

HPLC法同时测定还少胶囊中4种成分的含量^Δ

周祥德^{1*}, 黄小兰¹, 阳文武¹, 黎海灵², 周 浓^{2#}, 邹隆琼³, 王 立³(1.重庆市万州食品药品检验所, 重庆 404047; 2.重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404120; 3.重庆三峡云海药业股份有限公司, 重庆 404500)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)20-2508-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.20.14

摘 要 目的:建立同时测定还少胶囊中莫诺苷、马钱苷、松果菊苷和毛蕊花糖苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为中谱红RD-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为240 nm(莫诺苷、马钱苷)、330 nm(松果菊苷、毛蕊花糖苷),流速为1.0 mL/min,柱温为35 ℃,进样量为10 μL。结果:莫诺苷、马钱苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷检测质量浓度的线性范围分别为5.29~105.80、4.49~89.88、16.26~325.25、16.31~326.25 μg/mL(*r*均为0.999 9);精密度、稳定性(24 h)、重复性、耐用性试验的RSD均小于2.0%;加样回收率分别为94.34%~96.23%(RSD=0.81%,*n*=6)、97.04%~98.89%(RSD=0.73%,*n*=6)、96.23%~98.08%(RSD=0.82%,*n*=6)、95.40%~98.47%(RSD=1.23%,*n*=6)。11批还少胶囊中上述4种成分的含量分别为0.190~0.704、0.439~0.857、2.723~4.475、0.589~1.035 mg/g。结论:所建方法专属性强、精密度好,可用于还少胶囊中4种成分的含量测定。

关键词 还少胶囊;高效液相色谱法;莫诺苷;马钱苷;松果菊苷;毛蕊花糖苷;含量测定

Simultaneous Determination of 4 Components in Huanshao Capsules by HPLC
ZHOU Xiangde¹, HUANG Xiaolan¹, YANG Wenwu¹, LI Hailing², ZHOU Nong², ZOU Longqiong³, WANG Li³(1. Chongqing Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing 404047, China; 2. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404120, China; 3. Chongqing Three Gorges Yunhai Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 404500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of morroniside, loganin, echinacoside and acteoside in Huanshao capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Zhongpuhong RD-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 240 nm (morroniside, loganin) and 330 nm (echinacoside, acteoside). The column temperature was set at 35 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range were 5.29-105.80 μg/mL for morroniside, 4.49-89.88 mg/L for loganin, 16.26-325.25 mg/L for echinacoside and 16.31-326.25 mg/L for acteoside, *r* values were 0.999 9. RSDs of precision, stability (24 h), reproducibility and durability tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 94.34%-96.23% (RSD=0.81%, *n*=6), 97.04%-98.89% (RSD=0.73%, *n*=6), 96.23%-98.08% (RSD=0.82%, *n*=6), 95.40%-98.47% (RSD=1.23%, *n*=6), respectively. The contents of above 4 components in 11 batches of Huanshao Capsules were 0.190-0.704, 0.439-0.857, 2.723-4.475 and 0.589-1.035 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: Established method is specific, precise and can be used for content determination of 4 components in Huanshao capsules.

KEYWORDS Huanshao capsules; HPLC; Morroniside; Loganin; Echinacoside; Acteoside; Content determination

还少胶囊由熟地黄、山茱萸、肉苁蓉、杜仲、五味子等15味中药材组成,具有温肾补脾、养血益精之功效,临床主要用于治疗脾肾虚损、腰膝酸痛、阳萎遗精、精血亏耗等症^[1]。有研究发现,还少胶囊对勃起功能障碍、月经不调、弱精子症、早泄等症的治疗效果显著^[2-5]。熟地黄为方中君药,具有补血滋阴、益精填髓之功效,而苯丙素

苷类化合物是熟地黄的活性成分,以毛蕊花糖苷含量最高^[6],且2015年版《中国药典》(一部)中规定“按熟地黄干燥品计,毛蕊花糖苷(以C₂₉H₃₆O₁₅计)不得少于0.020%”^[7]。山茱萸、肉苁蓉为方中臣药,前者具补益肝肾、收涩固脱之功,环烯醚萜糖苷类化合物是山茱萸的主要有效成分,并以莫诺苷和马钱苷为代表^[8-9];后者补肾阳、益精血,主要活性成分为松果菊苷和毛蕊花糖苷^[10],均在2015年版《中国药典》(一部)中有记载^[7]。

