

HPLC-DAD-ELSD 串联法同时测定肾康灵颗粒中黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷的含量

翁淑琴, 严国鸿, 韩莹, 潘艳琳, 肖钦*(福建中医药大学附属人民医院药学部, 福州 350004)

摘要: 目的 建立肾康灵颗粒中黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷的含量测定方法, 为肾康灵颗粒的质量控制提供参考。方法 采用 HPLC-DAD-ELSD 串联法同时测定制剂中黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷 3 种指标性成分的含量, 色谱柱为 Agilent EC-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 210 nm, 柱温为 30 °C; 蒸发光散射检测器(ELSD)漂移管温度为 80 °C; 载气流量 1.5 L·min⁻¹。结果 黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷分离度良好; 分别在 22.82~456.3 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$)、17.83~356.6 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$)、11.36~227.2 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$)内线性关系良好; 平均回收率分别为 100.39%(RSD=1.0%)、100.79%(RSD=1.2%)、100.07%(RSD=0.43%)($n=9$)。结论 该法可同时定量分析 3 种指标性成分的含量, 操作快速、准确、精密度高且重复性好, 可用于肾康灵颗粒内在质量的有效评价。

关键词: 肾康灵颗粒; HPLC-DAD-ELSD 串联法; 黄芪甲苷; 梓醇; 毛蕊花糖苷

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)06-0698-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.06.012

引用本文: 翁淑琴, 严国鸿, 韩莹, 等. HPLC-DAD-ELSD 串联法同时测定肾康灵颗粒中黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(6): 698-702.

Determination of Astragaloside IV, Catalpol and Acteoside in Shenkangling Granules by HPLC-DAD-ELSD

WENG Shuqin, YAN Guohong, HAN Ying, PAN Yanlin, XIAO Qin*(Department of Pharmacy, People's Hospital Affiliated to Fujian University of TCM, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of astragaloside IV, catalpol and acteoside in Shenkangling granules, and to provide an experimental reference for the quality control of Shenkangling granules. **METHODS** The contents of astragaloside IV, catalpol and acteoside in the granules were detected by HPLC-DAD-ELSD with a Agilent EC-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), a mobile phase was acetonitrile-water in a gradient elution manner, velocity of flow was 1.0 mL·min⁻¹, the temperature of column was 30 °C, and detection wavelength was set at 210 nm. The temperature of drift tube was set at 80 °C, and the gas flow was set at 1.5 L·min⁻¹. **RESULTS** Astragaloside IV, catalpol and acteoside displayed good linear relationships within the range of 22.82–456.3 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$), 17.83–356.6 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$), 11.36–227.2 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$). And the average recoveries were 100.39%(RSD=1.0%), 100.79%(RSD=1.2%), 100.07% (RSD=0.43%) ($n=9$), respectively. **CONCLUSION** The contents of 3 components were simultaneous detected. The method is simple, rapid, accurate and reproducible. It can be used as an effective method to evaluate the internal quality of Shenkangling granules.

KEYWORDS: Shenkangling granules; HPLC-DAD-ELSD; astragaloside IV; catalpol; acteoside

肾康灵颗粒为福建省名中医的经验方, 是由黄芪、生地黄、山茱萸、山药、甘草等 14 味中药材经过提取、浓缩等一系列工艺制备而成。该方有补肾滋阴、固肾精、清热利水之功效。制剂中的黄芪和生地黄共为君药, 具有益肾活血、利水消肿的作用。现代研究表明, 黄芪含有多糖、皂苷、黄酮等多种化学成分, 不同化学成分产生不同的药理作用, 其中皂苷有明显改善心肌活力、扩张动脉血管等作用^[1-3]。黄芪甲苷是一种羊毛脂醇型的四环三萜皂苷, 是黄芪的主要活性成分

之一, 具有与强心苷类药物相似的正性肌力作用, 也是黄芪药材的定性定量指标性成分之一^[4-8]。地黄中主要含有环烯醚萜类、苯乙醇苷类等化合物, 生理活性广泛, 对心脑血管系统、脏腑系统等有显著作用, 对骨质疏松、糖尿病及其并发症有良好的治疗效果^[4,9-10]。梓醇是环烯醚萜类较为突出的化学成分, 也是治疗骨质疏松的活性成分之一。毛蕊花糖苷是苯乙醇苷类的代表性成分, 具有明显抑制破骨细胞的分化和形成、减少骨质流失的作用^[11-12]。

