

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.21.016

高效液相色谱法同时测定益肾壮骨丸中芍药苷、莫诺苷和马钱苷含量*

张璐¹, 姜志戎², 尹萌¹, 胡旭², 朱殿雨², 田静^{1△}

(1. 扬州市食品药品检验检测中心, 江苏 扬州 225000; 2. 宝应县中医医院, 江苏 扬州 225800)

摘要:目的 建立同时测定益肾壮骨丸中芍药苷、莫诺苷和马钱苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.3% 磷酸水溶液(B)(梯度洗脱, 0~20 min 时 7% A, 20~50 min 时 7% A→20% A, 50~55 min 时 20% A, 55~60 min 时 20% A→7% A, 60~70 min 时 7% A), 流速为 1 mL/min, 芍药苷检测波长为 230 nm、莫诺苷和马钱苷检测波长为 240 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 芍药苷、莫诺苷和马钱苷分别在 29.30~586.00 μg/mL($r=0.9998$), 2.94~58.74 μg/mL($r=0.9997$), 15.29~305.70 μg/mL($r=1.0000$) 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率分别为 97.93%, 99.26%, 101.45%, RSD 分别为 0.93%, 0.60%, 1.40% ($n=6$); 3 批次样品中芍药苷、莫诺苷和马钱苷的含量范围分别为 1.759~1.904 mg/g, 0.169~0.188 mg/g, 0.512~0.527 mg/g。结论 该方法灵敏度高, 专属性强, 可用于益肾壮骨丸中芍药苷、莫诺苷、马钱苷的含量测定。

关键词: 益肾壮骨丸; 芍药苷; 莫诺苷; 马钱苷; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)21-0056-04

Content Determination of Paeoniflorin, Morroniside and Loganin in Yishen Zhuanggu Pills by HPLC

ZHANG Lu¹, JIANG Zhirong², YIN Meng¹, HU Xu², ZHU Dianyu², TIAN Jing¹

(1. Yangzhou Center for Food and Drug Control, Yangzhou, Jiangsu, China 225000; 2. Baoying County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou, Jiangsu, China 225800)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of paeoniflorin, morroniside and loganin in Yishen Zhuanggu Pills. **Methods** Eclipse XDB-C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile(A)-0.3% phosphoric acid aqueous solution(B) with gradient elution(0-20 min, 7% A; 20-50 min, 7%→20% A; 50-55 min, 20% A; 55-60 min, 20%→7% A; 60-70 min, 7% A), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 230 nm for paeoniflorin, 240 nm for morroniside and loganin, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The range of paeoniflorin, morroniside and loganin were 29.30-586.00 μg/mL($r=0.9998$), 2.94-58.74 μg/mL($r=0.9997$), 15.29-305.70 μg/mL($r=1.0000$), respectively. The average recoveries were 97.93%, 99.26%, 101.45%, and the RSDs were 0.93%, 0.60% and 1.40%, respectively($n=6$). The contents of paeoniflorin, morroniside and loganin of the 3 batches were in the range of 1.759-1.904 mg/g, 0.169-0.188 mg/g and 0.512-0.527 mg/g, respectively. **Conclusion** This method has high sensitivity and good specificity, which can be used for the content determination of paeoniflorin, morroniside and loganin in Yishen Zhuanggu Pills.

Key words: Yishen Zhuanggu Pills; paeoniflorin; morroniside; loganin; content determination; HPLC

益肾壮骨丸是宝应县中医医院获得专利授权的独家制剂, 由山萸肉、枸杞子、杜仲、白芍、赤芍等 10 余味中药组方, 具有补益肝肾、壮骨强筋、活络通经的功效, 主要用于肝肾亏虚、筋骨痿弱引起的腰腿痛、关节痛、腰膝酸软、四肢无力等病症, 临床应用广泛且疗效确切^[1]。方中山萸肉为君药, 白芍和赤芍为臣药, 莫诺苷、马钱苷为山萸肉的主要活性成分^[2-6], 芍药苷为白芍和赤芍的主要活性成分^[7-11]。本方药味较多, 但现行标准仅有性状鉴别和常规检查项, 无法有效控制产品质量。本研究中以芍药苷、莫诺苷和马钱苷为指标成分, 建立了同时测定益肾壮骨丸中 3 种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法^[12-13]。现报道

