

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.016

黄芪三七合剂质量标准研究*

张仕瑾¹, 兰 杨¹, 王娅俐¹, 赵茂林², 郭廷东¹, 张 燕¹, 唐志立¹, 谢席胜^{3△}

(1. 川北医学院第二临床医学院·四川省南充市中心医院药学部·个体化药物治疗南充市重点实验室, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院医学影像学院, 四川 南充 637100 3. 川北医学院第二临床医学院·四川省南充市中心医院肾内科, 四川 南充 637000)

摘要:目的 建立黄芪三七合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱法对制剂中黄芪、三七、当归进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定人参皂苷 Rg₁ 含量,色谱柱为 Shimadzu C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(19:81, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 203 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 10 μL。结果 黄芪、三七、当归薄层色谱图中,斑点清晰,阴性对照无干扰。人参皂苷 Rg₁ 质量浓度在 0.178~0.890 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率为 99.30%, RSD 为 1.10% (n=6)。结论 所建立的定性、定量方法专属性强,操作简单,重复性好,可用于黄芪三七合剂的质量控制。

关键词:黄芪三七合剂;薄层色谱法;高效液相色谱法;人参皂苷 Rg₁;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0058-04

Quality Standard of Huangqi Sanqi Mixture

ZHANG Shijin¹, LAN Yang¹, WANG Yali¹, ZHAO Maolin², GUO Tingdong¹, ZHANG Yan¹, TANG Zhili¹, XIE Xisheng³

(1. The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College · Department of Pharmacy, Nanchong Central Hospital · Nanchong Key Laboratory of Individualized Drug Therapy, Nanchong, Sichuan, China 637000; 2. School of Medical Imaging, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637100; 3. The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College · Department of Nephrology, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Huangqi Sanqi Mixture. Methods Thin-layer chromatography (TLC) was adopted for the qualitative identification of Astragali Radix, Notoginseng Radix et Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix. High-performance liquid chromatography (HPLC) was adopted for the content determination of ginsenoside Rg₁, the chromatographic column was Shimadzu C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (19:81, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. Results The TLC chromatograms of Astragali Radix, Notoginseng Radix et Rhizoma and Angelicae Sinensis Radix had clear spots and no negative interference. The linear range of ginsenoside Rg₁ was 0.178-0.890 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recovery of ginsenoside Rg₁ was 99.30% with RSD of 1.10% (n=6). Conclusion The established qualitative and quantitative methods are specific, simple and reproducible, which can be used for the quality control of Huangqi Sanqi Mixture.

Key words: Huangqi Sanqi Mixture; TLC; HPLC; ginsenoside Rg₁; quality standard

黄芪三七合剂是根据川北医学院第二临床医学院肾内科谢席胜主任医师临床验方开发的院内制剂,由黄芪、三七、当归、牛膝、昆布、薏苡仁、山药、甘草等中药组方,有益气养血、活血利水、健脾助运之功效,临床主要用于改善 3-4 期慢性肾脏病患者的临床症状,延缓其病情向终末期发展。前期研究发现,黄芪三七复方能降低尿蛋白水平,调节血脂,改善高凝血状态,调节血清白蛋白水平及免疫状态,继而延缓病情进展,提高慢性肾脏病患者的生存质量^[1-2]。汤剂煎煮烦琐,携带、储藏不便,且口感差,患者依从性差。为此,本课题组在不改变

原方汤剂的物质基础上将其开发成合剂,并在前期完成了黄芪三七合剂制备工艺研究。为有效控制其质量,本研究中拟对制剂中黄芪、三七、当归进行定性鉴别,并对其中有效成分人参皂苷 Rg₁ 进行含量测定,以建立该制剂的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); MS105DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多国际有限公司); JY10002 型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪

*基金项目:四川省科技厅科技计划项目[21ZDYF2053];四川省教育厅科研计划项目[18ZB0223];四川省中医药管理局中医药科研专项[2018QN026, 2018YY007];四川省南充市哲学社会科学重点研究基地项目[YAZX19-Z-04, YAZX19-Y-02];四川省南充市校合作科研专项[NSMC20170109, 18SXHZ0453];川北医学院科研发展计划项目[CBY18-A-YB32]。

第一作者:张仕瑾,男,博士研究生,主管中药师,研究方向为中药制剂,(电话)0817-2258948(电子信箱)1653531156@qq.com。

△通信作者:谢席胜,女,博士研究生,主任医师,研究方向为中西医结合治疗肾脏病,(电话)0817-2258678(电子信箱)xishengx@163.com。

器有限公司);TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(济南鑫贝西生物技术有限公司);KQ-250V 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UPH-1V-20T 型超纯水制造系统(四川优普超纯科技有限公司)。

