

本文引用: 闫瑶, 孟新源, 许欢欢, 等. 高效液相色谱法测定芪蓉润肠口服液 中松果菊苷与毛蕊花糖苷的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(7): 886-888, 892. doi: 10.3969/j.issn.1009-5551.2018.07.020

高效液相色谱法测定芪蓉润肠口服液中松果菊苷与毛蕊花糖苷的含量

闫瑶¹, 孟新源², 许欢欢¹, 杨建华¹, 胡君萍³

(新疆医科大学¹第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054; ²附属肿瘤医院药学部, 乌鲁木齐 830000; ³药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 采用高效液相色谱法测定芪蓉润肠口服液中松果菊苷与毛蕊花糖苷的含量。方法 采用 Waters Alliance 2695 型高效液相色谱仪, Hypersil ODS-2 液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.4% 磷酸水溶液梯度洗脱(流动相 A 为 0.4% 磷酸水溶液, B 为乙腈, 梯度条件为 0~5 min 83% A-17% B; 5~20 min 80% A-20% B; 20~25 min 80% A-20% B; 25~30 min 83% A-17% B), 流速 1.00 mL/min, 检测波长 333 nm, 柱温 30℃, 进样量 20 μL。结果 松果菊苷和毛蕊花糖苷分别在 12.83~205.20 μg/mL 和 0.56~8.96 μg/mL 范围内线性关系良好, r 分别为 0.999 5 和 0.999 3; 通过低、中、高 3 个梯度检测加样回收率, 测得松果菊苷平均回收率为 99.9% (n=3, RSD 为 1.2%), 毛蕊花糖苷平均回收率为 100.3% (n=3, RSD 为 1.3%); 4 个批次芪蓉润肠口服液中松果菊苷的质量浓度分别为 1 157.46、343.86、905.54、1 527.40 μg/mL, 平均质量浓度为 983.57 μg/mL; 毛蕊花糖苷的质量浓度分别为 42.87、27.54、48.73、92.21 μg/mL, 平均质量浓度为 52.84 μg/mL。结论 高效液相色谱法方法准确, 重复性好, 适用于芪蓉润肠口服液中松果菊苷与毛蕊花糖苷的含量测定。

关键词: 芪蓉润肠口服液; 松果菊苷; 毛蕊花糖苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1009-5551(2018)07-0886-04

doi: 10.3969/j.issn.1009-5551.2018.07.020

Determination of echinacoside and verbascoside in Qirong Runchang oral liquid by using HPLC

YAN Yao¹, MENG Xinyuan², XU Huanhuan¹, YANG Jianhua¹, HU Junping³

(¹Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; ²Department of Pharmacy, Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; ³School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective To develop a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of echinacoside and verbascoside in Qirong Runchang oral liquid. **Methods** HPLC method was adopted and Hypersil ODS-2 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid (mobile phase A was 0.4% phosphoric acid, mobile phase B was acetonitrile, elution gradient condition: 0-5 min 83% A-17% B; 5-20 min 80% A-20% B; 20-25 min 80% A-20% B; 25-30 min 83% A-17% B), the flow rate of 1.00 mL/min. The detection wavelength was at 333 nm and the temperature of column was 30℃ with the injection volume of 20 μL. **Results** The calibration curve of echinacoside was linear in the range of 12.83~205.20 μg/mL (r=0.9995), the calibration curve of verbascoside was linear in the range of 0.56~8.96 μg/mL (r=0.9993), the recovery rate of samples

基金项目: 新疆维吾尔自治区优秀青年科技创新人才培养项目(2014721050)

作者简介: 闫瑶(1986-), 女, 硕士, 药师, 研究方向: 生药学。

通信作者: 胡君萍, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 新疆特色药用资源的开发与利用研究, E-mail: hjp-yft@163.com。

was detected by low, medium and high gradient detection, the average of recovery of echinacoside was 99.9%, RSD=1.2%, and the verbascoside was 100.3%, RSD=1.3%. The contents of echinacoside in 4 batches of Qirong Runchang oral liquid were 1157.46, 343.86, 905.5 and 1527.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, and the average content was 983.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the contents of verbascoside in 4 batches of Qirong Runchang oral liquid were 42.87, 27.54, 48.73 and 92.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, and the average content was 52.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Conclusion The HPLC method is accurate and reproducible, which can be used for determination of echinacoside and verbascoside in Qirong Runchang oral liquid.

