

HPLC-DAD 法测定益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁

王怀斌¹, 刘春², 李明杰^{1*}

1. 三二〇一医院 药学部, 陕西 汉中 723000

2. 三二〇一医院 质控科, 陕西 汉中 723000

摘要: 目的 建立 HPLC-DAD 法同时测定益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 的方法。方法 采用 Agilent Eclipse Zorbax XDB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 磷酸溶液 - 乙腈, 梯度洗脱; 检测器: DAD 检测器; 检测波长: 203 nm (人参皂苷 Rb₁)、249 nm (五味子醇甲)、321 nm (3,6'-二芥子酰基蔗糖); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL。结果 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 分别在 0.193~19.300、0.299~29.910、0.189~188.600 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率分别为 99.5%、99.7%、98.3%, RSD 值分别为 1.2%、1.1%、0.7%。结论 本法简便、准确、快速, 适用于益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 的测定, 为完善该产品的质量

标准完善提供参考。

关键词: 益脑胶囊; 3,6'-二芥子酰基蔗糖; 五味子醇甲; 人参皂苷 Rb₁; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)09-1997-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.015

Determination of 3,6'-dimustard acyl sucrose, schisandrin A, and ginsenoside Rb₁ in Yinao Capsules by HPLC-DAD

WANG Huai-bin¹, LIU Chun², LI Ming-jie¹

1. Department of Pharmacy, 3201 Hospital, Hanzhong 723000, China

2. Quality Control Center, 3201 Hospital, Hanzhong 723000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method to simultaneously determine the contents of 3,6'-dimustard acyl sucrose, schisandrin A, and ginsenoside Rb₁ in Yinao Capsules. **Methods** The separation was carried out on Agilent Eclipse Zorbax XDB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Detector was used as DAD detector. The mobile phase was 0.1% phosphoric acid solution - acetonitrile with gradient elution. The detection wavelength was set at 321 nm (3,6'-dimustard acyl sucrose), 249 nm (schisandrin A), and 203 nm (ginsenoside Rb₁). The volume flow was 1.0 mL/min, column temperature was room temperature, and injection volume was 10 μL. **Results** There had good linear relationships for 3,6'-dimustard acyl sucrose, schisandrin A, and ginsenoside Rb₁ within the ranges of 0.193 — 19.300, 0.299 — 29.910, and 0.189 — 188.600 μg/mL, whose average recoveries were 99.5%, 99.7%, and 98.3% with RSD values of 1.2%, 1.1%, and 0.7%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and rapid, which is suitable for the quality control for Yinao Capsules, and provides reference for improvement of quality control of the product.

Key words: Yinao Capsules; 3,6'-dimustard acyl sucrose; schisandrin; ginsenoside Rb₁; HPLC-DAD

随着我国经济、社会的不断发展, 越来越多的人出现神经衰弱、体倦头晕、失眠多梦等症状。益脑胶囊具有补气养阴、滋肾健脑、益智安神的功效, 常用于治疗神经衰弱、脑动脉硬化引起的体倦头晕、失眠多梦、记忆力减退等症, 尤其适合心肝

肾不足, 气、阴两虚患者^[1-3]。益脑胶囊由龟甲胶、远志、五味子、人参等 10 味中药制成^[4-6], 在临床上的使用也越来越多, 为保障广大患者的用药安全, 有必要提高该产品的质量控制水平^[7]。益脑胶囊收载于《卫生部药品标准中药成方制剂第五册》,

收稿日期: 2022-04-19

作者简介: 王怀斌 (1991—), 男, 陕西旬阳人, 临床药师, 本科, 研究方向为药学。E-mail: 3636774098@qq.com

*通信作者: 李明杰, 男, 副主任药师。E-mail: ajcl2k@163.com

现行质量标准中,只有性状、鉴别和检查项,无含量测定项目。《中国药典》2020 年版一部中,远志通过检测细叶远志皂苷、远志呋喃糖苷和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的进行质量控制,五味子通过检测五味子醇甲进行质量控制,人参通过控制人参皂苷 Rg_1 、 Re 总量和人参皂苷 Rb_1 进行质量控制^[8-9]。为了有效控制益脑胶囊的质量,本实验建立 HPLC-DAD 法同时测定益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 的方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695B 型液相色谱仪,配备 Waters 2998 型二极管阵列检测器、EMPOWER 6.0 工作站(美国 Waters 公司);Mettler-Toledo AE 200S 型万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ-300GVDA 型超声波仪(昆山舒美生物科技公司);Milli-Q advantage A10 型纯水器(美国密理博科技有限公司)。

