

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.022

颈舒颗粒中有效成分含量测定

叶 慧, 李 敏[△]

(江苏省泰州市食品药品检验所, 江苏 泰州 225300)

摘要:目的 建立颈舒颗粒中有效成分含量测定的高效液相色谱(HPLC)法。方法 采用高效液相色谱-紫外可见分光光度(HPLC-UV)法测定颈舒颗粒中三七药材中5种成分三七皂苷R₁、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rd的含量,以乙腈-水溶液为流动相(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,检测波长为203 nm;采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法测定制剂中人工牛黄药材中胆酸、猪去氧胆酸的含量,以乙腈-0.2%甲酸溶液为流动相(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,气体压力为40 psi,漂移管温度为60 ℃。结果 该制剂中三七药材5种成分的回收率为97.82%~103.85%,RSD均小于1.50%(n=6);人工牛黄药材中胆酸、猪去氧胆酸的回收率为100.94%和100.32%,RSD均小于1.60%(n=6);7种成分的线性关系均良好(r≥0.999 0)。结论 该方法简便、准确可靠,重复性好,结果稳定,可用于颈舒颗粒的质量控制。

关键词:颈舒颗粒;高效液相色谱法;蒸发光散射检测器法;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)13-0076-05

Content Determination of Active Components in Jingshu Granules

YE Hui, LI Min

(Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the determination of active components in Jingshu Granules. **Methods** The HPLC-UV visible spectrophotometry(HPLC-UV) method was used to determine the content of 5 components in Panax notoginseng, notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rd in Jingshu Granules. Acetonitrile-water solution was used as mobile phase in gradient elution and the flow rate was 0.8 mL/min, with a detection wavelength of 203 nm; HPLC-evaporative light scattering detector(HPLC-ELSD) method was used to determine the content of cholic acid and hyodeoxycholic acid in the artificial bezoar in the preparation, the mobile phase was acetonitrile-0.2% acid solution in gradient elution with the flow rate is 0.8 mL/min, the gas pressure 40 psi, and the drift tube temperature 60 ℃. **Results** The recovery rates of 5 components in Panax notoginseng in this preparation ranged 97.82%~103.85%, and the RSDs were all less than 1.50%(n=6); the recovery rates of the two components in the artificial bezoar were 100.94% and 100.32%, and the RSDs were less than 1.60%(n=6); the linear relationships of the 7 components were all good(r≥0.999 9). **Conclusion** The method is simple, efficient, accurate and reliable, with good repeatability and stable results, which can be used for the quality control of Jingshu Granules.

Key words: Jingshu Granules; high performance liquid chromatography; high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector; content determination

颈舒颗粒是一种常用于治疗颈椎病的6类中成药,由三七、川芎、当归、肉桂、红花、天麻、人工牛黄7味中药材组方。方中三七为君药,化瘀、止痛、活血^[1];当归^[2]、

红花^[3]、川芎^[4]共为臣药,补血行气,活血祛瘀,以增强三七的活血化瘀止痛效力;肉桂^[5]、天麻^[6]为佐药,肉桂温阳通脉,天麻入肝经,善治风寒湿痹、眩晕麻木、肢体

第一作者:叶慧,大学本科,副主任中药师,研究方向为中药检验,(电子信箱)qinglanyiyi@126.com。

[△]通信作者:李敏,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药检验,(电子信箱)544393951@qq.com。

3.4 药材转移率

取制备九叶酒的淫羊藿药材,测定药材中淫羊藿苷含量,根据处方,计算得药材转移率为81.33%。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:327.
- [2] 严跃进,沈勇,黄伟,等. 不同浓度醇提取淫羊藿功效成分的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(5):568-570.
- [3] 姚慧敏,董艳辉,武子敬,等. HPLC法同时测定淫羊藿自乳化软胶囊中朝藿定A,B,C与淫羊藿苷成分的含量[J]. 中国新药杂志,2012,21(6):697-700.
- [4] 阮岩,何伟平,王建慧,等. HPLC法测定鼻窦灌注液中淫羊藿苷的含量[J]. 中药新药与临床药理,2018,29(1):75-77.

