

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.039

高效液相色谱法测定复方斑蝥胶囊中4种活性成分含量

白宏, 何光照

(江苏省常州市第四人民医院药剂科, 江苏 常州 213032)

摘要:目的 建立测定复方斑蝥胶囊中马钱苷、特女贞苷、紫丁香苷和甘草苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温为 25 ℃, 检测波长为 235 nm, 进样量为 10 μL, 流动相为乙腈(A) - 0.3% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 8 min 时 5% A, 8 ~ 15 min 时 5% ~ 23% A, 15 ~ 28 min 时 23% ~ 73% A, 28 ~ 29 min 时 73% ~ 5% A, 29 ~ 35 min 时 5% A)。外标法定量检测。结果 马钱苷、紫丁香苷、甘草苷和特女贞苷质量浓度分别在 0.5 ~ 50, 2.5 ~ 250, 0.8 ~ 80, 2.0 ~ 200 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 加样回收率分别为 100.44%, 100.62%, 100.71%, 101.29%, RSD 分别为 2.92%, 2.25%, 3.19%, 3.05% (n=6)。结论 该方法操作简单、速度快、重复性好、检测结果准确, 可用于复方斑蝥胶囊的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 复方斑蝥胶囊; 马钱苷; 特女贞苷; 紫丁香苷; 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)09-0128-03

Determination of Four Active Components in Compound Banmao Capsules by HPLC

BAI Hong, HE Guangzhao

(Department of Pharmacy, Changzhou Fourth People's Hospital, Changzhou, Jiangsu, China 213032)

Abstract: Objective To develop a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for determination of loganin, nuezhenide, syringin and liquiritin in Compound Banmao Capsules. **Methods** Agilent Zorbax Eclipse plus C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was selected for separation, with column temperature setting at 25 ℃ and detection wavelength at 235 nm; the injection volume was 25 μL; acetonitrile was used as mobile phase A and 0.3% phosphoric acid solution as mobile phase B. Gradient elution procedure was as follows: 0-8 min 5% A, 8-15 min 5%-23% A, 15-28 min 23%-73% A, 28-29 min 73%~5% A, 29-35 min 5% A. External standard method was selected for quantitative detection. **Results** The contents of loganin, nuezhenide, syringin and liquiritin showed good linear relationships in the concentration range 0.5-50, 2.5-250, 0.8-80, 2.0-200 μg/mL. Sample recovery rates were 100.44%, 100.62%, 100.71%, 101.29%, RSDs were 2.92%, 2.25%, 3.19%, 3.05% (n=6). Test solution was stable within 24 h. **Conclusion** The method is simple in operation, fast in speed, good in repeatability and accurate in detection results, which can be used for the quality control of Compound Banmao Capsules.

Key words: high-performance liquid chromatography; Compound Banmao Capsules; loganin; nuezhenide; syringin; determination

复方斑蝥胶囊是以斑蝥、人参、黄芪、刺五加、三棱、半枝莲、莪术、山茱萸、女贞子、熊胆粉、甘草等药材经煎煮等工序加工制成的中成药,具有破血消瘀、攻毒蚀疮之功效,临床主要用于治疗原发性肝癌、肺癌、直肠癌、恶性淋巴瘤、妇科恶性肿瘤^[1-3]。方中刺五加益气健脾、补肾安神^[4-5],山茱萸补益肝肾、收涩固脱^[6-7],女贞子滋补肝肾、明目乌发^[8-9],甘草补脾益气、清热解毒^[10-11]。复方斑蝥胶囊收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第十七册)》(WS₃-B-3272-98),标准中仅有性状、鉴别、检查项,无针对方中中药成分的含量测定项;加强对复方斑蝥胶囊药物的质量控制,可有效保障广大人民群众用药安全,遏制不法分子制假、贩假行为^[12-13]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时检测复方斑蝥胶囊中马钱苷、特女贞苷、紫丁香苷和甘草苷4种活性成分含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:安捷伦 1260 型高效液相色谱仪,配备G1311C型四元泵、G1329B型自动进样器、G1316A型柱温箱和G1314F型紫外检测器(美国安捷伦公司);Sartorius