现行《国家食品药品监督管理局标准(试行)》中,仅规定还少胶囊“每粒含五味子以五味子甲素(C₂₄H₃₂O₆)计,不得少于0.04 mg”^[1],而未对方中君/臣药的有效成分进行控制。由于中药制剂成分复杂,对单一成分进行检

^Δ 基金项目:重庆市基础研究与前沿探索项目(重庆市自然科学基金)(No.cstc2018jcyjAX0267)
* 高级工程师。研究方向:药品食品质量控制与评价。电话:023-58152381。E-mail:oyww2008@163.com
通信作者:教授,硕士。研究方向:药品质量评价。电话:023-52985997。E-mail:erhaizn@126.com

测无法全面评价药物的质量,因此为了提高该药的质量、保证用药的安全有效,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了还少胶囊中莫诺苷、马钱苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量,以期为全面评价该药质量、提高其质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括LC-20AT型四元泵、SIL-20A型进样器、SPD-20A型检测器、CTO-20A型柱温箱(日本Shimadzu公司);Agilent 1260型HPLC仪,包括G1311C型四元泵、G1329B型进样器、G1316A型柱温箱、G1314F型检测器(美国Agilent公司);AB204A/S型万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);KH-2000DB型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);SCI-20-D型超纯水机(重庆科润水处理设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

莫诺苷对照品(批号:MRS-106634,纯度:100%)购自美国Stanford公司;马钱苷对照品(批号:111640-201707,纯度:99.2%)、松果菊苷对照品(批号:111670-200503,纯度:100%)、毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-201713,纯度:92.5%)均购自中国食品药品检定研究院;甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。11批还少胶囊(重庆三峡云海药业股份有限公司,批号:170602No·058,规格:0.42 g/粒;批号:180601No·132,规格:0.38 g/粒;批号:181101No·004,规格:0.38 g/粒;批号:181205,规格:0.38 g/粒;批号:190101No·081,规格:0.38 g/粒;批号:190602No·035,规格:0.42 g/粒;批号:190802No·003,规格:0.38 g/粒;批号:190903No·101,规格:0.42 g/粒;批号:191005,规格:0.42 g/粒;批号:191006,规格:0.42 g/粒;批号:191007,规格:0.42 g/粒)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:中谱红RD-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min,10% A;10~20 min,10% A→15% A;20~50 min,15% A);检测波长:240 nm(莫诺苷、马钱苷)、330 nm(松果菊苷、毛蕊花糖苷);流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 称取莫诺苷对照品0.010 58 g、马钱苷对照品0.009 06 g,分别置于25 mL量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,得莫诺苷、马钱苷质量浓度分别为0.423 2、0.359 5 mg/mL的单一对照品母液;另称取松果菊苷对照品0.013 01 g、毛蕊花糖苷对照品0.014 11 g,分别置于10 mL量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,得松果菊苷、毛蕊花糖苷质量浓度分别为1.301、1.305 mg/mL的单一对照品母液。吸取上述各单

一对照品母液5 mL,置于20 mL量瓶中,摇匀,即得莫诺苷、马钱苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷质量浓度分别为105.80、89.88、325.25、326.25 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品10粒,研细,混合均匀,精密称取粉末1.0 g,置于三角瓶中,用移液管加入50%甲醇20 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)处理30 min,放至室温后,再次称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 参照还少胶囊的配方比例和制备工艺,制备缺山茱萸、熟地黄和肉苁蓉的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 专属性考察

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,各成分峰形较好且均能达到基线分离,分离度均大于1.5;理论板数按莫诺苷峰计均不低于8 000;阴性样品对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL,分别置于5 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列线性工作溶液。取上述工作溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以各成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

