

一测多评法测定左归丸中 3 种环烯醚萜苷类成分的含量

王晓燕¹, 霍甜甜², 李振国^{1*} (1. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 2. 河南中医学院, 郑州 450046)

摘要 目的: 建立以马钱苷为内参物, 同时测定左归丸中莫诺苷、马钱苷和山茱萸新苷含量的一测多评法(QAMS)。方法: 采用高效液相色谱法, Phenomenex C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 硅胶色谱柱; 流动相: 乙腈(A)-0.3% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱; 柱温 35℃; 检测波长 (0~65 min, 240 nm, 检测莫诺苷和马钱苷; 66~80 min, 218 nm, 检测山茱萸新苷)。以马钱苷为内参物, 建立其与莫诺苷、山茱萸新苷的相对校正因子(RCFs), 并进行含量计算, 实现一测多评; 同时采用外标法(ESM) 测定左归丸中 3 种有效成分的含量, 比较一测多评法计算值与外标法实测值的差异。结果: 在一定线性范围内, 马钱苷与莫诺苷、山茱萸新苷的相对校正因子分别为 1.048、1.390。建立的相对校正因子重现性良好, 7 批左归丸中 3 种成分的计算值与实测值间无显著差异。结论: 采用本研究建立的“一测多评”法控制左归丸的质量是可行的。

关键词: 左归丸; 莫诺苷; 马钱苷; 山茱萸新苷; 一测多评法; 相对校正因子

中图分类号: R284.1; R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)02-0157-09
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.02.008

Quantitative Analysis of 3 Iridoid Glucosides in Zuigui Pills Using Single Marker by QAMS Method

Wang Xiaoyan¹, Huo Tiantian², Li Zhenguo^{1*} (1. Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China; 2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract Objective: To establish a method for quantitative analysis of multi-components using single-marker (QAMS) for determination of 3 iridoid glucosides in Zuigui pills with loganin as the internal reference, and to validate its feasibility by the simultaneous quantitative assay of the 3 components. **Methods:** The separation was carried out on a Phenomenex C18 Silica gel column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.3% phosphoric acid solution (B) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, with the column temperature of 35℃. The detection wavelengths were changeable (0–65 min, 240 nm for detection of morroniside and loganin; 66–80 min, 218 nm for detection of cornuside). The QAMS for Zuigui pills was established and validated and loganin was selected as the internal reference substance. The relative correction factors (RCFs) of morroniside and cornuside were calculated. The contents of 3 components were determined by both external standard method and QAMS. The validity of the QAMS method was evaluated by comparison of the quantitative results of both methods. **Results:** RCFs of morroniside and cornuside with reference to loganin were respectively 1.048

and 1.390, and the repeatability was good in different experimental conditions; the quantitative results of both external standard method and QAMS for the 3 components in 7 batches of Zuigui pills were basically identical.

Conclusion: The QAMS method established in this research is accurate and feasible to control the quality of Zuigui pills.

Keywords: Zuigui pills; morroniside; loganin; cornuside; quantitative analysis of multi-components by a single-marker (QAMS); relative correction factors (RCFs)

左归丸为卫生部药品标准中药成方制剂第一册收载的品种。由熟地黄、菟丝子、牛膝、龟板胶、鹿角胶、山药、山茱萸、枸杞子 8 味中药组成。用于真阴不足，腰酸膝软，盗汗遗精，神疲口燥^[1]，临床应用广泛。部颁药品标准只对左归丸进行了丸剂项下相关检查，未对其进行含量限定。山茱萸为左归丸方中的主要组成药味，现代药理学研究显示：山茱萸中的环烯醚萜苷类成分具有调节免疫、抗炎、降低血糖、抑制血栓形成、改善神经和记忆功能等作用^[2-5]。马钱苷、莫诺苷和山茱萸新苷均属环烯醚萜苷类。马钱苷和莫诺苷的相关研究较多，《中国药典》2015 年版一部^[6]已将其作为山茱萸及其饮片的质量控制成分，但莫诺苷在山茱萸相关药物质量控制中却多缺失。山茱萸新苷具有抗炎、保护大鼠皮层细胞及保肝护肝等药理作用^[7]，亦可作为质量控制指标性成分。