- [5] 叶方,杨光义,匡颖文,等. HPLC法房陵黄酒保健药酒中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药师,2011,14(6):883-884.
- [6] 郭伟魁,严倩茹,古炳明. HPLC法测定金蚱片中4种淫羊藿黄酮苷类成分的研究[J]. 中国药物评价,2019,36(1):34-36.
- [7] 李文龙,刘满军,曹小平,等. HPLC法同时测定坤安膏中芍药苷、丹酚酸B、淫羊藿苷含量[J]. 亚太传统医药,2019,15(4):48-50.
- [8] 张凌凤,洪雅丹,骆瑶,等. HPLC法测定杜仲-淫羊藿药对中8个化学成分的含量[J]. 药物分析杂志,2019,39(5):772-779.
- [9] 王珏,张毕奎,戴迎春. HPLC法测定古汉养生精片(口服液)中淫羊藿苷的含量[J]. 甘肃医药,2016,35(11):812-815.
- [10] 李遇伯,孟繁浩,梁茂新,等. RP-HPLC法测定骨疏丹中淫羊藿苷和蛇床子素的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(4):279-281.

(收稿日期:2019-12-27)

拘挛;人工牛黄为使药,由牛胆粉、胆酸、猪去氧胆酸、牛磺酸、胆红素、胆固醇、微量元素等加工制成^{[7]5,70,173},开窍通络,药性寒凉^[8],加入药性辛温的肉桂,既可平衡其寒凉,又能助其开窍通络之功效,引领各药直达病所。其功能活血化瘀、温经、通窍、止痛,临床主要用于神经根型颈椎痹血阻络证,症见颈肩部僵硬、疼痛,患侧上肢窜痛等^{[7]1568-1569},对于气滞血瘀证型颈椎病有较好效果^[9-10],配合针灸、手法、理疗等能提高疗效^[11-12]。其现行质量标准收录于2015年版《中国药典(一部)》,含量测定项下对三七药材的人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 进行了定量测定,以及人工牛黄中的胆酸进行定量测定。在原标准基础上,本研究中进一步补充了含量测定项的不足,建立了颈舒颗粒中有效成分含量测定的高效液相色谱(HPLC)法,为后续质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity Arc 型高效液相色谱仪(包括 Empower® 3 工作站,四元梯度泵,2998 PDA 检测器,自动进样器和柱温箱),Waters® e2695 Separations Module 型高效液相色谱仪(包括 Empower® 3 工作站,四元梯度泵,2424 ELS 检测器,自动进样器和柱温箱),均购自美国 Waters 公司;8200 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 53 kHz);Milli-Q 型超纯水处理系统(美国 Millipore 公司);XS105DU 型电子天平(瑞士 Mettler 公司,精度为十万分之一)。

1.2 试剂

三七皂苷 R_1 对照品(批号为 110745-201318,纯度为 94.0%),人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号为 110703-201530,纯度为 91.7%),人参皂苷 R_e 对照品(批号为 110754-201626,纯度为 97.4%),人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号为 110704-201424,纯度为 93.7%),人参皂苷 R_d 对照品(批号为 111818,纯度为 92.1%),胆酸对照品(批号为 100078-201415,纯度为 98.9%),猪去氧胆酸对照品(批号为 100087-200610,纯度为 99.0%),均购自中国食品药品检定研究院;颈舒颗粒(国药集团精方<安徽>药业股份有限公司,批号分别为 171202,171209,180631);三七、当归、川芎、红花、天麻、肉桂、人工牛黄药材(市售,经泰州市食品药品检验所仇雅静主任中药师鉴定为正品);乙腈为色谱纯(Fisher 公司);甲醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 三七药材中 5 种成分含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters XBridge C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μ m);流动相:A 为乙腈溶液,B 为水溶液,梯度洗

