

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.022

超高效液相色谱法同时测定颈舒颗粒中4种皂苷类成分含量

李天佑,何羽[△]

(贵州省毕节市市场监督管理局检验检测中心,贵州 毕节 551700)

摘要:目的 建立同时测定颈舒颗粒中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 含量的超高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters BEH C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为 0.6 mL/min,检测波长为 203 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 1 μL。结果 三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 在各自含量范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9991$, $n=7$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%;平均回收率分别为 101.23%, 101.36%, 100.29%, 99.31%, RSD 分别为 1.25%, 1.32%, 0.89%, 1.34% ($n=6$)。结论 该方法操作快速简便,专属性强,重复性好,准确度较高,可用于颈舒颗粒中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re 4 种成分的含量测定。

关键词:颈舒颗粒;超高效液相色谱法;皂苷类成分;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)17-0082-04

Simultaneous Determinations of Four Saponins in Jingshu Granules by UPLC

LI Tianyou, HE Yu

(Bijie Inspection and Testing Center of Administration for Market Supervision, Bijie, Guizhou, China 551700)

Abstract: Objective To establish an ultra high-performance liquid chromatography (UPLC) method for the simultaneous determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Re in Jingshu Granules. **Methods** The chromatographic column was Waters BEH C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution, the flow rate was 0.6 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 1 μL. **Results** Notoginsenoside R₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁, and ginsenoside Re showed a good linear relationship with the peak area in their respective mass ranges ($r \geq 0.9991$, $n=7$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2%. The average recoveries of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁, and ginsenoside Re were 101.23%, 101.36%, 100.29% and 99.31% with RSDs of 1.25%, 1.32%, 0.89% and 1.34% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is rapid, simple, specific, reproducible, and accurate, which can be used for the content determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re in Jingshu Granules.

Key words: Jingshu Granules; UPLC; saponins; content determination

颈舒颗粒由三七、川芎、当归、红花、肉桂、天麻、人工牛黄 7 味中药组方^[1],具有活血化瘀、温经通窍止痛功效,治疗颈椎病效果较好^[2-4]。方中三七为君药,功能散瘀止血、消肿定痛,用于治疗出血、瘀滞肿痛、跌打损伤、胸腹刺痛等症。2015 年版《中国药典(一部)》收载的颈舒颗粒^[1],含量测定项下仅对三七中人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 成分进行指标控制。超高效液相色谱(UPLC)法灵敏度高,分离效果好,检测快速,可快捷、全

面控制颈舒颗粒中三七的质量。本研究中采用 UPLC 法同时测定颈舒颗粒中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb₁ 的含量^[5-9],可为该制剂的检测、开发及质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters ACQUITY Classs 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国

第一作者:李天佑,男,大学本科,主管中药师,研究方向为中药检验和质量标准,(电子信箱)348787976@qq.com。

[△]通信作者:何羽,男,大学本科,副主任药师,研究方向为中药检验和质量标准,(电子信箱)1098873671@qq.com。

- 碱、伪麻黄碱的含量[J]. 广州化工,2017,45(18):112-114.
- [11] 陈霖,马雪丹,焦爱军,等. HPLC 法测定麻杏止咳糖浆中盐酸麻黄碱、苦杏仁苷的含量[J]. 广西医科大学学报, 2020,37(8):1566-1569.
- [12] 郝哲,王丽军,张建帮. HPLC 法测定麻杏抗感颗粒中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 药学实践杂志,2018, 36(4):355-357.

- [13] 毕福钧,林彤. HPLC 法测定小儿咳喘灵口服液中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量[J]. 中药新药与临床药理,2014, 25(4):490-493.
- [14] 冉亚东,原欢欢,官柳. HPLC 法测定鼻炎糖浆中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 药学研究,2014,33(12): 699-701.

(收稿日期:2021-01-05;修回日期:2021-04-07)

Agilent 公司);PS-G60A 型超声波清洗机(东莞市洁康超声波设备有限公司,功率为 360 W,频率为 40 kHz);ATSmol 1850C 型超纯水机(天津市泰斯特仪器有限公司);MSE3.6P-OCE-DM 型电子天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司,精度为百万分之一);AY120 型电子天平(日本岛津公司,精度为万分之一)。

1.2 试药

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 200212,200403,191206);三七皂苷 R_1 对照品(批号为 110745-201921,纯度为 93.1%),人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号为 110704-201827,纯度为 93.1%),人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号为 110703-201933,纯度为 93.4%),人参皂苷 R_e 对照品(批号为 110754-201827,纯度为 93.4%),均购于中国食品药品检定研究院;肉桂(批号为 170501),当归(批号为 190403),红花(批号为 190701),天麻(批号为 180601),川芎(批号为 190401),均购于贵州达灵药业有限公司;人工牛黄(四川菲德力制药有限公司,批号为 170101);乙醚、甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯,均购于美国 Tedia 试剂公司;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters BEH C_{18} 柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μ m);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速:0.6 mL/min;检测波长:203 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:1 μ L。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution procedure of the mobile phase