一测多评法 (QAMS) 是多指标质量控制的模式之一，既能够实现多指标性成分的同时测定，又可以解决部分对照品难以获得或价格昂贵的问题，可显著节约检验检测成本^[8]，该法已经成功应用于双青咽喉片^[9]、三黄片^[10]、胃苏颗粒^[11]等多种中成药的质量控制中。本研究在参考文献^[12-16]的基础上，采用一测多评的方法，以较为廉价易得的马钱苷为内参物，通过建立其与莫诺苷和山茱萸新苷之间的相对校正因子，来同步测定 3 种有效成分的含量，实现了在节约多成分含量测定检验成本的同时，可以较全面地控制左归丸的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)，Agilent chemstation 工作站；Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)，Empower 工作站。瑞士 Precisa XR 205SM-DR 分析天平；KQ-250 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；Thermo ODS C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。

1.2 试剂与药品

市售左归丸 (水蜜丸) (河南省宛西制药股份有限公司，批号：150208、140904、140207、140910、141001、130704、130517，每 10 粒重 1 g)。对照品马钱苷 (批号：111640-201005，纯度 99.2%，供含量测定用，中国食品药品检定研究院)。莫诺苷 (批号：140301，纯度 ≥ 98%)、山茱萸新苷 (批号：131015，纯度 ≥ 98%)，均购自成都普菲德生物技术有限公司，面积归一化法计算对照品的含量在 98% 以上。乙腈为色谱纯，水为娃哈哈纯净水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别取莫诺苷、马钱苷和山茱萸新苷对照品适量，加甲醇配制成浓度分别为莫诺苷 0.5694 mg · mL⁻¹、马钱苷 0.6891 mg · mL⁻¹、山茱萸新苷 0.1648 mg · mL⁻¹ 的单一对照品溶液。

分别取莫诺苷、马钱苷和山茱萸新苷对照品适量，精密称定，加甲醇配制成每 1 mL 含莫诺苷 32.39 μg、马钱苷 33.90 μg、山茱萸新苷 7.75 μg 的混合对照品溶液。将上述混合对照品溶液于 4 °C 保存，备用。

2.2 供试品溶液的制备

取本品适量研细，取约 3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定重量，加热回流提取 1 h，取出冷却至室温，加入甲醇补足缺失重量，摇匀，滤过，取续滤液，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.3 阴性对照溶液的制备