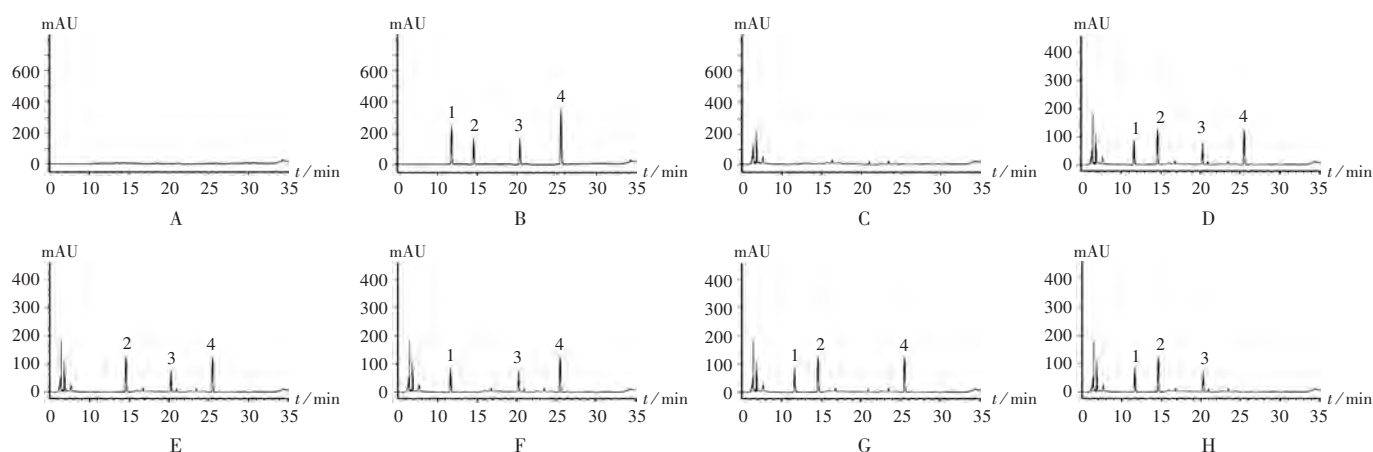
QUINTIX2102-1CN型电子分析天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);UV-8000A型双光束紫外可见分光光度计(上海元析仪器公司);Milli-Q IQ 7000型超纯水仪(美国密理博公司);KQ2200ES型超声波清洗器(昆山超声设备公司,功率为500 W,频率为100 kHz)。

试剂:马钱苷对照品(批号为111640-201808,含量为99.0%),特女贞苷对照品(批号为111926-201605,含量为93.3%),紫丁香苷对照品(批号为111574-201605,含量为95.2%),甘草苷对照品(批号为111610-201106,含量为93.7%),均购自中国食品药品检定研究院;复方斑蝥胶囊(陕西华西制药股份有限公司,国药准字Z20003270,批号分别为180924,190106,190417,规格为每粒0.25 g);甲醇、乙腈均为色谱纯(德国Merck公司);磷酸(分析纯,国药集团上海化学试剂厂);纯化水(自制);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm ×



1. 马钱苷 2. 紫丁香苷 3. 甘草苷 4. 特女贞苷

A. 试剂空白溶液 B. 对照品溶液 C. 阴性对照品溶液 D. 供试品溶液

E. 缺山茱萸阴性对照品溶液 F. 缺刺五加阴性对照品溶液 G. 缺甘草阴性对照品溶液 H. 缺女贞子阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

4.6 mm, 3.5 μ m); 检测波长: 235 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L; 流动相: 乙腈(A) - 0.3% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 8 min 时 5% A, 8 ~ 15 min 时 5% ~ 23% A, 15 ~ 28 min 时 23% ~ 73% A, 28 ~ 29 min 时 73% ~ 5% A, 29 ~ 35 min 时 5% A)。

2.2 溶液配制

混合对照品贮备溶液: 取马钱苷、特女贞苷、紫丁香苷、甘草苷对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 制备每 1 mL 溶液中含马钱苷 0.5 mg、特女贞苷 2.5 mg、紫丁香苷 0.8 mg、甘草苷 2.0 mg 的混合溶液, 加 85% 甲醇 20 mL 使溶解, 定容至刻度, 摇匀, 即得。

对照品溶液: 精密量取混合对照品贮备溶液 2.0 mL, 置 20 mL 容量瓶中, 加 85% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

