

HPLC 法同时测定固本益肠胶囊中 5 种成分

邵建兵，汪燕
(如皋市人民医院, 江苏 如皋 226500)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定固本益肠胶囊(党参、黄芪、延胡索等)中 5 种成分的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 218、531 nm; 柱温 30 ℃。**结果** 芍药内酯苷、芍药苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ分别在 16.7 ~ 200.2、20.0 ~ 240.2、5.3 ~ 64.1、10.0 ~ 120.1、12.7 ~ 152.2 μg/mL 范围内线性关系良好($r > 0.999\ 0$), 平均加样回收率分别为 96.9%、100.3%、97.1%、95.9%、95.4%, RSD 分别为 2.52%、2.85%、3.92%、3.54%、3.29%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于固本益肠胶囊的质量控制。

关键词: 固本益肠胶囊; 芍药内酯苷; 芍药苷; 黄芪甲苷; 黄芪皂苷Ⅱ; 黄芪皂苷Ⅰ; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)11-2446-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.017

Simultaneous determination of five constituents in Guben Yichang Capsules by HPLC

SHAO Jian-bing, WANG Yan
(The People's Hospital of Rugao City, Rugao 226500, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of five constituents in Guben Yichang Capsules (*Codonopsis Radix*, *Astragali Radix*, *Corydalis Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 0.5 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 218, 531 nm. **RESULTS** Albiflorin, paeoniflorin, astragaloside A, astragaloside II, astragaloside I showed good linear relationships within the ranges of 16.7 – 200.2, 20.0 – 240.2, 5.3 – 64.1, 10.0 – 120.1, 12.7 – 152.2 μg/mL ($r > 0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.9%, 100.3%, 97.1%, 95.9%, 95.4% with the RSDs of 2.52%, 2.85%, 3.92%, 3.54%, 3.29%, respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Guben Yichang Capsules.

KEY WORDS: Guben Yichang Capsules; albiflorin; paeoniflorin; astragaloside A; astragaloside II; astragaloside I; HPLC

固本益肠胶囊由党参、黄芪、延胡索、白芍、赤石脂、白术、炮姜、山药、补骨脂、当归、木香、地榆、儿茶、甘草 14 味药材组成, 具有健脾温肾、涩肠止泻之功效, 临床用于脾虚或脾肾阳虚所致慢性泄泻^[1-2], 其质量标准收载于 2015 版《中国药典》, 但仅测定白芍中芍药苷含有量^[3-5], 难以满足质量控制要求。固本益肠胶囊中黄芪为君药, 可补气升提, 配伍臣药白芍补血养血, 用于治疗久泻久痢导致的大便带血^[6-8], 芍药内酯苷、芍药苷是芍药有效成分^[9], 而黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ和黄芪皂苷Ⅰ是黄芪有效成分^[10-11]。其中, 黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ属于低活性衍生物, 在一定

收稿日期: 2018-05-04

作者简介: 邵建兵 (1971—), 男, 副主任中药师, 研究方向为中药药剂、药理、药物临床应用等。Tel: 13862731661, E-mail: doctorhao71@163.com

温度和酸度下可转化为高活性的黄芪甲苷^[12]，但尚无准确测定三者含有量的报道。因此，本实验将通过 HPLC 法同时测定固本益肠胶囊中芍药内酯苷、芍药苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ的含有量，为该制剂在药理、临床等方面的深入研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司，配置四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、UV 检测器、Chem Station 工作站控制系统）；ES-J120 型电子分析天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；KQ5200DB 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；CS66-2 型电热恒温干燥箱（长沙机械加工厂）；3K15 离心机（美国 Sigma 公司）。

1.2 试药 芍药内酯苷（批号 wkq16060804，含有量≥98%）、黄芪皂苷Ⅰ（批号 wkq-00285，含有量≥98%）均购自四川省维克奇生物科技有限公司；芍药苷（批号 YY20100505，含有量≥98%）对照品购自上海源叶生物科技有限公司；黄芪皂苷Ⅱ（批号 H-037-130428，含有量≥98%）、黄芪甲苷（批号 H-013-150626，含有量≥98%）对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。固本益肠胶囊（0.50 g/粒，国药准字 Z20090565，沈阳绿洲制药有限责任公司，批号 20170302、20170403、20170503、20171001）。乙腈为色谱纯；甲酸为分析纯；水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）- 0.1% 甲酸（B），梯度洗脱（程序见表 1）；体积流量 0.5 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs			
时间/min	检测波长/nm	A 乙腈/%	B 0.1% 甲酸/%
0 ~ 12	218	35	65
12 ~ 40	531	70	30

2.2 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的芍药内酯苷、芍药苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含上述成分 4 448.9、5 338.7、1 425.6、2 669.3、3 381.2 μg 的溶液，作为贮备液，各精密量取 3 mL，置于 20 mL 量瓶中，甲醇制成每 1 mL 分别含上述成分 666.3、800.8、213.5、400.4、

