg($r=0.999\ 7$);定量限分别为 1.21、0.15、0.12、0.03、0.12、0.17 μg/ml;检测限分别为 0.35、0.35、0.04、0.01、0.03、0.04 μg/ml;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;加样回收率分别为 95.1%~101.1% (RSD=2.0%, $n=9$)、95.2%~100.7% (RSD=1.9%, $n=9$)、95.8%~100.2% (RSD=1.4%, $n=9$)、96.2%~100.6% (RSD=1.7%, $n=9$)、96.6%~101.2% (RSD=1.4%, $n=9$)、95.9%~99.5% (RSD=1.2%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、结果准确,可用于同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV、党参炔苷和芒柄花素的含量。

关键词 参芪扶正注射液;高效液相色谱法;黄芪皂苷 I;黄芪皂苷 II;黄芪皂苷 III;黄芪皂苷 IV;党参炔苷;芒柄花素

Simultaneous Determination of Six Components in Shenqi Fuzheng Injection by HPLC

SHU Juan¹, YANG Shengbin² (1.Tongren Institute for Food and Drug Control, Guizhou Tongren 554300; 2.Tongren People's Hospital, Guizhou Tongren 554300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of astragalosides I, II, III, IV, lobetyolin and formononetin in Shenqi fuzheng injection. METHODS: HPLC was performed. The detector was evaporative light scattering detector, column was Ultimate XB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.5% formic acid (gradient elution) at a flow rate of 1.2 ml/min, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.62-5.67 μg for astragalosides I ($r=0.999\ 6$), 0.78-6.31 μg for astragalosides II ($r=0.999\ 6$), 0.36-3.48 μg for astragalosides III ($r=0.999\ 7$), 0.81-6.72 μg for astragalosides IV ($r=0.999\ 5$), 0.82-7.03 μg for lobetyolin ($r=0.999\ 8$) and 0.58-6.62 μg ($r=0.999\ 7$) formononetin; limit of quantitation was 1.21, 0.15, 0.12, 0.03, 0.12, 0.17 μg/ml; limit of detection was 0.35, 0.35, 0.04, 0.01, 0.03, 0.04 μg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 95.1%-101.1% (RSD=2.0%, $n=9$), 95.2%-100.7% (RSD=1.9%, $n=9$), 95.8%-100.2% (RSD=1.4%, $n=9$), 96.2%-100.6% (RSD=1.7%, $n=9$), 96.6%-101.2% (RSD=1.4%, $n=9$) and 95.9%-99.5% (RSD=1.2%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the simultaneous determination of astragalosides I, II, III, IV, lobetyolin and formononetin in Shenqi fuzheng injection.

KEYWORDS Shenqi fuzheng injection; HPLC; Astragaloside I; Astragaloside II; Astragaloside III; Astragaloside IV; Lobetyolin; Formononetin

参芪扶正注射液主要由党参和黄芪两味中药材组成,具有益气扶正的功效,主要用于提高气虚患者的免疫力,改善其气虚症状和生存质量^[1-3]。方中黄芪主要成分包括皂苷、氨基酸类、多糖以及黄酮等成分,其中黄芪皂苷 I、II、III、IV和芒柄花素是该药材的主要活性成分,具有较好的免疫调节作用,在抗氧化、抗肿瘤和抗疲劳等方面亦具有较好的药理作用^[4-5]。党参炔苷则是党参的主要活性成分,其在提高免疫方面均具有较好的疗效^[6-7]。目前,尚未有对黄芪皂苷 I、II、III、IV和党参炔苷、芒柄花素这 6 种主要活性成分进行同时测定的报道^[7-10]。因此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)、蒸发光散射检测器(ELSD)建立了同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV和党参炔苷、芒柄花素含量的方法,以期为该制剂的质量控制提供参考。

* 主管中药师。研究方向:中药及中成药的检验方法及质量控制。E-mail:563965969@qq.com

1 材料

1.1 仪器

1220 型 HPLC 仪,自动进样器、柱温箱、四元泵、LE-780 型 ELSD(美国 Agilent 公司);EO243S 型万分之一电子天平(德国 Eppendorf 公司);SQ-4200 型超声波清洗器(上海精密仪器仪表有限公司,功率:250 W,频率:50 kHz)。