2.5 精密度试验

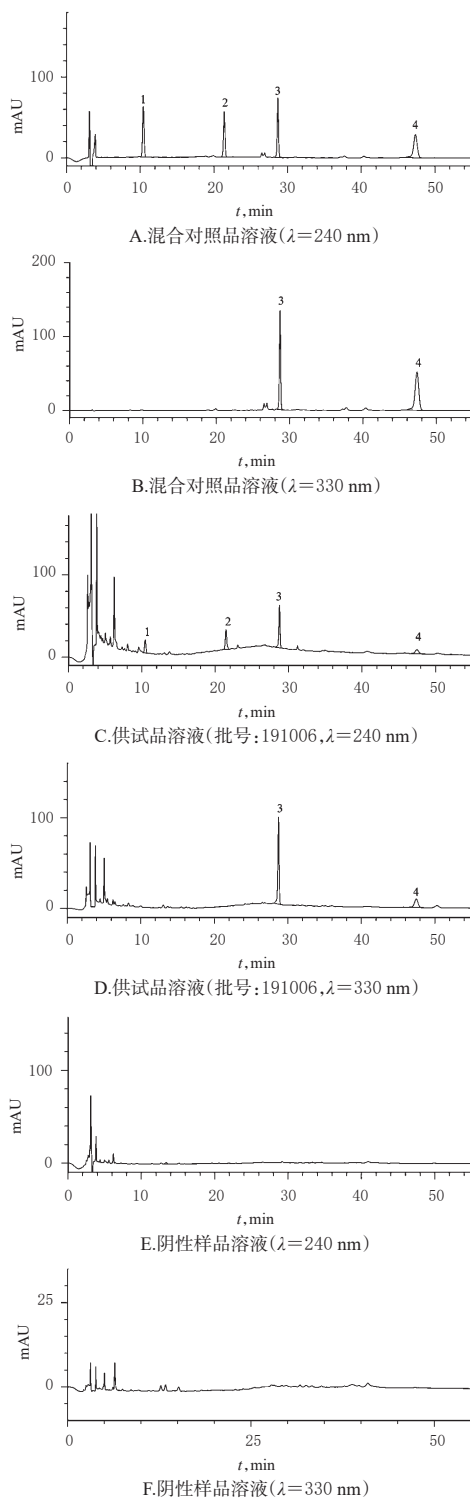
取“2.4”项下线性工作溶液(莫诺苷、马钱苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷的质量浓度分别为21.16、17.96、65.04、65.24 μg/mL)适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,莫诺苷、马钱苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为0.46%、0.53%、0.62%、0.66%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:191006)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,莫诺苷、马钱苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为0.82%、0.39%、0.48%、0.69%($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取还少胶囊粉末(批号:191006)1.0 g,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中4种成分的含量。结果,莫诺苷、马钱苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷的平均含量分别为0.441、0.585、2.886、0.721 mg/g, RSD分别为0.52%、0.75%、0.49%、0.83%($n=6$),表明方法重复性良好。



注: 1. 莫诺昔; 2. 马钱昔; 3. 松果菊昔; 4. 毛蕊花糖昔
Note: 1. morroniside; 2. loganin; 3. echinacoside; 4. acteoside

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量(含莫诺昔 0.441 mg/g、马钱昔 0.585 mg/g、松果菊昔 2.886 mg/g、毛蕊花糖昔 0.721 mg/g)的还少胶囊粉末(批号: 191006) 0.5 g, 共 6 份, 精密加入“2.2.1”项下各单一对照品母液(莫诺昔 0.50 mL、马钱昔

0.75 mL、松果菊昔 1.00 mL、毛蕊花糖昔 0.25 mL), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表 2。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	线性范围, $\mu\text{g/mL}$	r
莫诺昔	$Y=8\ 639X-2\ 824$	5.29~105.80	0.999 9
马钱昔	$Y=8\ 829X-1\ 097$	4.49~89.88	0.999 9
松果菊昔	$Y=4\ 858X-2\ 502$	16.26~325.25	0.999 9
毛蕊花糖昔	$Y=5\ 738X-2\ 392$	16.31~326.25	0.999 9