Keywords: Qirong Runchang oral liquid; echinacoside; verbascoside; HPLC

芪蓉润肠口服液是由黄芪(炙)、肉苁蓉、白术、太子参、地黄、玄参、麦冬、当归、黄精(制)等15味中药材加工而成,临床上多用于气阴两虚、脾肾不足、大肠失于濡润而致的虚症便秘^[1]。芪蓉润肠口服液成分中的肉苁蓉具有提高结肠收缩幅度、加强肠道收缩力、纠正胃肠激素水平等作用,对脾肾阳虚型便秘效果显著^[2]。肉苁蓉的主要活性成分是苯乙醇苷,松果菊苷和毛蕊花糖苷是苯乙醇苷中的指标性成分^[3-4]。有研究表明^[5-7],松果菊苷可能通过增加转化生长因子- β^1 来促进肠道上皮细胞 MODE-K 细胞的增殖和细胞存活率,从而修复肠道上皮细胞,促进小肠推进力,引起排便时间缩短;毛蕊花糖苷则具有增强免疫、抗自由基和防止脂质过氧化等作用。本研究采用 HPLC 法,同时考察芪蓉润肠口服液中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量,以为该药品的质量控制提供参考,现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters Alliance 2695 型高效液相色谱仪(Waters 科技有限公司),Waters 2487 型紫外检测器(Waters 科技有限公司),Empower 色谱工作站(Waters 科技有限公司),Sartorius BP211D 型电子天平(瑞士 METTLER 公司),UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),KQ-200VDB 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),基因研究型超纯水机 FJY1002-UVF(青岛富勒姆科技有限公司)。

1.2 试药 甲醇(美国 Fisher 公司,批号 145629,色谱纯),磷酸(天津市富宇精细化工材料有限公司,批号 20141020),乙腈(天津市富宇精细化工有限公司,批号 20121207,分析纯)。松果菊苷对照品与毛蕊花糖苷对照品为本课题组从盐生肉苁蓉 *Cistanche salsa* 中分离制备,UV,IR,EI-MS,¹H-NMR,¹³C-NMR 数据与文献报道相符,含量经 HPLC 面积归一化法测定纯度大于 95%。

1.3 药品 芪蓉润肠口服液(北京北卫药业有限责任公司,批号:120534、141042、141232、150538)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 称取毛蕊花糖苷对照品

和松果菊苷对照品适量于 10 mL 容量瓶,用 80% 甲醇溶解并定容至刻度,制备成毛蕊花糖苷对照品浓度为 224 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和松果菊苷对照品浓度为 513 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合溶液,备用。

2.2 供试品溶液的制备 取芪蓉润肠口服液每个批号各 3 份,12 000 r/min 离心 20 min,去沉淀部分,取上清液 0.5 mL 于 10 mL 容量瓶,用蒸馏水定容至刻度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 采用 Hypersil ODS-2 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相 A 为 0.4% 磷酸水溶液,B 为乙腈,梯度条件为 0~5 min 83% A-17% B;5~20 min 80% A-20% B;20~25 min 80% A-20% B;25~30 min 83% A-17% B,流速为 1.00 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为 333 nm,进样量为 20 μL 见图 1、2。

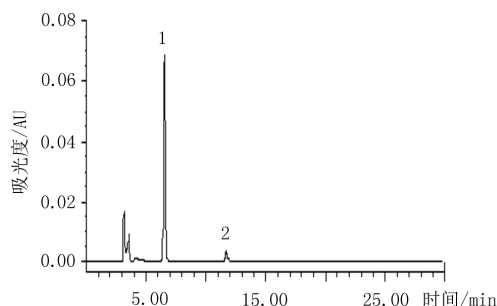


图1 混合对照品 HPLC 色谱图(1 松果菊苷;2 毛蕊花糖苷)

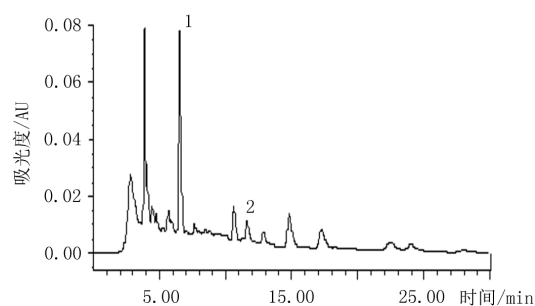


图2 供试品 HPLC 色谱图(1 松果菊苷;2 毛蕊花糖苷)