1.2 药品与试剂

参芪扶正注射液(丽珠医药集团股份有限公司,批号:2014050179、2014060132、2014070121、2014080131、2014090133,规格:250 ml/瓶);黄芪皂苷 I 对照品(批号:98087110)、黄芪皂苷 II 对照品(批号:98086745)、黄芪皂苷 III 对照品(批号:98082873)和黄芪皂苷 IV 对照品(批号:98086721)均购自美国 Sigma 公司,纯度均≥98%;党参炔苷对照品(批号:111712-201401)、芒柄花素(批号:111712-201412)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;乙腈为色谱纯,其余试

剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);检测器:ELSD;流动相:乙腈-0.5%甲酸,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.2 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program		
时间,min	A,%	B,%
0~13	21→33	79→67
13~21	33→42	67→58
21~36	42→46	58→54
36~43	46→21	54→79

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素对照品适量,精密称定,置于同一 25 ml 量瓶中,加甲醇制成 1 ml 含黄芪皂苷 I 1.12 mg、黄芪皂苷 II 1.24 mg、黄芪皂苷 III 0.78 mg、黄芪皂苷 IV 1.82 mg、党参炔苷 2.18 mg、芒柄花素 1.23 mg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品 20 ml,减压蒸馏后得到浸膏并制备冻干粉末,备用。取上述冻干粉末 0.1 g,精密称定,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇 30 ml,超声处理 30 min,放冷至室温,加甲醇定容,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和配方比例分别制备缺黄芩和缺党参的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法分别制备阴性对照溶液(A 和 B),即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液(A 和 B)各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以黄芪皂苷 II 峰计为 2 000,保留时间为 25.5 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

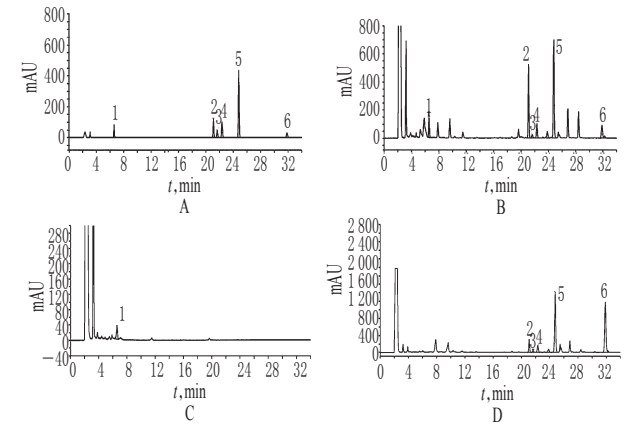


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照A;D.阴性对照B;1.党参炔苷;2.黄芪皂苷IV;3.黄芪皂苷III;4.芒柄花素;5.黄芪皂苷II;6.黄芪皂苷I

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference substance; B. test sample; C. negative control A; D. negative control B; 1.lobetyolin; 2.astragaloside IV; 3.astragaloside III; 4. formononetin; 5.astragaloside II; 6.astragaloside I

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,分别置于 5 ml 量瓶中,加甲醇定容,超声处理 5

min,即得系列线性溶液;取上述溶液适量,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(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表 2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges			
待测成分	回归方程	r	线性范围,μg
黄芪皂苷 I	y=1.192 1x+5.424 1	0.999 6	0.62~5.67
黄芪皂苷 II	y=1.326 7x+6.168 1	0.999 6	0.78~6.31
黄芪皂苷 III	y=1.269 1x+5.672 1	0.999 7	0.36~3.48
黄芪皂苷 IV	y=1.338 9x+6.119 2	0.999 5	0.81~6.72
党参炔苷	y=1.489 0x+4.821 0	0.999 8	0.82~7.03
芒柄花素	y=1.339 1x+6.602 1	0.999 7	0.58~6.62

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得定量限(LOQ);当信噪比为 3:1 时,得检测限(LOD),结果见表 3。

表3 定量限与检测限测定结果

Tab 3 Determination results of quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ, μg/ml	LOD, μg/ml
黄芪皂苷 I	1.21	0.35
黄芪皂苷 II	0.15	0.35
黄芪皂苷 III	0.12	0.04
黄芪皂苷 IV	0.03	0.01
党参炔苷	0.12	0.03
芒柄花素	0.17	0.04