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~4	18	82	10~11	65→90	35→10
4~9	18→35	82→65	11~13	90	10
9~10	35→65	65→35	13~14	90→18	10→82

2.2 溶液制备

分别取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_{g1} 及人参皂苷 R_e 对照品 2.281,2.737,4.103,1.220 mg,

精密称定,置同一 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。取样品(批号为 200212)1.0 g,混匀,研细,精密称定,置索氏提取器中,加乙醚适量,水浴微沸回流提取 1 h,滤过,滤纸及药渣挥干后置同一具塞锥形瓶中,加甲醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,取甲醇 20 mL,分 2 次洗涤滤渣,滤液置同一蒸发皿中,蒸干,加水 20 mL 使残渣溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇溶解,并定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,滤过,即得供试品溶液。取肉桂、当归、红花、天麻、川芎、人工牛黄,按颈舒颗粒处方及制备工艺煎煮、浓缩制成阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶剂(甲醇)及阴性对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件分别进样分析,色谱图见图 1。结果供试品溶液 4 个主成分色谱峰与混合对照品溶液的 4 个主成分色谱峰保留时间一致,且在 10 min 内完全分离,分离度均大于 1.5,阴性对照无干扰。

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下混合对照品溶液 0.1,0.3,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 μ L,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、各化学成分含量(X, μ g)为横坐标进行线性回归。结果见表 2。

表 2 4 种化学成分线性关系考察结果($n=7$)

Tab. 2 Results of linear relation test of four chemical constituents($n=7$)

成分	线性回归方程	线性范围(μ g)	相关系数(r)
三七皂苷 R_1	$Y=486.088X-1270.7$	0.021236~0.53090	0.9999
人参皂苷 R_{g1}	$Y=600.505X-4868.0$	0.038322~0.95805	0.9998
人参皂苷 R_e	$Y=510.461X-1761.4$	0.011395~0.28487	0.9991
人参皂苷 R_{b1}	$Y=443.463X-2860.4$	0.025481~0.63704	0.9995

精密度试验:精密量取 2.2 项下混合对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 峰面积的 RSD 分别为 0.29%,0.63%,0.12%,0.83%($n=6$),表明仪器精密密度良好。

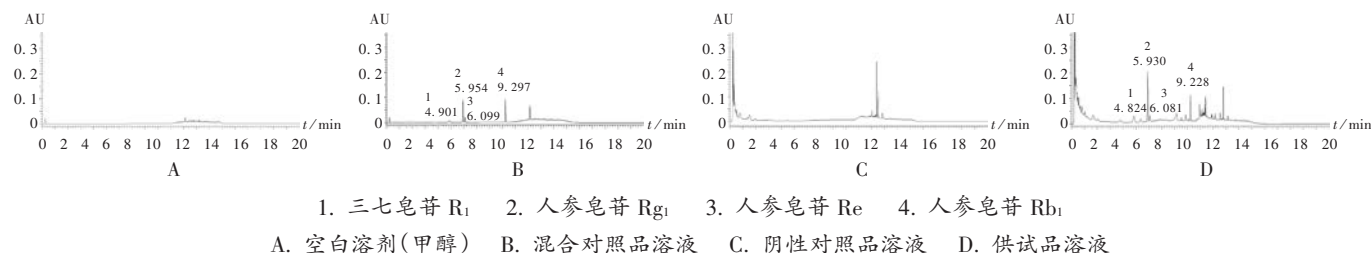


图 1 超高效液相色谱图

1. notoginsenoside R_1 2. ginsenoside R_{g1} 3. ginsenoside R_e 4. ginsenoside R_{b1}
A. Blank solvent(methanol) B. Mixed reference solution C. Negative reference solution D. Test solution

Fig. 1 UPLC chromatograms

表 3 颈舒颗粒中 4 种皂苷成分的加样回收试验结果 ($n=6$)
Tab. 3 Results of the recovery test of four saponins in Jingshu Granules ($n=6$)

取样量 (g)	样品含量(mg)				加入量(mg)				测得量(mg)				回收率(%)				$\bar{X}$ (%)				RSD(%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1.003 1	1.130 2	2.758 5	0.672 1	1.340 8	1.218 0	2.721 0	0.687 0	1.398 0	2.389 4	5.468 5	1.352 0	2.771 5	103.38	99.60	98.97	102.34								
0.987 6	1.112 7	2.715 9	0.661 7	1.320 1	1.218 0	2.721 0	0.687 0	1.398 0	2.332 8	5.456 9	1.344 0	2.733 3	100.17	100.74	99.32	101.09								
0.992 3	1.118 0	2.728 8	0.664 8	1.326 4	1.218 0	2.721 0	0.687 0	1.398 0	2.337 0	5.439 8	1.341 1	2.726 1	100.08	99.63	98.44	100.12	101.23	100.29	99.31	101.36	1.25	0.89	1.34	1.32
1.000 9	1.127 7	2.752 5	0.670 6	1.337 9	1.218 0	2.721 0	0.687 0	1.398 0	2.370 2	5.506 6	1.358 4	2.753 3	102.01	101.22	100.12	101.24								
1.004 5	1.317 4	2.762 4	0.673 0	1.342 7	1.218 0	2.721 0	0.687 0	1.398 0	2.542 9	5.518 3	1.343 6	2.739 7	100.62	101.28	97.61	99.93								
0.999 2	1.125 8	2.747 8	0.669 5	1.335 6	1.218 0	2.721 0	0.687 0	1.398 0	2.357 7	5.448 8	1.366 2	2.781 6	101.14	99.26	101.41	103.43								