脱,0~20 min 时 20% A,20~45 min 时 20% A~46% A,45~55 min 时 46% A~55% A,55~60 min 时 55% A,60~62 min 时 55% A~20% A,62~70 min 时 20% A;流速:0.8 mL/min;柱温:30℃;检测波长:203 nm;进样量:10 μ L。人参皂苷 R_{g1} 峰与人参皂苷 R_e 峰的分离度均大于 1.5。

2.1.2 溶液制备

精密称取三七皂苷 R_1 对照品,人参皂苷 R_{g1} , R_e , R_{b1} , R_d 对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 0.40 mg、人参皂苷 R_{g1} 0.52 mg、人参皂苷 R_e 0.16 mg、人参皂苷 R_{b1} 0.79 mg、人参皂苷 R_d 0.72 mg 的混合对照品溶液。取样品,研细,混匀,取 2.0 g,精密称定,置锥形瓶中,加入 30 mL 乙醚,振摇提取 2 h^[2],过滤,滤渣挥干,精密量取 40 mL 甲醇,称定质量,超声处理(功率为 250 W,33 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,蒸干,残渣加 20 mL 水溶解,用水饱和正丁醇溶液萃取 3 次,每次 25 mL,合并正丁醇液,用水饱和正丁醇溶液洗涤 2 次,每次 25 mL,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得供试品溶液。取缺三七药材的其他药材,按颈舒颗粒标准制法煎煮、浓缩为阴性样品,按供试品溶液制备方法制备缺三七药材的阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察^[4]

专属性试验:按拟订色谱条件分别对 2.1.2 项下 3 种溶液进样分析,记录色谱图,对照品溶液出峰顺序为三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 。结果供试品溶液与对照品溶液色谱相应峰保留时间一致,阴性对照无干扰,且各组分相邻成分之间分离度均较好($R>1.5$)。色谱图见图 1。

线性关系考察:取适量对照品,精密称定,配成每 1 mL 含三七皂苷 R_1 0.74 mg、人参皂苷 R_{g1} 2.62 mg、人参皂苷 R_e 0.37 mg、人参皂苷 R_{b1} 2.75 mg、人参皂苷 R_d 0.76 mg 的混合对照品溶液,稀释 2,3,3.3,5,10,20 倍^[6],分别进样 10 μ L,记录峰面积,以对照品溶液质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表 1。

精密度试验:取 2.1.1 项下对照品混合溶液,连续进样 6 次。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 色谱峰面积的 RSD 分别为 0.30%,0.47%,0.51%,0.40%,0.44% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 171202)适量,精密称定,平行制备供试品溶液 6 份,依法测定含量。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 的平均含量分别为 1.46,2.95,0.38,1.92,1.45 mg/g, RSD 分别为 1.78%,1.44%,2.01%,1.57%,1.67% ($n=6$),表明方法重复性良好。