如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(包含 DAD 检测器, 美国安捷伦科技有限公司); Mettler Toledo XS205 DU 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司, 精度为十万分之一); KH-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司, 功率为 300 W, 频率为 50 kHz); OGH60 型电热恒温干燥箱(美国赛默飞世尔科技公司); Milli-Q 型超纯水仪(美国密理博公司); BT-150 型多功能粉碎机(浙江拜杰电器有限公司, 功率为 550 W, 频率为 50~60 Hz)。

*基金项目: 江苏省药学会-奥赛康临床药学基金科研项目[A201746]。

第一作者: 张璐, 女, 大学本科, 主管中药师, 研究方向为中药药效物质基础和质量评价, (电子信箱)459466789@qq.com。

△通信作者: 田静, 女, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为中药质量分析, (电话)0514-80976311。

1.2 试药

益肾壮骨丸(宝应县中医医院,批号分别为20181119,20181203,20181218,规格为每盒45 g);芍药苷对照品(批号为110736-201741,含量为95.7%),莫诺苷对照品(批号为111998-201602,含量为96.3%),马钱苷对照品(批号为111640-201808,含量为99%;批号为111640-201606,含量为98.3%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,北京迪马科技有限公司);甲醇、乙醇、磷酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B),梯度洗脱程序见表1;流速:1 mL/min;检测波长:230 nm(芍药苷),240 nm(莫诺苷、马钱苷);柱温:30℃;进样量:10 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)
0~20	7	93
20~50	7→20	93→80
50~55	20	80
55~60	20→7	80→93
60~70	7	93

2.2 溶液制备

供试品溶液:取样品粉末(过5号筛)5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声处理(功率为300 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。

混合对照品溶液:分别取芍药苷、莫诺苷和马钱苷

对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,分别制成质量浓度1.172,0.587,1.019 mg/mL的对照品贮备液。精密吸取芍药苷贮备液5 mL、莫诺苷贮备液1 mL、马钱苷贮备液3 mL,置10 mL容量瓶中,用甲醇稀释成每1 mL含芍药苷586.0 μg、莫诺苷58.7 μg、马钱苷305.7 μg的混合对照品溶液,避光保存。再用甲醇稀释成每1 mL含芍药苷293.0 μg、莫诺苷29.4 μg、马钱苷152.9 μg的混合对照品溶液。

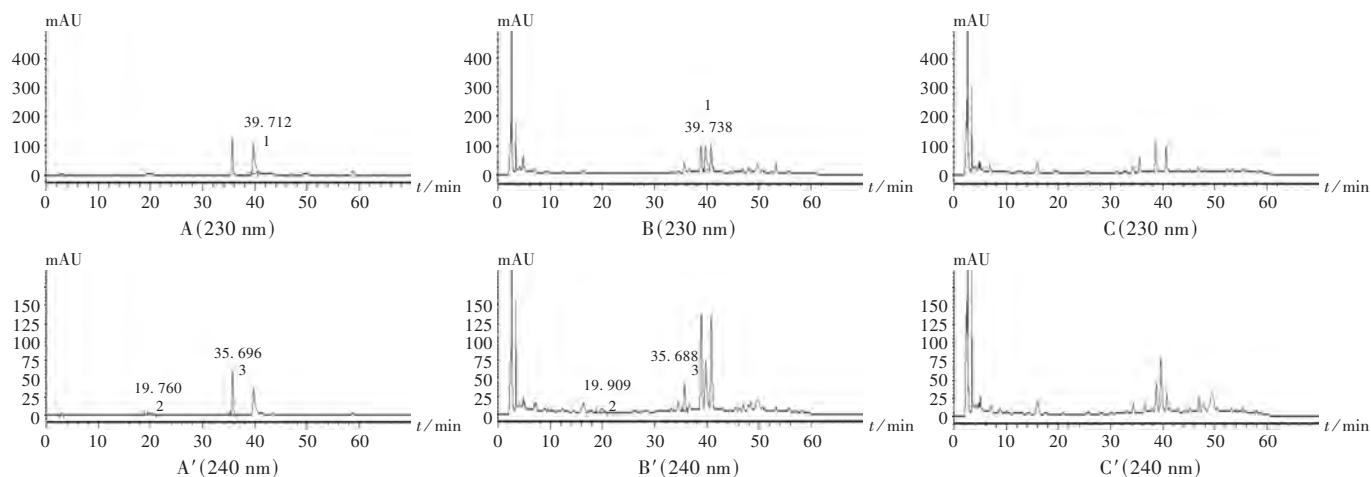
阴性对照品溶液:按处方比例和制备工艺制备缺山萸肉、白芍和赤芍(芍药苷)的阴性样品,取阴性样品粉末,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μL,注入液相色谱仪测定,记录色谱图。结果见图1。芍药苷、莫诺苷和马钱苷色谱峰的理论板数均不低于5 000,与相邻峰的分度度均大于1.5。