注:A 为三七皂苷 R_1 , B 为人参皂苷 R_{g1} , C 为人参皂苷 R_e , D 为人参皂苷 R_{b1} 。表 4 同。

Note: A is notoginsenoside R_1 , B is ginsenoside R_{g1} , C is ginsenoside R_e , D is ginsenoside R_{b1} , as well as Tab. 4.

稳定性试验:精密量取 2.2 项下供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于 0, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h 时进样测定。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 峰面积的 RSD 分别为 1.08%, 1.44%, 0.96%, 1.87% ($n=7$), 表明供试品溶液中 4 种皂苷成分在室温下 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品(批号为 200212)适量,精密称定,共 5 份,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{b1} 、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 峰面积的 RSD 分别为 0.34%, 0.41%, 0.19%, 0.84% ($n=5$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 200212) 1.0 g,精密称定,共 6 份,加入混合对照品溶液(三七皂苷 R_1 0.406 mg/mL、人参皂苷 R_{g1} 0.907 mg/mL、人参皂苷 R_e 0.229 mg/mL、人参皂苷 R_{b1} 0.466 mg/mL) 3 mL,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 3。

2.4 高效液相色谱(HPLC)法比较

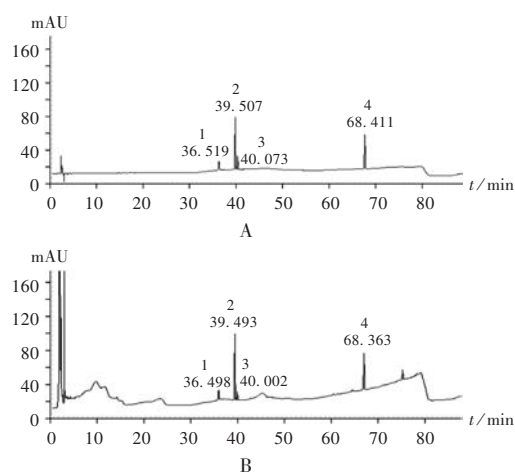
取 2.2 项下混合对照品溶液和供试品溶液,按颈舒颗粒含量测定三七项下的色谱条件^[1]进样分析。色谱柱采用 CAPCELL PAK C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m)。结果供试品溶液中 4 个主成分色谱峰与混合对照品溶液中 4 个主成分色谱峰保留时间一致,且在 70 min 内完全分离,分离度均大于 1.5。色谱图见图 2。

2.5 样品中皂苷类成分含量测定

取样品 3 批(批号分别为 200212, 191206, 200403),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下和 2.4 项下色谱条件测定样品中 4 种皂苷类成分的含量,再与 2015 年版《中国药典(一部)》颈舒颗粒三七含量测定项下的色谱条件和供试品溶液前处理方法测定结果进行比较。结果见表 4。

3 讨论

原标准中乙醚脱脂静置 12 h 时间过长。参考文



1. 三七皂苷 R_1 2. 人参皂苷 R_{g1} 3. 人参皂苷 R_e
4. 人参皂苷 R_{b1}

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图 2 高效液相色谱图(203 nm)

1. notoginsenoside R_1 2. ginsenoside R_{g1}
3. ginsenoside R_e 4. ginsenoside R_{b1}

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms(203 nm)

表 4 3 种方法测定颈舒颗粒中 4 种皂苷类成分的含量(mg)

Tab. 4 Content determination of four saponins in each bag of Jingshu Granules determined by three methods(mg)

批号	HPLC 法				UPLC 法				《中国药典》方法	
	A	B	C	D	A	B	C	D	B	D
200212	6.63	16.44	4.04	7.99	6.76	16.50	4.02	8.02	12.36	6.42
191206	8.06	17.39	4.41	8.32	8.07	17.33	4.43	8.36	13.61	7.04
200403	7.42	17.01	4.23	8.16	7.44	17.10	4.26	8.22	12.73	6.02

献[10-16],曾对比乙醚静置、超声和加热回流脱脂后甲醇提取方法,综合考虑采用甲醇超声处理。结果人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 的提取效率均高于 2015 年版《中国药典(一部)》颈舒颗粒三七含量测定项下的样品前处理方法。

用甲醇超声提取后直接进样分析,在三七皂苷 R_1 峰处和人参皂苷 R_{b1} 峰处杂质峰太多,影响分离度。将