基金项目: 福建省卫生计生科研人才培养项目(2017-CX-43)

作者简介: 翁淑琴, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0591)83947134
药师 Tel: (0591)83947159 E-mail: 13799327585@163.com

E-mail: shuqinweng11@sina.com *通信作者: 肖钦, 女, 副主任

查阅文献可知^[13-14],采用 HPLC、UPLC、TLC 等单一检测手段很难保证中药制剂有效性与内在质量的一致性。因此,在以临床用药的有效性和安全性的前提下,本研究采用 HPLC-DAD-ELSD 串联法建立同时检测方中梓醇、黄芪甲苷、毛蕊花糖苷 3 种指标性成分含量的方法,为该制剂的质量控制与评价提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent),二极管阵列检测器(DAD),四元梯度泵,Empower Pro 色谱工作站;Alltech 3300 蒸发光散射检测器(ELSD, 格雷斯中国有限公司);KQ5200 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XS205DU 型电子分析天平(瑞士-梅特勒有限公司);Milli Pore Advantage A10 自动纯水机(美国 Millipore)。

1.2 材料

黄芪甲苷对照品(批号:110781-200613;纯度 $\geq 99.9\%$)、梓醇对照品(批号:110808-201210;纯度 $\geq 98.5\%$)、毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-201512;纯度 $\geq 99.2\%$)均购自中国食品药品检定研究院;10 批肾康灵颗粒(批号分别为 20180301, 20180302, 20180303, 20180304, 20180305, 20180306, 20180307, 20180308, 20180309, 20180310)均为福建中医药大学附属人民医院制剂室提供;蒸馏水(屈臣氏);乙腈为色谱纯(Merck 公司);其他试剂为分析纯(天津化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent EC-C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-水溶液(B),梯度洗脱(0~12 min, 10%A; 12~30 min, 10% $\rightarrow$ 20%A; 30~50 min, 20% $\rightarrow$ 40%A);DAD(梓醇和毛蕊花糖苷)检测波长为 210 nm,柱温为 30 $^{\circ}$ C,体积流量为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;进样量为 5 μ L;ELSD(黄芪甲苷)漂移管温度为 80 $^{\circ}$ C,载气流量为 1.5 L $\cdot$ min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品黄芪甲苷 45.68 mg、梓醇 36.20 mg 和毛蕊花糖苷 22.90 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得对照品溶液。分别精密吸取各对照品溶液 2.5 mL,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,混匀,制成黄

芪甲苷、梓醇、毛蕊花糖苷浓度分别为 456.3, 356.6, 227.2 μ g $\cdot$ mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取肾康灵颗粒样品,研细,称取 0.5 g,精密称定质量,置 100 mL 锥形瓶中,加甲醇溶液 25 mL,密塞称质量,超声提取 30 min 后,取出,放冷,称质量,并滴加甲醇溶液补足失去的质量,摇匀,过 0.45 μ m 有机滤膜,即得。

2.4 阴性对照样品溶液的制备

按本处方各药材用量比例及制剂工艺流程分别制备缺黄芪药材和生地黄药材的阴性对照样品,再按已定的样品制备方法分别制备缺黄芪药材和生地黄药材的阴性对照样品溶液。

2.5 系统适用性和专属性试验

精密吸取制备好的对照品溶液、供试品溶液和阴性对照样品溶液各 5 μ L,并按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。结果显示,黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷三者的色谱峰分离度均良好;且该制剂的阴性对照色谱图在与对照品色谱图相应位置上并未出现明显的干扰峰,表明所建立的方法专属性较好。色谱图见图 1。

2.6 线性关系考察

分别精密吸取 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5 mL 的 456.3 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 黄芪甲苷、356.6 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 梓醇和 227.2 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 毛蕊花糖苷混合对照品溶液,置于 5 mL 的量瓶中,滴加甲醇溶液定容,即可得到不同浓度的黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件吸取 5 μ L,分别依次进样,根据峰面积计算含量。以黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷的浓度(X)分别为横坐标,各自的峰面积积分值(Y)分别为纵坐标,分别计算出各标准曲线的回归方程和相关系数。3 种成分的线性关系在各自相应的浓度范围内有良好的相关性,结果见表 1。