2.4 标准曲线的建立

2.4.1 松果菊苷标准曲线的建立 分别吸取“2.1”项下对照品溶液 0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 mL,用

80%甲醇定容至5 mL容量瓶,制成系列混合对照品溶液,按“2.3”项下方法测定,以峰面积为纵坐标,对照品溶液质量浓度为横坐标进行线性回归,得松果菊苷线性回归方程 $Y=13\ 600X+35\ 137$, $r=0.999\ 5$,松果菊苷浓度在12.83~205.20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.4.2 毛蕊花糖苷标准曲线的绘制 分别吸取“2.1”项下对照品溶液各12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μL ,用80%甲醇定容至5 mL容量瓶,制成系列混合对照品溶液,按“2.3”项下方法测定,以峰面积为纵坐标,对照品溶液质量浓度为横坐标进行线性回归,得毛蕊花糖苷的线性回归方程 $Y=25\ 431X-12\ 768$, $r=0.999\ 3$,毛蕊花糖苷浓度在0.56~8.96 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 吸取“2.1”项下对照品溶液20 μL ,按“2.3”项下方法测定3次,测得松果菊苷峰面积的RSD为1.4%、毛蕊花糖苷峰面积的RSD为1.7%,表明方法精密度良好。

2.6 重现性试验 取同一批芙蓉润肠口服液(批号为150538)样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,平行制备3份供试品溶液,按“2.3”项下方法测定,测得松果菊苷峰面积的RSD为1.3%,毛蕊花糖苷峰面积的RSD为1.4%,表明方法的重现性良好。

2.7 稳定性试验 取同一批号供试品溶液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下方法测定,分别于0、2、4、8、16、24 h测定,松果菊苷与毛蕊花糖苷峰面积值的RSD分别为1.6%和1.8%。

2.8 加样回收率试验 取9份含量已知的芙蓉润肠口服液,分别加入等量低浓度(松果菊苷41.04 μg ,毛蕊花糖苷1.79 μg)、中浓度(松果菊苷51.30 μg ,毛蕊花糖苷2.24 μg)、高浓度(松果菊苷61.65 μg ,毛蕊花糖苷2.69 μg)的混合对照品溶液,按“2.3”项下方法测定,计算加样回收率。测得松果菊苷平均加样回收率为99.9%,RSD为1.2%,毛蕊花糖苷平均加样回收率为100.3%,RSD为1.3%。见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=3$)

成分	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	平均回收率/%	RSD/%
松果菊苷	51.30	41.04	92.03	99.2	1.1
	51.30	51.30	103.20	101.2	0.8
	51.30	61.56	112.52	99.4	1.5
毛蕊花糖苷	2.24	1.79	4.00	98.3	1.6
	2.24	2.24	4.52	101.8	1.0
	2.24	2.69	4.95	100.7	1.1

2.9 样品含量测定 按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件测定4个批号的芙蓉润肠口服液各3份。结果4个批次芙蓉润肠口服液中

松果菊苷的质量浓度分别为1 157.46、343.86、905.54、1 527.40 $\mu\text{g/mL}$,平均质量浓度为983.57 $\mu\text{g/mL}$;毛蕊花糖苷的质量浓度分别为42.87、27.54、48.73、92.21 $\mu\text{g/mL}$,平均质量浓度为52.84 $\mu\text{g/mL}$ 。见表2。

表2 芙蓉润肠口服液中松果菊苷与毛蕊花糖苷质量浓度测定结果($n=3$)

批号	松果菊苷/ $(\mu\text{g/mL})$	毛蕊花糖苷/ $(\mu\text{g/mL})$
120534	1 157.46	42.87
141042	343.86	27.54
141232	905.54	48.73
150538	1 527.40	92.21