3,6'-二芥子酰基蔗糖(质量分数以 96.5%计,批号 111848-202006)、五味子醇甲(质量分数以 99.7%计,批号 110857-201815)、人参皂苷 Rb_1 (质量分数以 94.3%计,批号 110704-202129)对照品均购于中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇(HPLC 级,购自默克试剂公司);超纯水,其他试剂均为分析纯(上海化学试剂厂);益脑胶囊(广州中一药业有限公司,规格 0.3 g/粒,批号 220104、220206、220225)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse Zorbax XDB C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~7 min, 11% B; 7~10 min, 11%~24% B; 10~14 min, 24%~71% B; 14~18 min, 71%~83% B; 18~24 min, 83%~92% B; 24~28 min, 92% B);检测器:DAD 检测器;检测波长:203 nm(人参皂苷 Rb_1)、249 nm(五味子醇甲)、321 nm(3,6'-二芥子酰基蔗糖);体积流量:1.0 mL/min;柱温:室温;进样量:10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液 分别取 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 对照品适量,分别置 3 个棕色量瓶中,用甲醇制成 3,6'-二芥子酰基蔗糖 193.0 μ g/mL、五味子醇甲 299.1 μ g/mL 和人参皂

苷 Rb_1 188.6 μ g/mL 的对照品储备液。

2.2.2 混合对照品溶液 取 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 对照品储备液,分别准确吸取 1.0 mL,置一支 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(含 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 质量浓度分别为 19.30、29.91、18.86 μ g/mL)。

2.2.3 供试品溶液 取益脑胶囊 20 粒,去除胶囊壳,内容物研细,取约 1.0 g,准确称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇约 20 mL,超声提取 20 min(功率 200 W,频率 65 kHz),放冷,用甲醇定容,摇匀,0.45 μ m 滤膜滤过,弃去初滤液,续滤液,即得。

2.2.4 阴性样品溶液 按益脑胶囊质量标准中的处方和制备方法分别制备不含远志、五味子和人参的阴性样品,按供试品溶液的制备项下方法制成相应的阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

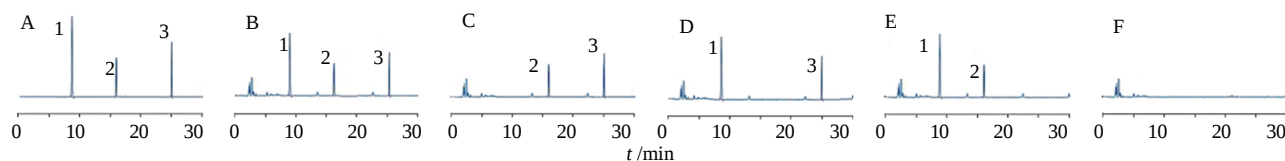
取混合对照品、供试品和阴性样品溶液,分别进样 10 μ L,采集色谱图。结果在与对照品溶液谱图中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 相应的保留时间位置上,供试品溶液谱图中均有相对应的吸收峰;在阴性样品溶液中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 色谱峰对应位置无干扰峰;3 种待测物分离良好,理论塔板数均大于 2 000。见图 1。

2.4 线性关系考察

取 193.0 μ g/mL 3,6'-二芥子酰基蔗糖、299.1 μ g/mL 五味子醇甲和 188.6 μ g/mL 人参皂苷 Rb_1 对照品储备液,分别准确移取 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mL,置 5 个 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得标准曲线系列溶液,分别进样 10 μ L,采集色谱图。根据谱图中峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标进行线性拟合,计算标准曲线方程,见表 1。

2.5 精密度试验

取对照品溶液(其中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 质量浓度分别为 19.30、29.91、18.86 μ g/mL),连续进样 6 次,采集色谱图。根据谱图中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 峰面积计算,结果 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb_1 峰面积的 RSD 值分别为 1.2%、1.1%、1.3%。



1-3,6'-二芥子酰基蔗糖 2-五味子醇甲 3-人参皂苷 Rb₁
1-3,6'-dimustard acyl sucrose 2-schizandrin 3-ginsenoside Rb₁

图 1 对照品 (A)、益脑胶囊 (B)、缺远志阴性样品 (C)、缺五味子阴性样品 (D)、缺人参阴性样品 (E)、缺远志、五味子和人参药材阴性样品 (F) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A), Yiniao Capsules (B), negative sample without *Polygalae Radix* (C), negative sample without *Schisandrae Chinensis Fructus* (D), negative sample without *Ginseng Radix* (E), negative sample without *Polygalae Radix*, *Schisandrae Chinensis Fructus*, and *Ginseng Radix* (F)

表 1 标准曲线方程、相关系数和线性范围

Table 1 Standard curve equation, correlation coefficient, and linear range

成分	标准曲线方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
3,6'-二芥子酰基蔗糖	$Y=31.64 X+17.51$	0.999 5	0.193~19.300
五味子醇甲	$Y=9.80 X+11.95$	0.998 9	0.299~29.910
人参皂苷 Rb ₁	$Y=23.12 X+18.78$	0.999 0	0.189~188.600

2.6 稳定性试验

取益脑胶囊 (批号 220104) 样品, 制备供试品溶液, 在溶液放置 0、2、4、8、16、24 h 后分别取样, 采集色谱图。根据谱图中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 峰面积计算, 结果 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 峰面积的 RSD 值分别为 1.4%、1.2%、0.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批号 220104 益脑胶囊样品 6 份, 制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 采集色谱图。根据谱图中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 峰面积计算质量分数。结果 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 质量分数的 RSD 值分别为 1.2%、2.3%、2.0%。