507.2 μg 的溶液，即得。

2.3 供试品溶液制备 取胶囊 20 粒，研细，混匀，精密称取约 1 g，置于具塞锥形瓶中，加 25 mL 甲醇，密塞，称定质量，超声 30 min，放冷至室温，甲醇补足减失的质量，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4 专属性试验 取对照品、供试品溶液各 20 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，5 种成分与其他组分均可达到分离要求，理论塔板数以芍药苷计，不低于 5 000。

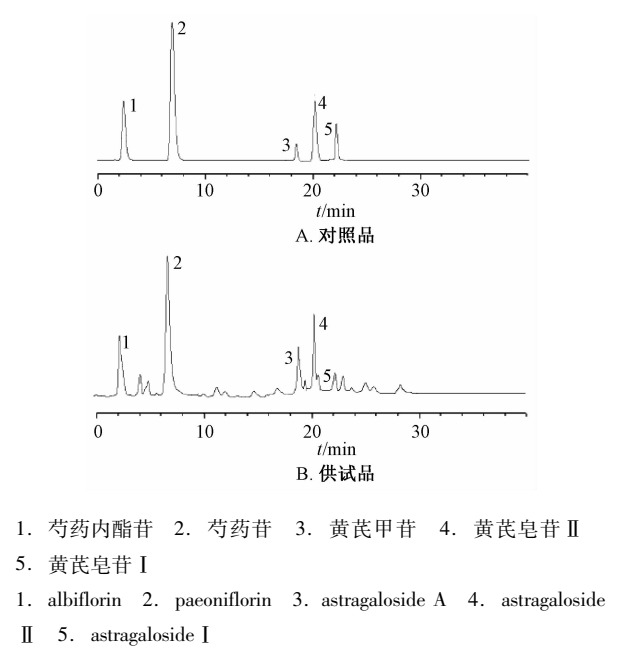


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.5 线性关系考察 精密量取各对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL，分别置于 20 mL 量瓶中，流动相定容至刻度，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)	
芍药内酯苷	Y = 15 638.4X - 3 567.2	0.997 0	16.7 ~ 200.2	
芍药苷	Y = 20 136.9X - 2 365.7	0.999 0	20.0 ~ 240.2	
黄芪甲苷	Y = 356.4X + 98.7	0.999 0	5.3 ~ 64.1	
黄芪皂苷Ⅱ	Y = 45.9X - 15.4	0.999 0	10.0 ~ 120.1	
黄芪皂苷Ⅰ	Y = 372.4X - 68.4	0.998 0	12.7 ~ 152.2	

2.6 精密度试验 对照品溶液在“2.1”项色谱条件下进样测定 3 d，每天 5 次，测得芍药内酯苷、

芍药苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ峰面积 RSD 分别为 2.14%、2.24%、2.88%、2.71%、2.62%，表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一批号（20170302）胶囊，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下每隔 1 h 进样测定 1 次，连续 6 次，测得芍药内酯苷、芍药苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ峰面积 RSD 分别为 3.06%、3.15%、3.49%、3.21%、2.91%，表明供试品溶液在 6 h 内稳定性良好。

表 3 各成分加样回收率试验结果（n=6）

Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芍药内酯苷	85.09	83.81	171.38	101.47	98.79	2.51
	85.09	83.81	168.81	99.95		
	85.09	83.81	171.38	101.47		
	85.09	83.81	163.63	96.88		
	85.09	83.81	162.02	95.93		
	85.09	83.81	163.88	97.03		
芍药苷	102.09	105.74	208.34	100.25	99.24	2.84
	102.09	105.74	202.47	97.42		
	102.09	105.74	201.37	96.89		
	102.09	105.74	212.35	102.18		
	102.09	105.74	213.27	102.62		
	102.09	105.74	199.69	96.09		
黄芪甲苷	27.20	27.63	57.63	105.12	103.93	3.91
	27.20	27.63	54.27	98.99		
	27.20	27.63	59.25	108.06		
	27.20	27.63	57.24	104.40		
	27.20	27.63	59.16	107.91		
	27.20	27.63	54.32	99.07		
黄芪皂苷Ⅱ	47.69	46.92	95.63	101.07	104.31	3.54
	47.69	46.92	100.22	105.93		
	47.69	46.92	93.67	99.00		
	47.69	46.92	100.06	105.76		
	47.69	46.92	103.36	109.24		
	47.69	46.92	99.20	104.84		
黄芪皂苷Ⅰ	64.69	59.67	123.34	99.19	99.84	3.27
	64.69	59.67	124.27	99.93		
	64.69	59.67	120.80	97.14		
	64.69	59.67	121.13	97.40		
	64.69	59.67	131.95	106.10		
	64.69	59.67	123.42	99.25		

2.10 样品含有量测定 按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 4。

3 讨论与结论

本实验比较了加热回流提取法与超声提取法，发现前者对 5 种成分的提取不完全，而后者提取率较高，操作简便，故选择超声提取作为供试品溶液制备方法，与 Wang 等^[13]报道一致。然后，比较 2448