表 2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
莫诺昔	0.221	0.212	0.423	95.28	95.44	0.81
	0.221	0.212	0.422	94.81		
	0.222	0.212	0.426	96.23		
	0.220	0.212	0.420	94.34		
	0.221	0.212	0.425	96.23		
	0.221	0.212	0.424	95.75		
马钱昔	0.293	0.270	0.560	98.89	98.09	0.73
	0.293	0.270	0.559	98.52		
	0.295	0.270	0.561	98.52		
	0.292	0.270	0.557	98.15		
	0.294	0.270	0.557	97.41		
	0.293	0.270	0.555	97.04		
松果菊昔	1.443	1.301	2.716	97.85	97.17	0.82
	1.448	1.301	2.719	97.69		
	1.453	1.301	2.705	96.23		
	1.442	1.301	2.701	96.77		
	1.449	1.301	2.703	96.39		
	1.444	1.301	2.720	98.08		
毛蕊花糖昔	0.361	0.326	0.676	96.63	97.14	1.23
	0.362	0.326	0.673	95.40		
	0.363	0.326	0.680	97.24		
	0.360	0.326	0.681	98.47		
	0.362	0.326	0.677	96.63		
	0.361	0.326	0.682	98.47		

2.9 耐用性试验

精密称取还少胶囊粉末(批号: 191006)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件以不同色谱仪(Shimadzu LC-20AT 和 Agilent 1260)、不同色谱柱(中谱红 RD-C₁₈、Waters C₁₈)、不同流速(0.9、1.0 mL/min)、不同柱温(30、35 $^{\circ}\text{C}$)进样测定, 各条件平行操作 3 次, 记录峰面积并按外标法计算样品中 4 种成分的含量, 结果见表 3。结果, 4 种成分含量的 RSD 均小于 2.0% ($n=3$), 表明方法耐用性良好。

2.10 样品含量测定

取 11 批还少胶囊样品适量, 研细, 混合均匀, 精密称取 1.0 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按外标法计算样品中 4 种成分的含量。每样品平行操作 3 次, 结果见表 4。

表3 耐用性试验结果(n=3)

Tab 3 Results of durability tests(n=3)

仪器	色谱柱	流速, mL/min	柱温, ℃	莫诺昔		马钱昔		松果菊昔		毛蕊花糖昔	
				含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %
LC-20AT	中谱红RD-C ₁₈	0.9	30	0.450	0.95	0.572	0.88	2.889	0.80	0.716	1.07
		0.9	35	0.424	0.89	0.562	0.95	2.896	0.72	0.711	1.11
		1.0	30	0.432	0.66	0.589	0.79	2.855	0.94	0.712	1.14
		1.0	35	0.441	0.45	0.585	0.72	2.886	0.44	0.721	0.79
	Waters C ₁₈	0.9	30	0.426	1.22	0.581	1.00	2.857	0.73	0.729	1.57
		0.9	35	0.417	1.52	0.573	1.15	2.858	1.02	0.733	1.66
		1.0	30	0.435	1.14	0.566	1.26	2.881	0.93	0.719	1.42
		1.0	35	0.454	1.32	0.561	0.82	2.877	0.85	0.717	1.49
Agilent1260	中谱红RD-C ₁₈	0.9	30	0.422	1.05	0.592	1.09	2.868	0.79	0.741	0.97
		0.9	35	0.421	0.99	0.592	1.14	2.848	0.81	0.739	1.12
		1.0	30	0.419	0.92	0.579	1.42	2.853	0.78	0.726	0.94
		1.0	35	0.421	0.88	0.569	1.27	2.850	0.76	0.727	0.92
	Waters C ₁₈	0.9	30	0.415	1.08	0.571	1.53	2.872	0.98	0.740	1.71
		0.9	35	0.418	0.94	0.566	1.29	2.866	1.06	0.738	1.62
		1.0	30	0.433	1.42	0.559	1.31	2.899	0.97	0.715	1.53
		1.0	35	0.438	1.01	0.568	1.04	2.897	0.92	0.713	1.49

表4 样品含量测定结果(mg/g,n=3)

Tab 4 Results of content determination of samples (mg/g,n=3)

批号	莫诺昔	马钱昔	松果菊昔	毛蕊花糖昔
170602No-058	0.392	0.523	2.755	0.642
180601No-132	0.190	0.766	3.194	0.818
181101No-004	0.236	0.631	3.864	0.822
181205	0.329	0.439	2.829	0.712
190101No-081	0.193	0.619	3.965	0.962
190602No-035	0.433	0.701	4.391	0.965
190802No-003	0.256	0.857	4.475	1.035
190903No-101	0.704	0.625	3.885	0.966
191005	0.493	0.617	3.114	0.661
191006	0.441	0.585	2.886	0.721
191007	0.453	0.616	2.723	0.589
平均值	0.375	0.636	3.489	0.808