2.8 回收率试验

取批号 220104 益脑胶囊样品内容物 6 份, 每份约 0.5 g, 准确称定, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入 193.0 $\mu\text{g/mL}$ 3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品储备液 1.0 mL、299.1 $\mu\text{g/mL}$ 五味子醇甲对照品储备液 0.4 mL、188.6 $\mu\text{g/mL}$ 人参皂苷 Rb₁ 0.4 mL, 制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 采集色谱图, 计算回收率。结果 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 平均回收率分别为 99.5%、99.7%、98.3%,

RSD 值分别为 1.2%、1.1%、0.7%。

2.9 样品测定

取益脑胶囊样品, 制备供试品溶液, 平行制备 2 份, 分别进样 10 μL , 采集色谱图, 外标法计算益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 的质量分数, 结果见表 2。

表 2 益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 的测定结果 ($n=2$)

Table 2 Determination of 3,6'-dimustard acyl sucrose, schizandrin A, and ginsenoside Rb₁ in Yiniao Capsules ($n=2$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	3,6'-二芥子酰基蔗糖	五味子醇甲	人参皂苷 Rb ₁
220104	0.333 9	0.205 9	0.141 8
220206	0.327 5	0.218 2	0.137 4
220225	0.341 7	0.199 1	0.150 6

3 讨论

3.1 检测波长的确定

实验选取益脑胶囊组成中的远志、五味子和人参 3 种中药, 通过控制这 3 种中药中活性成分作为其质量控制指标。取 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液, 进样 10 μL 注入

仪器, 设置波长扫描为 190~500 nm, 采集 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 光谱图, 结果 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 最大吸收波长依次为 321、249、203 nm, 3 种成分的最大吸收波长差异较大, 因此不能采取单一波长进行测定。为了提高检测效率, 实验采用波长切换技术, 在同一色谱条件下, 分别在 3 种成分最大吸收波长处测定, 即波长切换法检测益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁。

3.2 流动相的选择

中药中活性成分检测常用的流动相体系有甲醇、乙腈体系, 其中乙腈紫外最大吸收截止波长约在 190 nm, 甲醇紫外最大吸收截止波长约在 210 nm。本实验检测的益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁, 其中人参皂苷 Rb₁ 最大吸收波长在 203 nm 附近, 因此甲醇体系不适用。实验分别采用乙腈-0.1%磷酸溶液和乙腈-水体系作为流动相体系考察 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 分离和基质干扰的影响情况。结果选择乙腈-水体系时, 3,6'-二芥子酰基蔗糖色谱峰型较差, 定量准确性较低; 选择乙腈-0.1%磷酸溶液时, 3 种成分分离良好, 无基质干扰, 且分析时间较短。故实验选择乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相体系。

3.3 前处理条件优化

益脑胶囊系由龟甲胶、远志、五味子、人参等 10 味中药组成, 药材种类较多, 基质复杂。为了提高检测准确度和缩短分析时间, 有必要对前处理方法进行优化。取益脑胶囊样品, 制备供试品溶液, 分别设置提取溶剂为甲醇、90%甲醇和 75%甲醇时, 考察对 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 3 种成分提取的影响, 再分别考察超声功率(180、200、220 W)和提取时间(15、20、25 min)

的影响, 结果选择甲醇作为提取剂, 超声功率设置 200 W, 时间 20 min 为最佳提取条件。

实验建立了益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 3 种成分同时 HPLC-DAD 测定的分析方法。针对益脑胶囊中 10 味药材组成进行了研究, 确定选择远志、五味子和人参 3 种中药中活性成分为研究对象, 优化了提取条件、检测波长和流动相体系, 并对建立的方法进行了系统的方法学验证。结果表明, 本法简便、准确、快速, 适用于益脑胶囊中 3,6'-二芥子酰基蔗糖、五味子醇甲和人参皂苷 Rb₁ 的测定, 为该产品的质量控制在完善提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈晓燕, 虞蓓丽, 梁城英, 等. 益脑胶囊联合利培酮治疗精神分裂症 48 例疗效观察 [J]. 新中医, 2017, 49(1): 33-36.
- [2] 龚考玲. 奥拉西坦与益脑胶囊治疗血管性认知功能障碍临床疗效比较 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2015, 18(20): 100-101.
- [3] 李兰琼, 丁明甫. 针刺法联合益脑胶囊改善轻度认知障碍临床观察 [J]. 新中医, 2015, 47(7): 252-253.
- [4] 姚辛敏, 周晓洁, 周妍妍, 等. 远志化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(2): 103-107.
- [5] 刘晓明, 雷蓉, 刘永利, 等. HPLC 同时测定益脑胶囊中五味子醇甲和五味子乙素的含量 [J]. 中国医药科学, 2015, 5(9): 52-54.
- [6] 胡瀚文, 郑振兴, 黄碧君, 等. HPLC-CAD 测定大叶三七叶中人参皂苷 Rb₁ 的含量 [J]. 中药与临床, 2020, 11(2): 10-12.
- [7] 柳刚. 益脑胶囊治疗神经衰弱的临床效果分析 [J]. 中国医药指南, 2015, 13(4): 228-229.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 163-164.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 68, 8-9.

[责任编辑 解学星]