1.2 试药

黄芪三七合剂(南充市中心医院制剂室,批号分别为 0224,0225,0226);当归对照药材(批号为 120927-201617),人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号为 110703-201832,含量为 92.4%),黄芪甲苷对照品(批号为 110781-201717,含量为 96.9%),三七皂苷 R_1 对照品(批号为 110745-201820,含量为 93.1%),均购自中国食品药品检定研究院;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 定性鉴别

当归:取样品 50 mL,乙醚振摇提取 2 次,每次 40 mL,水相留储备用,合并有机相,水浴蒸干,加甲醇 2 mL 溶解固形物,作为供试品溶液。按黄芪三七合剂处方和工艺制备缺当归的阴性样品,同法制得缺当归的阴性对照品溶液。另取当归对照药材 0.5 g,用 20 mL 乙醚超声(功率 250 W,频率 40 kHz)提取 10 min,提取液滤过,水浴蒸干,加甲醇 1 mL 溶解固形物,作为对照药材溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502“薄层色谱法”项下方法,分别吸取上述 3 种溶液 5~10 μ L,点于同一硅胶 G 板上,以环己烷-乙酸乙酯(3:1, V/V)为展开剂,展开前预饱和 20 min,待展距约 8 cm 时,取出,挥干溶剂,在紫外灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置处显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。见图 1 A。

黄芪:取当归鉴别项下水相,乙酸乙酯洗涤 2 次(每次

40 mL),水相用水饱和正丁醇萃取 2 次(每次 40 mL),合并上层溶液,氨试液洗涤 2 次(每次 20 mL),水浴蒸干,加甲醇 1 mL 溶解固形物,作为供试品溶液。按黄芪三七合剂处方和工艺制备缺黄芪的阴性样品,同法制得阴性对照品溶液。另取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 1 mg/mL 的对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502“薄层色谱法”项下方法,分别吸取上述 3 种溶液 5~10 μ L,点于同一硅胶 G 板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V)2~10 $^{\circ}$ C 放置 12 h 以上的下层溶液为展开剂,展开前预饱和 20 min,待展距约 10 cm 时,取出,挥干溶剂,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,加热至斑点清晰。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。见图 1 B。

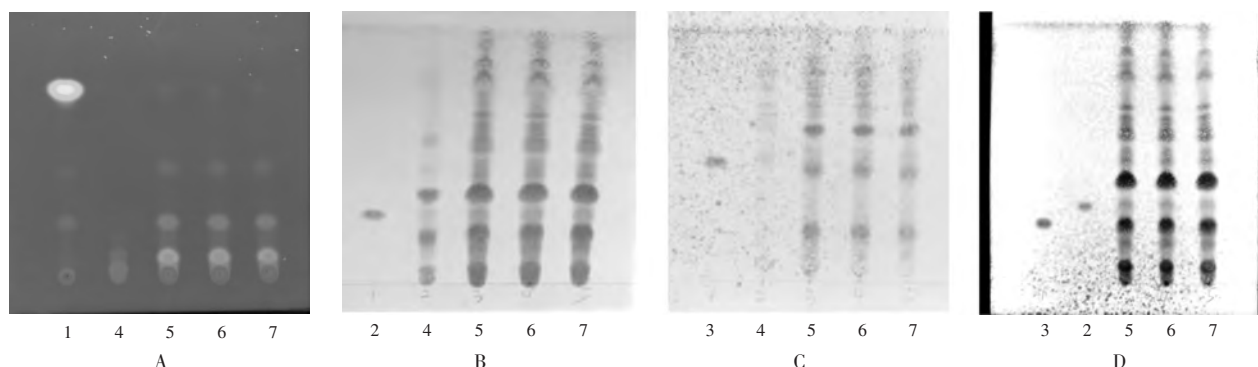
三七:以黄芪鉴别项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液。按黄芪三七合剂处方和工艺制备缺三七的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。另取三七皂苷 R_1 对照品适量,加甲醇制成 1 mg/mL 的对照品溶液。后续操作同黄芪鉴别项下。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。见图 1 C。

黄芪、三七:由于黄芪甲苷和三七皂苷均属三萜皂苷,结构相似。在同一展开系统中斑点清晰,分离度较好。为方便操作,将两者采用同一展开系统同时进行鉴别。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置处显相同颜色的斑点,各斑点分离度好。见图 1 D。

2.2 人参皂苷 R_{g1} 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(19:81, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:203 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。