按左归丸处方比例和制备方法，制备缺山茱萸的阴性对照药，按“2.2”节方法制备缺酒萸肉

的阴性对照溶液。

2.4 液相色谱条件

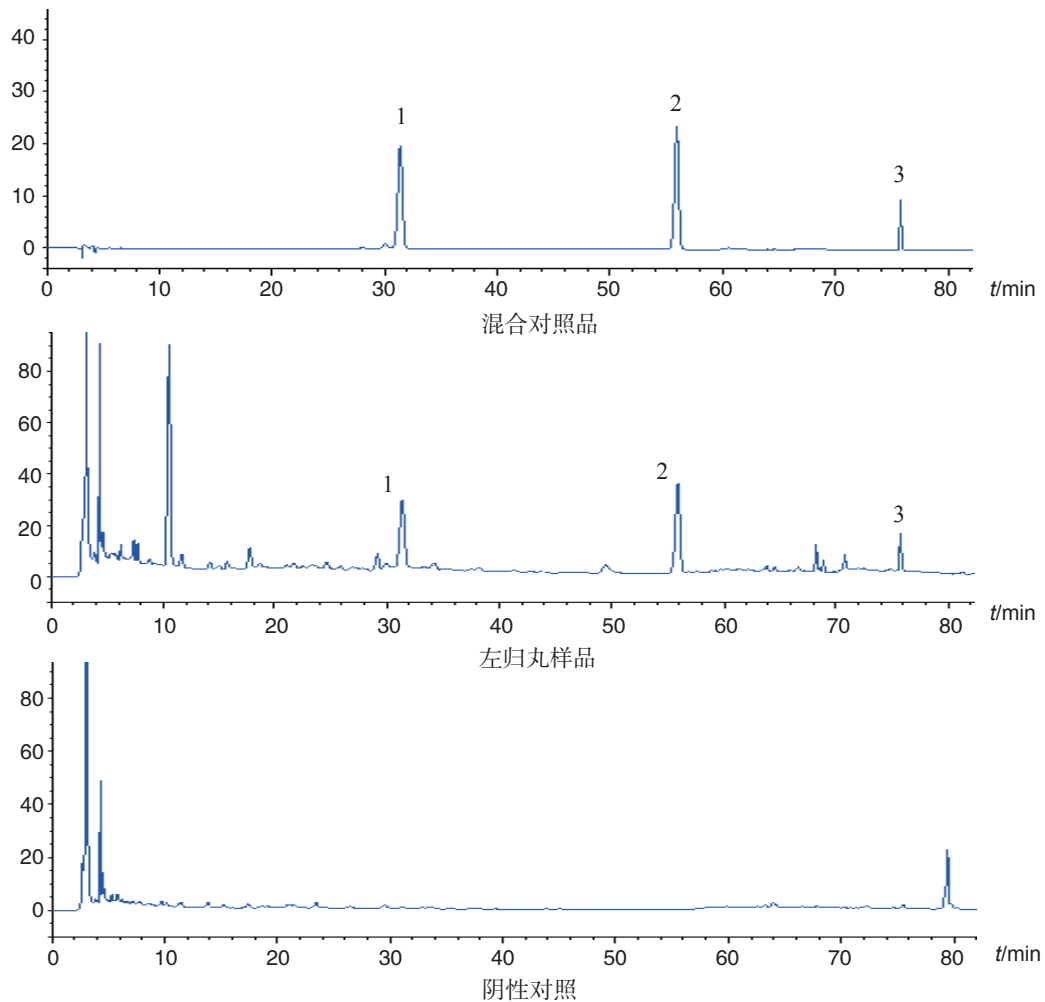
色谱柱: Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.3% 磷酸水溶液; 梯度洗脱程序见表1; 流速: 1 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长: 0~65 min, 240 nm, 测定莫诺昔和马钱昔; 66~80 min, 218 nm 测定山茱萸

新昔; 进样量: 10 μL。

分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 各10 μL, 按上述色谱条件, 进样测定, 结果见图1。由图1可知, 各待测色谱峰均达到基线分离, 阴性对照色谱中, 在与莫诺昔、马钱昔和山茱萸新昔相对应的保留时间处无干扰。

表1 梯度洗脱程序

时间 /min	乙腈量 /%	0.3% 磷酸量 /%
0~10	5	95
10~26	5 → 8	95 → 92
26~50	8 → 9	92 → 91
50~65	9 → 14	91 → 86
65~80	14 → 26	86 → 74



1. 莫诺昔; 2. 马钱昔; 3. 山茱萸新昔。

图1 HPLC 色谱图

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察

取莫诺昔、马钱昔、山茱萸新昔适量,加入适量甲醇,配制成浓度为莫诺昔 $180.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、马钱昔 $171.22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、山茱萸新昔 $76.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液 1、

2、5、8、10、12、15、20 μL ,分别注入高效液相色谱仪,以对照品的进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,对照品色谱峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。各成分回归方程、线性范围见表2,结果表明各成分进样量在相应范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

表2 4种成分线性范围、回归方程和相关系数

成分	回归方程	线性范围/ μg	相关系数(r)
莫诺昔	$Y_1=1883.3X_1+971.3$	0.180~3.608	0.9999
马钱昔	$Y_2=218.83X_2-768.68$	0.171~3.424	0.9997
山茱萸新昔	$Y_3=261.29X_3-20.222$	0.076~1.526	0.9996

2.5.2 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(批号:150208)10 μL ,连续进样6次,记录莫诺昔、马钱昔和山茱萸新昔峰面积积分值,计算RSD,结果各成分峰面积的RSD分别为1.26%、0.57%和0.83%。表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号:150208)10 μL ,分别于配制后的0、2、4、8、10、15和24 h,测定峰面积积分值,计算RSD,结果莫诺昔、马钱昔和山茱萸新昔峰面积的RSD分别为1.53%、1.04%和0.93%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5.4 重复性试验