2.7 检出限和定量限

取混合对照品溶液适量,采用二倍稀释法逐步稀释成不同浓度,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,并记录色谱图,以 3 倍信噪比(S/N=3)确定检出限和 10 倍信噪比(S/N=10)确定定量限,计算黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷的检出限分别为 0.024, 0.012, 0.012 μ g,定量限分别为 0.066, 0.039, 0.033 μ g。

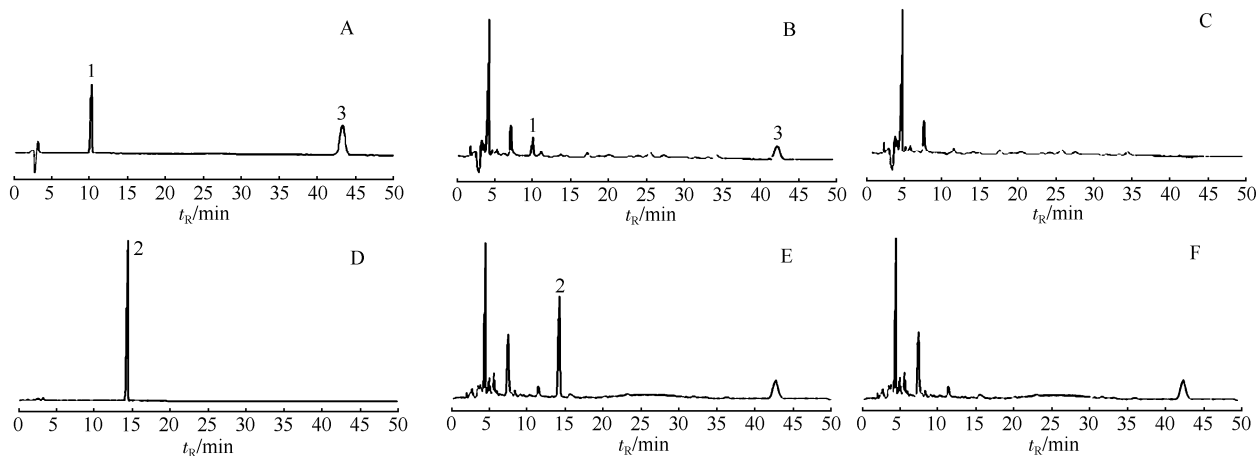


图1 色谱图

A-HPLC-DAD 检测的对照品; B-HPLC-DAD 检测的样品; C-HPLC-DAD 检测的缺地黄药材样品; D-HPLC-ELSD 检测的对照品; E-HPLC-ELSD 检测的样品; F-HPLC-ELSD 检测的缺黄芪药材样品; 1-梓醇; 2-黄芪甲苷; 3-毛蕊花糖苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substances detected by HPLC-DAD; B-samples detected by HPLC-DAD; C-sample without Radix Rehmanniae detected by HPLC-DAD; D-reference substances detected by HPLC-ELSD; E-samples detected by HPLC-ELSD; F-sample without Radix Astragali detected by HPLC-ELSD; 1-catalpol; 2-astragaloside IV; 3-acteoside.

表1 3种指标性成分的线性关系

Tab. 1 Linearity relation ship of 3 compositions

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
黄芪甲苷	$Y=1.74\times 10^5 X-1.10\times 10^3$	0.999 9	22.82~456.3
梓醇	$Y=1.83\times 10^6 X-5.84\times 10^3$	0.999 8	17.83~356.6
毛蕊花糖苷	$Y=3.02\times 10^6 X-6.39\times 10^3$	0.999 9	11.36~227.2

2.8 仪器精密度的试验

取同一批样品(批号: 20180301), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定各指标性成分的含量。结果显示黄芪甲苷、梓醇、毛蕊花糖苷的含量 RSD 分别为 1.81%, 1.27%, 1.12%, 表明本方法仪器精密密度良好。

2.9 稳定性试验

取同一批样品(批号: 20180301), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果显示黄芪甲苷、梓醇、毛蕊花糖苷各成分峰面积的 RSD 为 1.23%, 1.4%, 0.33%, 表明供试品溶液中 3 种成分在 12 h 内有良好的稳定性。

2.10 重复性试验

取 6 份样品(批号: 20180301), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果显示黄芪甲苷、梓醇、毛蕊花糖苷的含有量 RSD 分别为 1.25%, 1.41%, 1.13%, 表明本方法重复性良好。