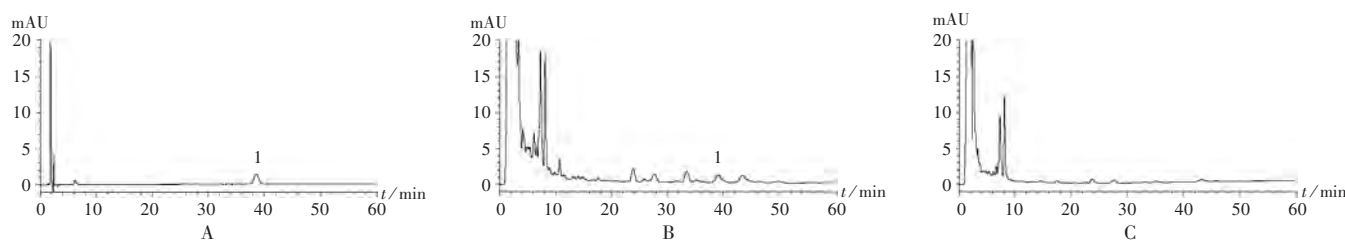
1. 当归对照药材溶液 2. 黄芪甲苷对照品溶液 3. 三七皂苷 R_1 对照品溶液 4. 阴性对照品溶液 5-7. 供试品溶液
A. 当归 B. 黄芪 C. 三七 D. 黄芪、三七

图 1 薄层色谱图

1. *Angelicae Sinensis Radix* reference material solution 2. astragaloside IV reference solution 3. notoginsenoside R_1 reference solution
4. negative reference solution 5-7. test solution

A. *Angelicae Sinensis Radix* B. *Astragali Radix* C. *Notoginseng Radix et Rhizoma* D. *Astragali Radix and Notoginseng Radix et Rhizoma*

Fig. 1 TLC chromatograms



1. 人参皂苷 R_{g1}
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. ginsenoside R_{g1}
A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

2.2.2 溶液制备

取人参皂苷 R_{g1} 对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 445 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备液,稀释 10 倍,制成质量浓度为 44.5 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。精密吸取摇匀后的样品(批号为 0224)2 mL,置 25 mL 容量瓶中,用 75% 甲醇定容,10 $^{\circ}\text{C}$ 下,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按黄芪三七合剂处方和工艺制备缺三七的阴性样品,同法制得阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取 2.2.2 项下 3 种溶液各 10 μL ,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图 2。结果在与对照品溶液色谱相同保留时间处阴性对照品溶液色谱无干扰峰,表明专属性良好。

线性关系、检测限(LOD)和定量限(LOQ)考察:分别精密吸取对照品贮备液适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为 17.80, 26.70, 35.600, 44.50, 66.75, 89.00 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。以人参皂苷 R_{g1} 峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 3\,332.2X - 11\,443$ ($R^2 = 0.999\,7$, $n = 6$)。结果表明,人参皂苷 R_{g1} 质量浓度在 17.80 ~ 89.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。以 3 倍信噪比对应的检测水平计算,得 LOD 为 3.9 $\mu\text{g/mL}$,以 10 倍信噪比对应的检测水平计算,得 LOQ 为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

精密度试验:精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液 10 μL ,按 2.2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 1.13% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 0224)样品,依法制备供试品溶液,室温下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 时进样测定。结果峰面积的 RSD 为 1.68% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 0224)样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条

件连续进样 6 次,测定。结果峰面积的 RSD 为 1.42% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密吸取已知含量(0.565 1 mg/mL)的样品 1 mL,置 25 mL 容量瓶中,平行 6 份,分别精密加入对照品溶液(1.212 4 mg/mL)0.5 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 1。

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of recovery tests($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.565 1	0.606 2	1.175 9	100.76	99.30	1.10
0.565 1	0.606 2	1.169 8	99.75		
0.565 1	0.606 2	1.163 1	98.65		
0.565 1	0.606 2	1.159 7	98.09		
0.565 1	0.606 2	1.172 6	100.21		
0.565 1	0.606 2	1.161 2	98.33		

2.2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 0224, 0225, 0226)样品各适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果 3 批样品人参皂苷 R_{g1} 平均含量分别为 0.590 7, 0.571 0, 0.565 4 mg/mL 。

3 讨论

3.1 展开剂选择

在黄芪薄层鉴别预试验过程中尝试了多种不同展开系统,结果阴性样品始终存在干扰。进一步试验发现,由于黄芪甲苷和人参皂苷 R_{g1} 两者均为三萜皂苷类成分,极性相似,未能分离,故在阴性样品中存在人参皂苷 R_{g1} 干扰现象。参考文献[3]中黄芪甲苷与人参皂苷 R_{g1} 的分离方法,未能得到较好的结果。多次尝试后发现,将三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, $V/V/V$)2 ~ 10 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h 以上的下层溶液作为展开剂,能较好地分离黄芪甲苷、三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 等 3 种结构类似化合物。为方便操作,特将黄芪与三七在同一薄层板上进行