称取同一批供试品粉末(批号:150208),约3 g,精密称定,按供试品制备方法制备6份供试品溶液,测定峰面积积分值,计算RSD,结果莫诺昔、马钱昔和山茱萸新昔平均含量分别为0.370、0.441和0.112 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD分别为2.10%、1.48%和2.52%。表明该方法的重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验

取已测知含量的供试品粉末(批号:150208)约1.5 g,共6份,分别加入单一对照品溶液(莫诺昔 $0.5694 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、马钱昔 $0.6891 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、山茱萸新昔 $0.1648 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)各1 mL,按“2.2”节方法制备供试品溶液,“2.4”节色谱条件测定峰面积,计算各成分的平均加样回收率以及RSD。结果见表3~5。

表3 莫诺昔加样回收率试验结果($n=6$)

取样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1.5025	0.5559	0.5694	1.1075	96.9	96.4	0.44
1.5018	0.5557	0.5694	1.1043	96.4		
1.5009	0.5553	0.5694	1.1068	96.9		
1.5032	0.5562	0.5694	1.1011	95.7		
1.5045	0.5567	0.5694	1.1056	96.4		
1.5011	0.5554	0.5694	1.1045	96.4		

表4 马钱苷加样回收率试验结果 (n=6)

取样量 /g	样品含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.5025	0.6626	0.6891	1.3379	98.0	97.7	1.14
1.5018	0.6623	0.6891	1.3416	98.6		
1.5009	0.6619	0.6891	1.3311	97.1		
1.5032	0.6629	0.6891	1.3263	96.3		
1.5045	0.6635	0.6891	1.331	96.9		
1.5011	0.662	0.6891	1.3457	99.2		

表5 山茱萸新苷加样回收率试验结果 (n=6)

取样量 /g	样品含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.5025	0.1683	0.1648	0.3312	98.8	98.1	1.16
1.5018	0.1682	0.1648	0.3324	99.6		
1.5009	0.1681	0.1648	0.3295	97.9		
1.5032	0.1684	0.1648	0.3271	96.3		
1.5045	0.1685	0.1648	0.3295	97.7		
1.5011	0.1681	0.1648	0.3302	98.4		

2.6 相对校正因子的计算

2.6.1 待测组分相对校正因子测定

采用 Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, Agilent 1260 高效液相色谱系统, 精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、8、10、12、15 μL, 分别进样分析。以马钱苷为内参物, 根据相对校正因子计算公式^[17]:

$f_{si} = f_s / f_i = \frac{A_s / C_s}{A_i / C_i}$ 。其中 A_s 为内参物峰面积, C_s 为内参物浓度, A_i 为其他组分 i 峰面积, C_i 为其他组分 i 浓度。计算待测成分莫诺苷、山茱萸新苷的相对校正因子, 结果见表 6。

2.6.2 不同高效液相色谱仪对相对校正因子的影响

采用 Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、8、10、12、15 μL, 分别进样分析。考察了 3 种不同的高效液相色谱系统: Agilent 1260、岛津 LC-20A 和 Waters 2695, 对环烯醚萜苷类成分相对校正因子的影响, 结果见表 7。由表 7 可知, 采用

3 个品牌的高效液相色谱仪求得各成分相对校正因子的相对平均偏差均 < 5%, 不同的高效液相色谱仪对相对校正因子和相对保留时间的影响较小。

表6 相对校正因子

进样体积 /μL	相对校正因子	
	$f_{(马钱苷/莫诺苷)}$	$f_{(马钱苷/山茱萸新苷)}$
1	1.026	1.374
2	1.037	1.381
5	1.048	1.393
8	1.055	1.397
10	1.048	1.399
12	1.064	1.391
15	1.055	1.399
均值	1.048	1.390
RSD/%	1.21	0.69