2.11 加样回收率试验

取同一供试品(批号: 20180301)约 0.25 g, 平行 9 份, 分别置 100 mL 锥形瓶中, 每组分别加入黄芪甲苷、梓醇、毛蕊花糖苷对照品溶液, 加入的量约为样品中各含量的 50%, 100%, 150%, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果黄芪甲苷、梓醇、毛蕊花糖苷平均回收率分别为 100.39%, 100.79%, 100.07%, RSD 为 1.0%, 1.2%, 0.43%, 表明加样回收率良好, 结果见表 2。

2.12 含量测定

取 10 批肾康灵颗粒, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 计算黄芪甲苷、梓醇、毛蕊花糖苷的含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 指标性成分的选择

肾康灵颗粒是经过水液煎煮提取、浓缩等一系列复杂工艺制备而成的中药复方制剂, 该处方中黄芪和生地黄协同作用, 共为处方的君药且用量在方中所占比例较大。笔者结合该制剂的药理实验结果, 选择可能发挥疗效的黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷 3 种活性成分为定量指标, 采用 HPLC-DAD-ELSD 串联法同时测定 3 种成分的含量, 结果显示 3 种成分分离度良好, 故选择同时定量分析黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷 3 种成分,

使该复方制剂临床的有效性与质量保持一致。

表 2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab. 2 Results of recovery test(n=9)

对照品	样品质量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
黄芪甲苷	0.250 2	0.755 6	0.377 8	1.130	99.07	100.39	1.0
	0.251 2	0.758 6	0.379 3	1.137	100.15		
	0.250 5	0.756 5	0.378 3	1.135	100.22		
	0.251 1	0.758 3	0.758 3	1.515	99.85		
	0.250 9	0.757 7	0.757 7	1.511	99.44		
	0.250 5	0.756 5	0.756 5	1.530	102.31		
	0.250 7	0.757 1	1.136	1.899	100.52		
	0.251 0	0.758 0	1.137	1.897	100.16		
梓醇	0.250 7	0.757 1	1.136	1.913	101.78	100.79	1.2
	0.250 2	0.708 1	0.354 1	1.063	100.34		
	0.251 8	0.712 6	0.356 3	1.073	101.22		
	0.250 5	0.708 9	0.354 5	1.064	100.09		
	0.251 1	0.710 6	0.710 6	1.421	99.97		
	0.250 9	0.710 0	0.710 0	1.412	98.89		
	0.250 5	0.708 9	0.708 9	1.428	101.43		
	0.250 7	0.709 5	1.064 3	1.782	100.75		
毛蕊花糖苷	0.251 0	0.710 3	1.065 5	1.786	100.98	100.07	0.43
	0.250 7	0.709 5	1.064 3	1.810	103.4		
	0.250 2	0.337 8	0.168 9	0.505 0	98.99		
	0.251 8	0.339 9	0.170 0	0.510 0	100.05		
	0.250 5	0.338 2	0.169 1	0.507 6	100.17		
	0.251 1	0.339 0	0.339 0	0.678 8	100.25		
	0.250 9	0.338 7	0.338 7	0.677 4	99.99		
	0.250 5	0.338 2	0.338 2	0.676 7	100.09		
毛蕊花糖苷	0.250 7	0.338 4	0.507 6	0.847 6	100.32	100.48	
	0.251 0	0.338 9	0.508 4	0.848 7	100.27		
	0.250 7	0.338 4	0.507 6	0.848 4	100.48		

表 3 10 批样品中 3 种指标性成分含量测定结果(n=3)

Tab. 3 Measurement results of 3 index components in 10 batches of samples(n=3)

批号	黄芪甲苷	梓醇	毛蕊花糖苷
20180301	3.02	2.83	1.35
20180302	2.98	2.56	1.37
20180303	3.11	2.88	1.40
20180304	3.10	2.86	1.43
20180305	2.99	2.85	1.36
20180306	3.09	2.80	1.40
20180307	3.04	2.78	1.41
20180308	3.09	2.77	1.38
20180309	3.13	2.90	1.37
20180310	3.05	2.82	1.39

3.2 波长的选择

相关资料显示,梓醇和毛蕊花糖苷分别在波长 337, 210 nm 处有吸收。笔者通过全波长扫描得知,梓醇在波长 337 nm 处并无明显的吸收,且毛蕊花糖苷在波长 210 nm 处也几乎无任何变化,故实验选择 210 nm 为梓醇和毛蕊花糖苷的检测波长。