专属性试验:分别取不同批次(批号分别为20181119,20181203,20181218)样品及山萸萸、芍药苷阴性样品粉末,依法制备供试品溶液和阴性对照品溶液,按拟定色谱条件进样测定,并记录色谱图。详见图1。结果3批样品均检出莫诺苷、马钱苷和芍药苷的色谱峰,阴性样品均未检出相应色谱峰,益肾壮骨丸中其他成分对芍药苷、莫诺苷和马钱苷未造成干扰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:取混合对照品贮备液适量,用甲醇稀释成6个不同质量浓度的混合对照品溶液,芍药苷质量浓度分别为29.30,58.60,117.20,293.00,468.80,586.00 μg/mL,莫诺苷质量浓度分别为2.94,5.87,11.75,29.37,46.99,58.74 μg/mL,马钱苷质量浓度分别为15.29,30.57,61.14,152.85,244.56,305.70 μg/mL。取上述溶液各10 μL,分别注入液相色谱仪,测定,记录



1. 芍药苷 2. 莫诺苷 3. 马钱苷
A, A'. 混合对照品溶液 B, B'. 供试品溶液 C, C'. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

色谱图。以各对照品的质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得芍药苷、莫诺苷、马钱苷的回归方程, $Y_{\text{芍}} = 14\,678 X_{\text{芍}} + 9\,569$ ($r = 0.999\,8$), $Y_{\text{莫}} = 16\,194 X_{\text{莫}} + 4\,280$ ($r = 0.999\,7$), $Y_{\text{马}} = 16\,186 X_{\text{马}} + 9\,019$ ($r = 1.000\,0$)。结果表明,芍药苷、莫诺苷和马钱苷的质量浓度分别在 $29.30 \sim 586.00$, $2.94 \sim 58.74$, $15.29 \sim 305.70 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:分别取芍药苷、莫诺苷、马钱苷对照品贮备液适量,加甲醇稀释成适当质量浓度的溶液,取 $10 \mu\text{L}$ 进样分析。以信噪比(S/N) = 3 为指标,结果芍药苷进样质量浓度为 $0.44 \mu\text{g/mL}$,即检测限为 $4.4 \times 10^{-3} \mu\text{g}$;莫诺苷进样质量浓度为 $0.29 \mu\text{g/mL}$,即检测限为 $2.9 \times 10^{-3} \mu\text{g}$;马钱苷进样质量浓度为 $0.31 \mu\text{g/mL}$,即检测限为 $3.1 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 。以 $S/N = 10$ 为指标,结果芍药苷进样质量浓度为 $1.46 \mu\text{g/mL}$,即定量限为 $14.6 \times 10^{-3} \mu\text{g}$;莫诺苷进样质量浓度为 $0.98 \mu\text{g/mL}$,即定量限为 $9.8 \times 10^{-3} \mu\text{g}$;马钱苷进样质量浓度为 $1.02 \mu\text{g/mL}$,即定量限为 $10.2 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 。