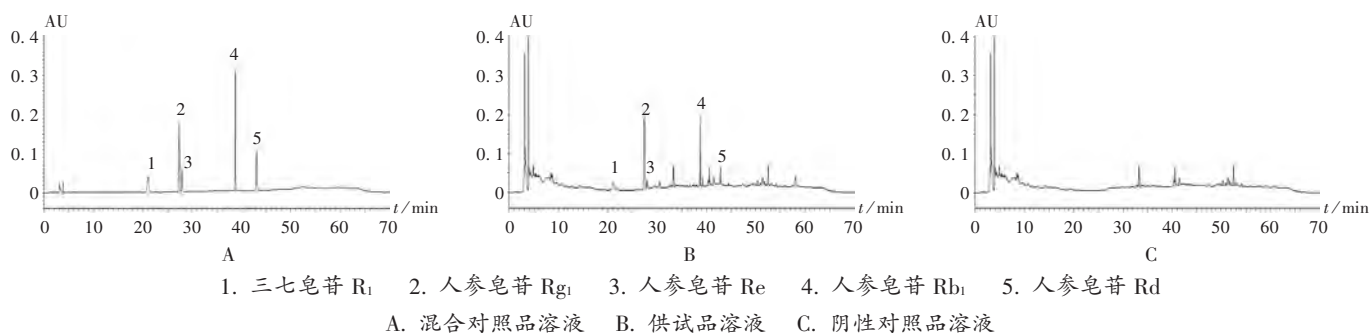


图1 三七高效液相色谱图

表1 三七中5种成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围(mg/mL)
三七皂苷 R_i	$Y = 2.674\ 6105\ X + 4.217\ 210\ 3$	0.005 5 ~ 0.74
人参皂苷 R_{g1}	$Y = 3.449\ 5105\ X + 4.065\ 410\ 3$	0.020 0 ~ 2.62
人参皂苷 R_e	$Y = 3.022\ 9105\ X - 2.310\ 710\ 3$	0.002 8 ~ 0.37
人参皂苷 R_{b1}	$Y = 2.622\ 1105\ X + 1.642\ 610\ 4$	0.021 0 ~ 2.76
人参皂苷 R_d	$Y = 2.686\ 8105\ X + 3.640\ 010\ 3$	0.005 7 ~ 0.76

稳定性试验:取样品(批号为171202)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,18,24 h 时进样测定,记录峰面积。结果三七皂苷 R_i 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_d 峰面积的 RSD 分别为 1.40%, 0.13%, 0.95%, 1.21%, 0.56% ($n=7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为171202),研细,称取 6 份,每份 1.0 g,精密称定,加入混合对照品溶液(质量浓度分别为三七皂苷 R_i 0.40 mg/mL、人参皂苷 R_{g1} 0.52 mg/mL、人参皂苷 R_e 0.16 mg/mL、人参皂苷 R_{b1} 0.79 mg/mL、人参皂苷 R_d 0.71 mg/mL) 2 mL,依法制备供试品溶液,定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,即得。按拟订色谱条件进样 10 μ L,测定峰面积,计算平均加样回收率。结果见表 2。

2.1.4 样品含量测定^[10]

取 3 批样品,对比 2015 年版《中国药典(一部)》与本研究改进的提取方法制备供试品溶液,按外标法分别计算 3 批样品中 5 种成分的含量。结果见表 3。

2.2 人工牛黄中胆酸、猪去氧胆酸含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Poroshell 120 EC - C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μ m);流动相:A 为乙腈溶液,B 为 0.2% 甲酸溶液,梯度洗脱,0~7 min 时 5% A,7~20 min 时 5% A~80% A,20~25 min 时 80% A~90% A,25~30 min 时 90% A~96% A;流速:0.8 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测器增益:10;气体压力:40 psi;喷雾器模式:加热;功率级别:65%;漂移管温度:60 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2.2 溶液制备