表7 不同高效液相色谱仪对校正因子的影响

仪器	相对校正因子	
	$f_{(马钱苷/莫诺昔)}$	$f_{(马钱苷/山茱萸新苷)}$
Agilent 1260	1.048	1.390
Waters 2695	1.073	1.442
岛津 LC-20A	1.036	1.376
均值	1.052	1.403
RSD/%	1.79	2.48

2.6.3 不同高效液相色谱仪及色谱柱对相对校正因子的影响

分别考察 Agilent 1260、岛津 LC-20A 高效液相色谱仪和 Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C18

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Thermo ODS C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 对相对校正因子的影响, 结果见表 8。结果表明, 不同的色谱仪和色谱柱对相对校正因子和相对保留时间的影响较小。

表8 不同高效液相色谱仪及色谱柱对校正因子的影响

仪器	色谱柱	相对校正因子	
		$f_{(马钱苷/莫诺昔)}$	$f_{(马钱苷/山茱萸新苷)}$
岛津 LC-20A	Thermo ODS C18	1.098	1.308
	Agilent ZORBAX SB-C18	1.064	1.389
	Phenomenex Luna C18	1.036	1.376
Agilent 1260	Thermo ODS C18	1.132	1.344
	Agilent ZORBAX SB-C18	1.116	1.412
	Phenomenex Luna C18	1.048	1.390
均值		1.082	1.370
RSD/%		3.58	2.75

2.6.4 不同实验室考察

在 2 个实验室对所建立的“一测多评”校正因子进行复核试验。同为 Agilent 1260 高效液相色谱仪及 Phenomenex Luna C18 (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 2 个实验室测得的莫诺昔和山茱萸新苷相对校正因子分别为 1.048、1.390 和 1.035、1.376。各成分的相对校正因子的 RSD 均 < 5%。说明所建立的相对校正因子在不同的实验室有良好的可行性。

2.7 待测组分色谱峰的定位

本研究分别考察了相对保留时间和保留时间差在不同品牌仪器和不同规格色谱柱中的重现性。

结果表明, 保留时间差的波动较为明显, RSD > 5%; 而相对保留时间的波动较小。因此, 采用相对保留时间定位待测组分色谱峰, 结果见表 9、10, 莫诺昔和山茱萸新苷的相对保留时间分别为 0.564、1.360。

2.8 一测多评法 (QAMS) 与外标法 (ESM) 测定结果的比较

精密吸取 7 批供试品溶液各 10 μL, 分别注入高效液相色谱仪进行测定。采用外标法和一测多评法, 计算左归丸中莫诺昔和马钱苷的含量, 结果见表 11。结果表明 2 种含量测定方法无显著性差异, 相对误差 < 5%。

表 9 不同仪器和色谱柱相对保留时间比较

仪器	色谱柱	相对保留时间	
		r 莫诺昔 / 马钱昔	r 山茱萸新昔 / 马钱昔
岛津 LC-20A	Thermo ODS C18	0.582	1.413
	Agilent ZORBAX SB-C18	0.554	1.300
	Phenomenex Luna C18	0.556	1.362
Agilent 1260	Thermo ODS C18	0.578	1.421
	Agilent ZORBAX SB-C18	0.548	1.308
	Phenomenex Luna C18	0.563	1.355
均值		0.564	1.360
RSD/%		2.43	3.73

表 10 不同仪器和色谱柱保留时间差比较

仪器	色谱柱	保留时间差 /min	
		ΔtR 莫诺昔 / 马钱昔	ΔtR 山茱萸新昔 / 马钱昔
岛津 LC-20A	Thermo ODS C18	-26.537	21.995
	Agilent ZORBAX SB-C18	-24.858	20.003
	Phenomenex Luna C18	-24.052	19.144
Agilent 1260	Thermo ODS C18	-26.904	21.863
	Agilent ZORBAX SB-C18	-24.933	20.148
	Phenomenex Luna C18	-24.442	19.849
均值		-25.288	20.500
RSD/%		-4.59	5.66