2.8 重复性试验 取同一批号（20170302）胶囊 5 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得芍药内酯苷、芍药苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ峰面积 RSD 分别为 3.15%、2.96%、3.88%、3.43%、3.19%，表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 取含有量已知的胶囊，加入适量对照品溶液，按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 3。

表 4 各成分含有量测定结果（mg/g）

Tab. 4 Results of content determination of various constituents (mg/g)

批号	芍药内酯苷	芍药苷	黄芪甲苷	黄芪皂苷Ⅱ	黄芪皂苷Ⅰ
20170302	2.53	3.12	0.85	1.56	1.89
20170403	2.72	3.08	0.72	1.49	1.92
20170503	2.61	3.07	0.79	1.69	1.86
20171001	2.59	3.17	0.77	1.65	1.84

了甲醇-水、乙腈-水流动相，发现后者灵敏度明显

高于前者，色谱峰峰形呈对称状，而且洗脱能力更强。再进一步分析加入甲酸或乙酸的体积分数，发现随着体积分数增加，拖尾现象明显改善，但灵敏度有所降低^[14]。其中，甲酸对成分离子强度的影响小于乙酸，故在乙腈-水流动相中加入甲酸^[15-16]，体积分数为 0.1%。同时还发现，4 批固本益肠胶囊中 5 种成分含有量的差异均较小，表明药材质量、制备工艺稳定性良好。

综上所述，本实验建立 HPLC 法同时测定固本益肠胶囊中芍药内酯苷、芍药苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪皂苷Ⅰ的含有量，该方法操作简便，回收率高，重复性好，可为该制剂质量控制提供参考。

参考文献：

[1] 林仙花. 固本益肠片治疗功能性腹泻的临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(4): 108-109.

[2] 廖 静, 熊 炬. 参倍固肠胶囊治疗脾肾阳虚型肠易激综合征临床观察[J]. 成都中医药大学学报, 2014, 37(1): 75-77.

[3] 田金苗. HPLC 法测定固本益肠胶囊中芍药苷、补骨脂素、异补骨脂素的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(3): 354-356.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1062-1063.

[5] 李 虹, 胡 静. HPLC 法测定固本益肠胶囊中芍药苷的含量[J]. 中国药事, 2007, 21(9): 738-739.

[6] 马晓鹏, 郝婷婷, 刘世平, 等. 固本益肠片联合布拉氏酵母菌散和维生素 C 治疗小儿抗生素相关性腹泻的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(9): 1412-1416.

[7] 张 玮, 朱艳娜, 王洪刚. 固本益肠片联合双歧杆菌四联活菌片对腹泻病人的疗效研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1414-1415.

[8] 王宏志, 何仁胜, 刘 俊. 固本益肠片联合酪酸梭菌治疗

腹泻型肠易激综合征临床疗效观察[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(11): 897-899, 924.

[9] Hu Z T, Qin F, Gao S L, *et al.* Paeoniflorin exerts protective effect on radiation-induced hepatic fibrosis in rats via TGF- β 1/Smads signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(3): 1012-1021.

[10] Liu X H, Zhao J B, Guo L, *et al.* Simultaneous determination of calycosin-7-O- β -D-glucoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, and astragaloside II in rat plasma after oral administration of *Radix Astragali* extraction for their pharmacokinetic studies by ultra-pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 677-686.

[11] Zhang D Q, Li J S, Zhang Y M, *et al.* Astragaloside IV inhibits Angiotensin II-stimulated proliferation of rat vascular smooth muscle cells via the regulation of CDK2 activity[J]. *Life Sci*, 2018, 200: 105-109.

[12] 郑 娜, 师亚玲, 吉艳霞, 等. 温度和酸度对黄芪皂苷Ⅳ、Ⅲ、Ⅰ稳定性和转化的影响[J]. 中南药学, 2014, 12(11): 1062-1065.

[13] Wang Z B, Li N, Wang M, *et al.* Simultaneous determination of nucleosides and their bases in *Cordyceps sinensis* and its substitutes by matrix solid-phase dispersion extraction and HPLC[J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(14): 2348-2357.

[14] Liu Y H, Huang Z H, Dong L, *et al.* Simultaneous content determination of 14 components in *Rhei Radix et Rhizoma* by high performance liquid chromatography method[J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(23): 4514-4519.

[15] Ji B, Zhao X, Yu P P, *et al.* Simultaneous determination and pharmacokinetics of fourteen bioactive compounds in rat plasma by LC-ESI-MS/MS following intravenous injection of Gegen-Sanqi compatibility solution[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1068-1069: 164-172.

[16] Wojdyło A, Samoticha J, Nowicka P, *et al.* Characterisation of (poly) phenolic constituents of two interspecific red hybrids of Rondo and Regent (*Vitis vinifera*) by LC-PDA-ESI-MS QTof[J]. *Food Chem*, 2018, 239: 94-101.