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本研究前期对不同色谱柱(中谱红 RD-C₁₈、迪马 C₁₈、塞分 C₁₈、Waters C₁₈)、柱温(30、35℃)、进样量(10、15、20 μL)、流速(0.9、1.0 mL/min)以及流动相体系(乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%醋酸水溶液、乙腈-0.3%磷酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液)进行了考察。结果发现,采用本研究中“2.1”项下色谱条件分析样品时,各成分分离度良好且峰形对称。同时,采用二极管阵列检测器在190~800 nm全波长范围内进行扫描。结果发现,莫诺昔、马钱昔在240 nm波长附近有最大吸收,在330 nm波长处没有吸收;松果菊昔、毛蕊花糖昔在330 nm波长附近有最大吸收,在240 nm波长处吸收较小,且毛蕊花糖昔峰高较低,基线噪音影响较大。为保证各待测成分能得到较好的响应并减少干扰峰,最终确定莫诺昔、马钱昔的检测波长为240 nm,松果菊昔、毛蕊花糖昔的检测波长为330 nm。

3.2 提取条件的确定

本研究前期对不同提取溶剂(水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇、乙醇)、浸泡时间(0、30、40、60 min)、提取方式(超声、加热回流)、超声处理时间(20、30、40、50 min)、称样量(0.5、1.0、1.5 g)进行了考察。结果发现,采用本研究中“2.2.2”项下条件处理时的提取效果最好。

3.3 含量分析

本研究结果发现,11批还少胶囊中4种成分平均含量的高低依次为松果菊昔>毛蕊花糖昔>马钱昔>莫诺昔;且不同批次还少胶囊中各成分的含量差异较大。笔者推测,这可能与缺乏相关药材的筛选指标致药材所含的有效成分含量存在差异^[11]、所用药材的品质参差不齐^[12]以及制备提取工艺不同^[6,13]等因素有关。

综上所述,所建方法专属性强、精密度好,可用于还少胶囊中4种成分的含量测定。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理局.国家食品药品监督管理局标准:试行YBZ27152005[S].2005-11-28.

[2] 耿强,傅强,张春和,等.还少胶囊治疗脾肾两虚型勃起功能障碍的多中心临床疗效观察[J].中华男科学杂志,2019,25(8):730-733.

[3] 孙建辉,霍海如,李小芹,等.还少胶囊治疗月经不调的药效学评价及分子机制研究[J].中国中药杂志,2018,43(7):1373-1383.

[4] 唐健生.还少胶囊治疗少弱精子症患者的安全性和有效性观察[J].中国医药科学,2019,9(23):83-85.

[5] 吴小伟,曾玉燕.还少胶囊联合盐酸帕罗西汀治疗早泄临床观察[J].实用中医药杂志,2019,35(1):80-81.

[6] 杨明明,袁晓旭,李洪波,等.熟地黄、山茱萸、茯苓单煎液与合煎液中毛蕊花糖昔、没食子酸煎出量的变化[J].中国药房,2017,28(31):4350-4354.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:125.

[8] 朱敏,刘志辉,姚毅,等.山萸肉炮制前后4种环烯醚萜苷类成分的含量变化研究[J].中国药房,2014,25(47):4464-4466.

[9] 相聪坤.山茱萸资源及活性成分研究进展[J].河北医药,2016,38(12):1886-1889.

[10] 王力伟,曹瑞,房永雨,等.UPLC-QQQMS法测定肉苁蓉中有效成分的含量[J].中药材,2017,40(2):295-300.

[11] 高妍,过立农,马双成,等.基于UPLC特征图谱及主要成分含量的3种肉苁蓉比较研究[J].中国中药杂志,2019,44(17):3749-3757.

[12] 徐瑾,杜欢,李琪,等.HPLC法同时测定六味木香丸中4种成分[J].中成药,2019,41(10):2315-2319.

[13] 孔征,毛乐静,霍仕霞,等.Box-Behnken响应面法优化管花肉苁蓉中毛蕊花糖昔的提取工艺研究[J].中国药房,2019,30(14):1970-1974.

(收稿日期:2020-06-14 修回日期:2020-08-27)
(编辑:陈 宏)