表 11 QAMS 法与 ESM 法测得的左归丸中 3 种成分的含量 (n=2)

mg · g⁻¹

批号	马钱昔		莫诺昔		山茱萸新昔		
	ESM	QAMS	ESM	相对误差 /%	QAMS	ESM	相对误差 /%
150208	0.441	0.370	0.366	-0.99	0.117	0.114	2.47
140207	0.462	0.388	0.382	-1.60	0.13	0.128	1.95
140904	0.451	0.382	0.373	-2.47	0.121	0.117	3.04
140910	0.460	0.384	0.378	-1.71	0.127	0.125	1.33
141001	0.420	0.355	0.344	-3.12	0.108	0.105	2.89
130704	0.437	0.354	0.351	-0.73	0.11	0.109	0.69
130517	0.494	0.407	0.402	-1.16	0.162	0.158	2.27

注: 相对误差 (%) = $\frac{\text{QAMS计算值}-\text{ESM实测值}}{\text{ESM实测值}}$

3 讨论

3.1 内参物的选择及色谱峰的定位

由于马钱苷为《中国药典》2015年版规定的山茱萸质量控制指标性成分,性质稳定、市场流通性强、较易得到,且其出峰时间和峰面积适中;而莫诺苷和山茱萸新苷价格较昂贵。因此,选择马钱苷为内参物。

根据目标峰与内参峰之间的相对保留值,即能够正确判断出各目标峰的准确位置。

3.2 流动相及柱温的考察

比较了甲醇和乙腈作为有机相、不同浓度的磷酸水溶液作为无机相的梯度洗脱效果,结果发现乙腈-0.3%磷酸水溶液洗脱分离效果较好,达到基线分离,所以选择乙腈-0.3%磷酸水溶液梯度洗脱系统为流动相。比较了4种不同的色谱柱温:25、30、35和40℃对分离效果的影响,结果当柱温为35℃时,各成分分离效果和峰形良好。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中药成方制剂标准: 第一册 [S]. 1998: 54.
- [2] 王世全. 山茱萸主要化学成分及药理学研究进展 [J]. 医学信息, 2010, 23(12): 4867.
- [3] 张丽, 叶翠飞, 张兰, 等. 山茱萸环烯醚萜苷对血栓形成和凝血功能的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(5): 363-366.
- [4] 张丽, 李春阳, 赵玲, 等. 山茱萸环烯醚萜苷对局灶性脑缺血模型大鼠神经功能和神经元损伤的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(3): 201-202.
- [5] 丁月霞, 张丽, 叶翠飞, 等. 山茱萸环烯醚萜苷对穹隆海马伞切断大鼠学习记忆能力和突触生长素的影响 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(2): 133-138.
- [6] 中国药典: 一部 [S]. 2015: 27.

- [7] 宋顺宗. 山茱萸新苷和人参皂苷肝保护及抗肝纤维化作用的研究 [D]. 吉林: 延边大学药学院, 2011.
- [8] 范成杰. 一测多评法在中药质量评价和控制中的应用概况 [J]. 中药与临床, 2013, 4(2): 18-20.
- [9] 何兵, 刘艳, 杨世艳, 等. 一测多评法同时测定双青咽喉片中10种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 974-981.
- [10] 王钰莹, 冯伟红, 杨菲, 等. “一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 212-217.
- [11] 李玲, 赵顺, 罗疆南, 等. 一测多评法测定胃苏颗粒中4种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 751-757.
- [12] 孟建升, 王伟丽, 杨文文, 等. HPLC法测定左归丸中马钱苷的含量 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(18): 152-153.
- [13] 潘莹, 郭小龙, 陈勇, 等. HPLC法测定杞菊地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 133-135.
- [14] 孙琳林, 陈海玲, 卢林, 等. 高效液相色谱法测定左归丸中马钱苷的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(8): 1792-1793.
- [15] 李桂本, 王海波, 李振国. HPLC波长切换技术同时测定知柏地黄丸(浓缩丸)中莫诺苷、芒果苷、马钱苷和丹皮酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 125-128.
- [16] 李娟, 王本杰, 袁桂艳, 等. 六味地黄丸中四种活性成分的HPLC法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(2): 126-128.
- [17] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.

(收稿日期 2016年8月16日 编辑 王雅雯)