供试品溶液: 取样品 20 粒, 倒出内容物, 混匀, 取约 1.0 g, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加 85% 甲醇 20 mL, 超声提取 25 min(超声功率为 300 W, 频率为 25 kHz), 放冷, 加 85% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照品溶液: 按处方分别制备缺刺五加、山茱萸、女贞子、甘草的阴性样品, 以及缺待测成分对应药材的阴性样品, 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: 分别取试剂空白溶液及 2.2 项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液, 按拟订色谱条件进样分析, 记录色谱图。结果阴性对照品溶液色谱图中, 在 4 种待测成分马钱苷、紫丁香苷、甘草苷、特女贞苷对应色谱峰位置无杂质干扰, 4 种待测成分分离度均符合《中国药典》要求。色谱图见图 1。

线性关系考察: 取 2.2 项下混合对照品贮备溶液适量, 稀释制成系列标准曲线溶液, 分别置 20 mL 容量瓶中, 加 85% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 按拟订色谱条件设

置仪器参数, 稳定后分别进样分析, 记录色谱图; 以质量浓度(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。

表 1 4 种活性成分线性范围、回归方程及相关系数

待测成分	线性范围(μ g/mL)	回归方程	相关系数(r^2)
马钱苷	0.5 ~ 50	$Y = 279.506X + 461.148$	0.999 5
紫丁香苷	2.5 ~ 250	$Y = 1156.183X + 1321.271$	0.999 1
甘草苷	0.8 ~ 80	$Y = 832.739X + 494.795$	0.999 2
特女贞苷	2.0 ~ 200	$Y = 1502.218X + 183.662$	0.999 4

精密密度试验: 取 2.2 项下对照品溶液, 按拟订色谱条件进样分析, 记录色谱图, 结果马钱苷、紫丁香苷、甘草苷、特女贞苷峰面积的 RSD 分别为 1.34%, 1.42%, 1.19%, 0.94% ($n = 6$), 表明仪器精密密度良好。

重复性试验: 取样品(批号为 180924)20 粒, 倒出内容物, 混匀, 取约 1.0 g, 精密称定, 共 6 份, 分别置 25 mL 容量瓶中, 依法制备供试品溶液; 按拟订色谱条件进样分析, 记录色谱图, 计算含量。结果马钱苷、紫丁香苷、甘草苷和特女贞苷含量的 RSD 分别为 2.08%, 2.81%, 3.39%, 1.93% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取样品(批号为 180924), 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 室温下放置 0, 3, 6, 9, 12, 24 h, 按拟订色谱条件进样分析, 记录色谱图。结果马钱苷、紫丁香苷、甘草苷和特女贞苷峰面积的 RSD 分别为 1.48%, 2.03%, 1.82%, 1.08% ($n = 6$), 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 180924)20 粒, 倒出内容物, 混匀, 取约 1.0 g, 精密称定, 共 6 份, 分别置 25 mL 容量瓶中; 加入 2.2 项下混合对照品贮备溶液适量, 依法制备供试品溶液; 按拟订色谱条件进样分析, 记录色谱图, 计算回收率。结果见表 2。

表2 加样回收试验结果($n=6$)

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 (%)
马钱苷	1.024 4	0.138 3	0.15	0.292 4	102.73	100.44	2.92
	1.103 2	0.152 4	0.15	0.301 5	99.40		
	0.998 6	0.146 2	0.15	0.299 7	102.33		
	0.989 2	0.157 1	0.15	0.300 9	95.87		
	1.005 8	0.129 3	0.15	0.284 6	103.53		
	1.053 1	0.147 5	0.15	0.295 7	98.80		
紫丁香苷	1.024 4	0.362 3	0.35	0.710 2	99.40	100.62	2.25
	1.103 2	0.341 6	0.35	0.705 3	103.91		
	0.998 6	0.392 5	0.35	0.744 2	100.49		
	0.989 2	0.355 1	0.35	0.703 2	99.46		
	1.005 8	0.370 6	0.35	0.712 9	97.80		
	1.053 1	0.361 9	0.35	0.721 1	102.63		
甘草苷	1.024 4	0.349 7	0.25	0.604 2	101.80	100.71	3.19
	1.103 2	0.316 8	0.25	0.579 1	104.92		
	0.998 6	0.254 9	0.25	0.507 7	101.12		
	0.989 2	0.300 4	0.25	0.544 6	97.68		
	1.005 8	0.274 9	0.25	0.531 2	102.52		
	1.053 1	0.286 2	0.25	0.526 8	96.24		
特女贞苷	1.024 4	0.400 6	0.4	0.804 9	101.08	101.29	3.05
	1.103 2	0.386 4	0.4	0.803 7	104.33		
	0.998 6	0.392 9	0.4	0.788 3	98.85		
	0.989 2	0.345 1	0.4	0.756 5	102.85		
	1.005 8	0.346 3	0.4	0.762 2	103.98		
	1.053 1	0.356 8	0.4	0.743 4	96.65		