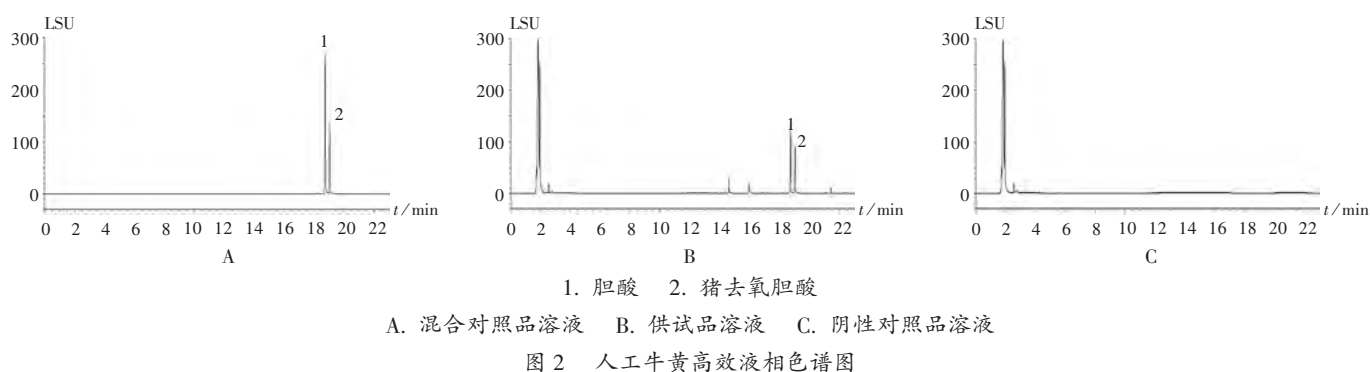
取胆酸、猪去氧胆酸对照品适量,精密称定,加甲醇

表2 加样回收试验结果($n=6$)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
三七皂苷 R_i	0.994 2	0.980 5	0.8	1.792 1	101.45	101.50	0.94
	0.993 8	0.984 2	0.8	1.791 5	100.91		
	0.997 6	0.984 1	0.8	1.804 5	102.55		
	0.998 5	0.988 5	0.8	1.795 8	100.91		
	0.100 6	1.001 2	0.8	1.804 7	100.44		
	0.100 8	1.002 5	0.8	1.824 6	102.76		
人参皂苷 R_{g1}	0.994 2	2.928 9	1.04	3.936 4	96.88	97.82	0.80
	0.993 8	2.935 6	1.04	3.948 6	97.40		
	0.997 6	2.947 6	1.04	3.975 4	98.83		
	0.998 5	2.945 2	1.04	3.958 9	97.47		
	0.100 6	2.971 6	1.04	3.987 0	97.63		
	0.100 8	2.970 8	1.04	3.997 1	98.68		
人参皂苷 R_e	0.994 2	0.395 2	0.32	0.732 4	105.38	103.85	1.49
	0.993 8	0.380 5	0.32	0.711 5	103.44		
	0.997 6	0.398 7	0.32	0.732 8	104.41		
	0.998 5	0.404 1	0.32	0.727 2	100.97		
	0.100 6	0.405 8	0.32	0.740 8	104.69		
	0.100 8	0.408 2	0.32	0.741 7	104.22		
人参皂苷 R_{b1}	0.994 2	1.908 6	1.59	3.487 5	99.30	99.51	0.71
	0.993 8	1.912 0	1.59	3.496 4	99.65		
	0.997 6	1.928 6	1.59	3.490 5	98.23		
	0.998 5	1.914 2	1.59	3.500 6	99.77		
	0.100 6	1.933 1	1.59	3.527 9	100.30		
	0.100 8	1.930 8	1.59	3.517 7	99.81		
人参皂苷 R_d	0.994 2	1.440 8	1.42	2.890 7	102.11	103.04	0.94
	0.993 8	1.445 4	1.42	2.905 3	102.81		
	0.997 6	1.452 1	1.42	2.904 2	102.26		
	0.998 5	1.450 9	1.42	2.910 1	102.76		
	0.100 6	1.460 3	1.42	2.931 4	103.60		
	0.100 8	1.461 2	1.42	2.947 8	104.69		

表3 3批样品中皂苷类成分含量测定结果(mg/g)

批号	《中国药典》方法			改进方法			
	人参皂苷 R_{g1}	人参皂苷 R_{b1}	三七皂苷 R_i	人参皂苷 R_{g1}	人参皂苷 R_e	人参皂苷 R_{b1}	人参皂苷 R_d
171202	2.05	1.12	1.46	2.95	0.38	1.92	1.45
171209	2.43	1.26	1.58	3.15	0.41	2.10	1.54
180631	1.78	1.01	1.35	2.72	0.33	1.81	1.38