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.0%、1.3%、0.7%、0.8%、1.2%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0、1、2、4、8、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.2%、1.3%、0.9%、1.1%、1.6%(n=6),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:2014050179)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,记录峰面积并计算各成分含量。结果,黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素的平均含量分别为 0.082 0、0.007 9、0.017 1、0.049 0、0.003 9、0.052 8 mg/g, RSD 分别为 1.2%、1.1%、1.9%、1.7%、1.8%、1.8%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:2014050179)适量,按“2.2.2”项下方法制备冻干粉末,称取 9 份,每份约 2 g,精密称定,置于 10 ml 量瓶中,分别加入低、中、高质量的黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 4。

2.10 样品含量测定

取“1.2”项下 5 批样品各适量,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,记录峰面积并计算黄芪皂苷 I、II、III、IV 和党参炔苷、芒柄花素的含量,结果见表5。

表4 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 4 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量,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,%
黄芪皂苷 I	2.091 20	0.035 97	0.560 00	0.583 09	97.7	97.7	2.0
	2.080 10	0.035 78	0.560 00	0.574 50	96.2		
	2.098 70	0.036 10	0.560 00	0.586 02	98.2		
	2.103 50	0.036 18	1.120 00	1.120 34	96.8		
	2.089 70	0.035 94	1.120 00	1.110 02	95.9		
	2.100 60	0.036 13	1.120 00	1.168 45	101.1		
	2.121 80	0.036 49	1.680 00	1.726 57	100.6		
	2.109 80	0.036 29	1.680 00	1.675 97	97.6		
	2.062 50	0.035 48	1.680 00	1.633 16	95.1		
	2.091 20	0.090 34	0.620 00	0.714 68	100.7	98.1	1.9
黄芪皂苷 II	2.080 10	0.089 86	0.620 00	0.710 48	100.1		
	2.098 70	0.090 87	0.620 00	0.699 50	98.2		
	2.103 50	0.090 66	1.240 00	1.317 23	98.9		
	2.089 70	0.090 28	1.240 00	1.279 44	95.9		
	2.100 60	0.090 75	1.240 00	1.289 83	96.7		
	2.121 80	0.091 66	1.860 00	1.910 74	97.8		
	2.109 80	0.091 14	1.860 00	1.861 86	95.2		
	2.062 50	0.089 10	1.860 00	1.936 08	99.3		
	2.091 20	0.044 33	0.390 00	0.427 31	98.2	98.3	1.4
	2.080 10	0.044 10	0.390 00	0.430 59	99.1		
黄芪皂苷 III	2.098 70	0.044 49	0.390 00	0.434 10	99.9		
	2.103 50	0.044 59	0.780 00	0.812 89	98.5		
	2.089 70	0.044 30	0.780 00	0.805 58	97.6		
	2.100 60	0.044 53	0.780 00	0.813 61	98.6		
	2.121 80	0.044 98	1.170 00	1.165 84	95.8		
	2.109 80	0.044 73	1.170 00	1.176 12	96.7		
	2.062 50	0.043 73	1.170 00	1.216 07	100.2		
	2.091 20	0.117 32	0.910 00	0.997 29	96.7	98.2	1.7
	2.080 10	0.116 69	0.910 00	1.032 15	100.6		
	2.098 70	0.117 74	0.910 00	1.004 99	97.5		
黄芪皂苷 IV	2.103 50	0.118 01	1.820 00	1.868 85	96.2		
	2.089 70	0.117 23	1.820 00	1.899 01	97.9		
	2.100 60	0.117 84	1.820 00	1.912 36	98.6		
	2.12180	0.119 03	2.730 00	2.827 19	99.2		
	2.109 80	0.118 36	2.730 00	2.752 81	96.5		
	2.062 50	0.115 71	2.730 00	2.853 90	100.3		
	2.091 20	0.234 42	1.090 00	1.337 50	101.2	98.3	1.4
	2.080 10	0.233 18	1.090 00	1.315 55	99.3		
	2.098 70	0.235 26	1.090 00	1.310 00	98.6		
	2.103 50	0.235 80	2.180 00	2.376 56	98.2		
党参炔苷	2.089 70	0.234 26	2.180 00	2.346 68	96.9		
	2.100 60	0.235 48	2.180 00	2.360 98	97.5		
	2.121 80	0.237 85	3.270 00	3.396 67	96.6		
	2.109 80	0.236 51	3.270 00	3.434 57	97.8		
	2.062 50	0.231 21	3.270 00	3.455 43	98.6		
	2.091 20	0.020 08	0.615 00	0.617 25	97.1	97.7	1.2
	2.080 10	0.019 97	0.615 00	0.621 44	97.8		
	2.098 70	0.020 15	0.615 00	0.632 01	99.5		
	2.103 50	0.020 19	1.230 00	1.228 05	98.2		
	2.089 70	0.020 06	1.230 00	1.207 14	96.5		
芒柄花素	2.100 60	0.020 17	1.230 00	1.234 18	98.7		
	2.121 80	0.020 37	1.845 00	1.789 73	95.9		
	2.109 80	0.020 25	1.845 00	1.839 42	98.6		
	2.062 50	0.019 80	1.845 00	1.809 45	97.0		