精密度试验:取混合对照品溶液,按拟订色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图。结果芍药苷、莫诺苷和马钱苷峰面积的 RSD 分别为 0.53% , 0.99% , 0.55% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 20181119)粉末,依法平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算含量。结果芍药苷、莫诺苷和马钱苷含量的 RSD 分别为 0.57% , 0.84% , 0.69% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 20181119)粉末,依法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 4, 8, 12 h 后按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芍药苷、莫诺苷和马钱苷的峰面积均无明显变化, RSD 均小于 1% ($n = 4$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(批号为 20181119)粉末(过 5 号筛) 2.5 g ,精密称定,精密加入含芍药苷 $293.0 \mu\text{g}$ 、莫诺苷 $29.4 \mu\text{g}$ 、马钱苷 $152.9 \mu\text{g}$ 的混合对照品溶液 15 mL ,平行制备 6 份,按拟订色谱条件进样,测定各待测成分含量,并计算加样回收率。结果见表 2。

耐用性考察:分别采用 Agilent1260 型和 Waters e2695 型液相色谱仪,以及 Agilent Eclipse XDB- C_{18} 、Inertsil ODS-SP C_{18} 、Alltima C_{18} 色谱柱测定对照品溶液和供试品溶液,结果待测成分分离均较好,对含量测定结果也无影响,表明该方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取不同批次(批号分别为 20181119, 20181203,

表 2 加样回收试验($n = 6$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$
芍药苷	4.365 0	4.395 0	8.651 4	97.53	97.93	0.93
	4.397 9	4.395 0	8.642 0	96.57		
	4.370 4	4.395 0	8.735 1	99.31		
	4.389 6	4.395 0	8.713 4	98.38		
	4.385 2	4.395 0	8.696 2	98.09		
	4.383 3	4.395 0	8.678 3	97.72		
莫诺苷	0.419 4	0.441 0	0.853 8	98.50	99.26	0.60
	0.422 5	0.441 0	0.859 8	99.16		
	0.419 9	0.441 0	0.860 4	99.89		
	0.421 7	0.441 0	0.857 3	98.78		
	0.421 3	0.441 0	0.862 4	100.02		
	0.421 1	0.441 0	0.858 7	99.23		
马钱苷	1.270 5	2.293 5	3.623 0	102.57	101.45	1.40
	1.280 1	2.293 5	3.642 8	103.02		
	1.272 1	2.293 5	3.605 4	101.74		
	1.277 7	2.293 5	3.603 5	101.41		
	1.276 4	2.293 5	3.591 3	100.93		
	1.275 9	2.293 5	3.546 6	99.01		

20181218)样品粉末,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定各待测成分含量。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(mg/g)

批号	芍药苷	莫诺苷	马钱苷
20181119	1.759	0.169	0.512
20181203	1.872	0.183	0.535
20181218	1.904	0.188	0.527

3 讨论

3.1 色谱条件选择

分别考察了乙腈-磷酸、乙腈-水、甲醇-醋酸的流动相体系,并综合比较峰形、分离度、出峰时间等参数,选择以乙腈- 0.3% 磷酸溶液梯度洗脱为流动相。在 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 波长范围内进行扫描,选择有最大吸收且干扰峰较少的 230 nm 波长测定芍药苷, 240 nm 波长测定莫诺苷、马钱苷。

3.2 样品前处理方法考察

提取溶剂与提取方法:取样品(批号为 20181218)粉末(过 5 号筛) 5 g ,精密称定,置具塞锥形瓶中,共 8 份。分别为甲醇加热回流组、甲醇超声组、 70% 甲醇加热回流组、 70% 甲醇超声组、乙醇加热回流组、乙醇超声组、 70% 乙醇加热回流组和 70% 乙醇超声组,分别精密加入对应提取溶剂 50 mL ,并按对应提取方法提取 30 min ,考察待测成分的含量。结果表明,甲醇提取的各待测成分的含量均大于乙醇;加热回流提取法与超声提取法相比,未见更多的色谱峰信息,且待测成分含量差异不大,超声提取法更方便快捷,故选择以甲醇超声提取。