制成每1 mL含胆酸0.89 mg、猪去氧胆酸0.68 mg的混合对照品溶液。取样品适量,研细,取0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10 mL,超声处理(功率为250 W,频率为50 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取缺人工牛黄药材的其他药材,按颈舒颗粒标准制法煎煮、浓缩为阴性样品,再按供试品溶液制备方法制备缺人工牛黄的阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:按拟订色谱条件分别对2.2.2项下3种溶液进样分析,记录色谱图,对照品溶液出峰顺序为胆酸、猪去氧胆酸。结果供试品溶液与对照品溶液色谱相应峰保留时间一致,阴性对照无干扰,且各组分相邻成分之间分离度均大于1.5。色谱图见图2。

线性关系考察:取2.2.2项下对照品溶液进行不同比例的稀释,得系列线性对照品溶液,精密吸取各级对照品溶液各10 μ L,按拟订色谱条件注入液相色谱仪,测得峰面积,以进样量对数值(X)为横坐标、峰面积对数值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{胆酸}} = 8.744\ 510\ 4 X_{\text{胆酸}} - 6.353\ 103$, $r = 0.999\ 9$; $Y_{\text{猪去氧胆酸}} = 7.101\ 810\ 4 X_{\text{猪去氧胆酸}} + 6.619\ 103$, $r = 0.999\ 4$ 。胆酸和猪去氧胆酸进样量对数值分别在1.94~19.45 μ g和1.00~9.97 μ g范围内与峰面积对数值线性关系良好。

精密度试验:取上述胆酸、猪去氧胆酸混合对照品溶液,连续进样6次,记录色谱峰面积。结果的RSD分别为1.90%和1.35% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为171202)适量,精密称定,依法平行制备供试品溶液6份,按拟订色谱条件测定。结果胆酸和猪去氧胆酸平均含量分别为11.63 mg/g, 7.67 mg/g, RSD分别为0.29%和1.27% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为171202)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,分别于0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h时进样,记录峰面积。结果胆酸、猪去氧胆酸的RSD分别为1.89%和1.92% ($n = 7$),表明供试品溶液在12 h

内稳定。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为171202),研细,称取6份,每份0.25 g,精密称定,加入(胆酸质量浓度为0.89 mg/mL、猪去氧胆酸质量浓度为0.68 mg/mL)混合对照品溶液2 mL,依法制备供试品溶液,定容至10 mL容量瓶中,摇匀,按拟订色谱条件进样10 μ L,测定峰面积,计算回收率。结果见表4。

表4 加样回收试验结果($n = 6$)

待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
胆酸	0.258 6	2.128 3	1.78	3.897 5	99.39	100.94	1.58
	0.258 8	2.127 5	1.78	3.884 5	98.71		
	0.249 1	2.042 8	1.78	3.874 2	102.89		
	0.249 6	2.057 6	1.78	3.858 5	101.17		
	0.250 8	2.050 4	1.78	3.867 4	102.08		
	0.250 4	2.053 4	1.78	3.857 9	101.38		
猪去氧胆酸	0.258 6	1.758 4	1.36	3.104 5	98.98	100.32	0.99
	0.258 8	1.764 2	1.36	3.117 8	99.53		
	0.249 1	1.697 5	1.36	3.064 2	100.49		
	0.249 6	1.691 3	1.36	3.055 8	100.33		
	0.250 8	1.708 6	1.36	3.093 5	101.83		
	0.250 4	1.704 1	1.36	3.074 0	100.73		

2.2.4 样品含量测定

取3批样品,依法制备供试品溶液,采用HPLC-蒸发光散射检测器(ELSD)法和HPLC-紫外可见分光光度(UV)法分别按改进方法和2015年版《中国药典(一部)》方法测定样品中有效成分的含量。结果见表5。

表5 3批样品胆酸、猪去氧胆酸含量(mg/g)

批号	胆酸*	胆酸*	猪去氧胆酸*
171202	7.23	8.19	6.79
171209	7.46	8.65	7.27
180631	7.31	8.22	6.74

注:*为《中国药典》中方法,*为改进方法。

3 讨论

3.1 三七药材前处理考察

曾考察甲醇超声、乙醚脱脂甲醇超声、乙醚脱脂甲