2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为180924,190106,190417),依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录色谱图,根据峰面积计算含量。结果见表3。

表3 3批样品中4种活性成分含量测定结果(mg/g)

批号	马钱苷	紫丁香苷	甘草苷	特女贞苷
180924	0.145 1	0.364 2	0.297 1	0.371 3
190106	0.152 8	0.375 1	0.274 6	0.344 9
190417	0.137 6	0.319 8	0.325 2	0.369 2

3 讨论

3.1 活性成分选择

考察复方斑蝥胶囊中刺五加、山茱萸、甘草、女贞子4味药材的指标性成分,即紫丁香苷、马钱苷、甘草苷和特女贞苷,基本覆盖了复方斑蝥胶囊组方中的君臣佐使,能全面地反映其质量。

3.2 提取方法优化

试验分别优化了提取溶剂的用量(15,18,20,22 mL)、超声时间(15,20,25,30 min)和功率(250,300,350 W)。结果表明,选择85%甲醇提取溶剂用量为20 mL、超声时间25 min和超声功率300 W时,提取效

率最好,且杂质无干扰。

3.3 检测波长选择

分别配制5 $\mu\text{g/mL}$ 的紫丁香苷、马钱苷、甘草苷和特女贞苷单标对照品溶液,于190~400 nm波长间进行波谱扫描,记录光谱图。结果紫丁香苷在262 nm波长处、马钱苷在241 nm波长处、甘草苷在237 nm波长处、特女贞苷在225 nm波长处具有最大吸收。表明选择235 nm作为检测波长时,4种活性成分响应情况良好,定性、定量结果准确。

3.4 方法评价

本研究中建立的HPLC检测复方斑蝥胶囊中4种活性成分马钱苷、特女贞苷、紫丁香苷、甘草苷的含量,简便快速,重复性好,结果准确,可用于复方斑蝥胶囊的质量控制。

参考文献:

- [1] 胡自康,李 维,苏春志,等. 复方斑蝥胶囊联合化疗用于直肠癌根治术后患者的临床疗效[J]. 中国药物经济学,2019,14(3):80-83.
- [2] 宋 展,周丽荣,王晓晟,等. 复方斑蝥胶囊联合化疗用于直肠癌根治术后患者的临床疗效[J]. 现代药物与临床,2019,34(5):1525-1528.
- [3] 黄 雄,罗 萍,胡 飞,等. 复方斑蝥胶囊联合MPT方案治疗多发性骨髓瘤的临床疗效及安全性[J]. 临床合理用药杂志,2019,12(6):78-79.
- [4] 何晓桐,潘思文,武传秀,等. 刺五加有效组分对帕金森病模型细胞中相关微小RNA表达的干预作用[J]. 吉林中医药,2019,39(3):381-384.
- [5] 李紫薇,宫凤秋,李 杨,等. 刺五加化学成分和药理作用的研究进展[J]. 饮食保健,2019,6(19):297.
- [6] 王之珺,李 劲,邓成煊. 山茱萸多糖对宫颈癌HeLa细胞增殖的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(12):1284-1286.
- [7] 张培全,胡继藤,张 超. 山茱萸提取物清除DPPH·自由基作用的研究[J]. 海峡药学,2019,31(2):32-35.
- [8] 刘 芳,余世荣,张晓燕,等. 冬至前后女贞子中3种活性物质积累量的变化研究[J]. 中国药师,2019,22(5):864-866.
- [9] 金 婷,戈 煜,瞿发林,等. 女贞子提取工艺的研究[J]. 药学实践杂志,2019,37(3):249-253.
- [10] 李 想,李 冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药,2019,51(5):81-86.
- [11] 张耀峰. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中医临床研究,2019,11(9):141-142.
- [12] 杨 娜,刘丰林. LC-MS/MS法同时测定十一味益肾降糖片中马钱苷和莫诺苷的含量[J]. 中国现代中药,2019,20(3):341-344.
- [13] 尚庆霞,杨小林. HPLC法测定复方斑蝥胶囊中马钱苷和紫丁香苷的含量[J]. 海峡药学,2018,30(3):29-30.

(收稿日期:2019-08-28)