表5 样品含量测定结果(n=3,mg/g)
Tab 5 Results of contents determination of samples (n=3, mg/g)

样品批号	黄芪皂苷 I	黄芪皂苷 II	黄芪皂苷 III	黄芪皂苷 IV	党参炔苷	芒柄花素
2014050179	0.017 2	0.043 2	0.021 2	0.056 1	0.112 1	0.009 6
2014060132	0.017 0	0.043 9	0.021 0	0.055 6	0.122 3	0.009 2
2014070121	0.016 7	0.042 8	0.020 9	0.056 7	0.121 8	0.009 1
2014080131	0.016 9	0.042 2	0.022 1	0.056 9	0.124 2	0.009 4
2014090133	0.017 0	0.044 1	0.022 0	0.056 0	0.112 3	0.009 1

3 讨论

笔者分别考察了甲醇-水、乙腈-0.2% 甲酸、乙腈-水、乙腈-0.5% 甲酸作为本试验的流动相对待测成分分离度的影响。结果,采用甲醇-水、乙腈-0.2% 甲酸、乙腈-水作为流动相时,各成分的分离度不好、均有拖尾现象,而采用乙腈-0.5% 甲酸作为流动相时各成分分离效果均较好,因此选择乙腈-0.5% 甲酸为本试验的流动相。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,可用于同时测定参芪扶正注射液中黄芪皂苷 I、II、III、IV、党参炔苷和芒柄花素的含量。

参考文献

[1] Cai YM, Zhang Y, Zhang PB, *et al.* Neuroprotective effect of Shenqi Fuzheng injection pretreatment in aged rats with cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(1): 94.

[2] Li J, Wang JC, Ma B, *et al.* Shenqi Fuzheng injection for advanced gastric cancer: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(1): 71.

[3] 古洪艳,张声源,黄文华,等.参芪扶正注射液的化学成分研究: II [J]. *中成药*, 2013, 35(7): 1 494.

[4] 冯佩佩,李忠祥,原忠.党参属药用植物化学成分和药理研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2012, 29(4): 307.

[5] 周超,何轶,林瑞超,等.黄芪 4 种皂苷提取物的制备及其在黄芪总皂苷含量测定中的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(22): 56.

[6] 吴忠民,贾忠,李喜香,等.黄芪党参颗粒中黄芪甲苷含量的 HPLC 测定方法[J]. *西部中医药*, 2012, 25(10): 23.

[7] 梁瑾,刘小花,任远,等.HPLC-DAD-ELSD 法同时测定黄芪中 5 个成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(2): 210.

[8] Luisa P, Alessandra B, Elena L. Antimicrobial and anti-fungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus errucosus* [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73: 336.

[9] Krasteva IN, Toshkova RA, Nikolov SD. Protective effect of *Astragalus corniculatus* saponins against myeloid graffi tumour in hamsters[J]. *Phytother Res*, 2004, 18(3): 255.

[10] 梁丽娟,赵奎君,屠鹏飞,等.HPLC 法同时测定黄芪中 4 种黄酮类成分的含量[J]. *中国药房*, 2010, 21(15): 1 385.

(收稿日期:2016-05-18 修回日期:2016-08-07)
(编辑:刘 柳)