3.3 实验条件的选择

研究分别考察了乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水 3 种流动相系统,结果显示,以乙腈-水溶液为本次实验的流动相进行梯度洗脱时,黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷 3 种成分的分离效果良好。分别考察了不同温度(25, 30, 35 ℃)和不同体积流量(0.8, 1.0 mL·min⁻¹)对各液相色谱峰分离效果的影响,结果显示,柱温 30 ℃、体积流量 1.0 mL·min⁻¹时能使基线平稳、分离度和峰形达到较好的效果。考察不同厂家和品牌的色谱柱[Agilent EC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Merk Hibar[®] 250-4,6(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Waters XBridge[™] C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)],结果显示,Agilent EC-C₁₈柱能将 3 种成分(黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷)的色谱峰分开,并达到良好的分离度。分别对 ELSD 漂移管不同温度(90, 85, 80, 75, 70 ℃)、不同载气(N₂)流速(1.0, 1.5, 2.0, 2.5 L·min⁻¹)等影响峰响应值因素进行考察,最终确定漂移管温度 80 ℃、载气流速 1.5 L·min⁻¹为最优化的 ELSD 参数。

3.4 提取方法的确定

采用单因素方法对提取溶剂、提取方式、提取时间等进行考察。分别比较了无水乙醇、80%乙醇、60%乙醇、甲醇、80%甲醇、60%甲醇、正丁醇;加热回流、浸提和超声提取;提取 10, 20, 30, 45, 60 min 对黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷提取效果的影响,结果显示甲醇超声提取 30 min 可使样品中黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷提取完全。

4 小结

本研究建立了 HPLC-DAD-ELSD 串联法同时测定肾康灵颗粒中黄芪甲苷、梓醇和毛蕊花糖苷含量的方法,通过 HPLC-DAD-ELSD 分离参数的考察,选择最理想的分离条件,同时对样品的精密度、稳定性、重复性及回收率进行考察,该方法能较为快速、简便、准确地测定不同活性成分的含量。本研究不仅可作为有效评价肾康灵颗粒

内在质量的方法之一,同时也为其他中药制剂的质量控制与评价起到借鉴作用。

REFERENCES

- [1] 吴娇,王聪. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(9): 755-760.
- [2] 聂娟,谢丽华,马港圆,等. 中药黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(7): 228-231.
- [3] LIU Y, DU J, SHEN Y H. Research progress on chemical constituents and pharmacology of 10 kinds medicinal plants of astragalus [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(18): 222-234.
- [4] ZHANG X Q, LI Y, WU Y, et al. Quality control of Qinguitongfeng tablets [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(2): 169-173.
- [5] 胡睿婷. 中药黄芪的药理作用及临床应用效果观察[J]. 中国医药指南, 2018, 16(23): 198-199.
- [6] 汪娟. 黄芪的药理作用研究进展[J]. 医疗装备, 2018, 31(14): 202-203.
- [7] ZHU L P. Pharmacology research progress of Astragalus membranaceus [J]. Inner Mongolia J Tradit Chin Med(内蒙古中医药), 2018, 37(3): 98-99.
- [8] 张霞. 黄芪的药理分析及应用研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(A3): 20388.
- [9] 付国辉,杜鑫. 地黄化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国医药科学, 2015, 5(15): 39-41.
- [10] LI H W, MENG X L. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Rehmannia glutinosa* [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2015, 38(2): 218-228.
- [11] 宋连昆. 地黄药理作用研究进展[C]//中国药理学补益药药理专业委员会. 第二届中国药理学补益药药理专业委员会学术研讨会论文汇编. 北京: 中国药理学补益药药理专业委员会、中国药理学学会, 2012: 2.
- [12] LIU W X, LU Y W, DU H T, et al. Pharmacological actions of Radix Rehmanniae and its active components: research advances [J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2009, 36(4): 277-280.
- [13] LIAO Q, HUANG X H, WEI R W. ASE-HPLC simultaneous determination of components in four Zhuanggu Shenjin capsules [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 68(9): 1609-1616.
- [14] TAN X S. Determination of quercetin, kaempferol, saikosaponin a and saikosaponin d in Yiganle Granules by HPLC-UV-ELSD [J]. Chin Tradit Patent Med(中成药), 2014, 36(3): 531-535.

收稿日期: 2019-06-03

(本文责编: 蔡珊珊)