3 讨论

近年来,对肉苁蓉生药、商品药材及部分复方制剂中松果菊苷和毛蕊花糖苷进行的HPLC法测定的报道较多^[8-10],但对芙蓉润肠口服液中相关成分含量测定的报道尚不多见。本研究实验发现,不同批号之间毛蕊花糖苷含量与松果菊苷含量差异大,且同一批次中毛蕊花糖苷含量均较松果菊苷低,分析原因可能有以下几点:(1)肉苁蓉生长环境不同:目前肉苁蓉野生资源濒临枯竭,需依靠人工栽培的肉苁蓉来满足国内外与日俱增的市场需求。但人工栽培和野生肉苁蓉在生长环境、年限以及采收加工方式上均有一定的差异,其药材有效成分含量也存在着差异。据徐荣等^[11]等研究,人工栽培肉苁蓉中松果菊苷含量高于毛蕊花糖苷含量,而野生肉苁蓉中2种苷类成分的含量是较为接近的。本研究结果显示,不同批次药品中毛蕊花糖苷含量均低于松果菊苷含量,推测芙蓉润肠口服液中使用的肉苁蓉可能为人工栽培。(2)肉苁蓉品系不同:正品肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. D. Ma,而全国不少地区将同属植物盐生肉苁蓉 *C. salsa* (C. A. Mey) C. Beck 和管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) R. Wight 也作为肉苁蓉入药。王义明等^[12]相关研究表明,苯乙醇苷类化合物含量在3种肉苁蓉中存在较大差异。因此本研究中各个批次间松果菊苷与毛蕊花糖苷的含量差异较大,可能由入药的肉苁蓉品系不同所导致。(3)光敏感性:松果菊苷与毛蕊花糖苷都是易分解的成分,对强光较敏感,不同批次供试品制备时可能因实验室光线强度不同或供试品保存时间不尽一致,使各批次含量测定结果差异较大。

综上所述,本研究使用HPLC法测定芙蓉润肠口服液中松果菊苷与毛蕊花糖苷,该法灵敏度高、重现性好、结果准确、方便易行,适用于芙蓉润肠口服液中松果菊苷与毛蕊花糖苷的测定。

(下转892页)

表 4 睡眠质量影响因素分析

自变量	β 值	标准误	wald 值	P 值	OR (95% CI)
性别					
男性	—	—	—	—	1
女性	0.571	0.213	7.152	0.007	1.770(1.165~2.689)
年龄/岁					
<60	—	—	—	—	1
60~70	0.308	0.195	2.506	0.113	1.361(0.929~1.993)
>70	0.517	0.219	5.569	0.018	1.677(1.092~2.578)
慢病数					
无	—	—	—	—	1
1 种	0.438	0.239	3.366	0.067	1.550(0.971~2.474)
2 种	0.349	0.255	1.868	0.172	1.417(0.860~2.336)
3 种以上	0.73	0.228	10.274	0.001	2.074(1.328~3.241)

不同性别、年龄、文化程度、月收入以及慢病数 PSQI 得分存在差异。女性虽然在睡眠时间上与男性没有差别,但其睡眠质量 PSQI 得分高于男性,多因素分析调整其他因素后,女性发生睡眠质量差的风险是男性的 1.770 倍,这与国内外的研究一致^[7]。这可能与老年人生活中诸如退休、疾病、子女等负面问题较多,而女性的承受能力较弱有关。70 岁以上老年人 PSQI 得分为(6.61±3.91)分,高于其他年龄组,多因素分析调整其他因素后,70 岁以上老年人发生睡眠质量差的风险是 60 岁以下人群的 1.677 倍。随着年龄增大,老年人躯体功能下降,年龄越大各器官退行性病变也越严重,从而导致睡眠质量下降。而文化程度低的老年人对如何保健及科学的睡眠知识缺乏了解^[12],导致其睡眠质量低于文化程度高的老年人。经济收入直接影响人的幸福感,而心里幸福感与睡眠质量呈正相关^[13],因此月收入越高的人睡眠质量越好。老年人的睡眠质量与慢病的发生发展密切相关,相互促进,慢病患者的睡眠质量远低于健康老年人^[14-15],本研究中发现患有 3 种以上慢病的老年人睡眠质量得分最高,在调整了其他因素影响后,患 3 种以上慢病者睡眠质量差发生的风险是健康老年人的 2.074 倍。

因此,提高老年人睡眠质量的有效措施包括对

老年人的心理进行有效疏导,使其保持乐观健康向上的生活态度;其次改善其本身的健康状况,通过健康教育使其加强自身保健有良好的生活习惯,运动习惯,以减少慢病的发生,提高医疗水平,减轻疾病带来的痛苦;从家庭和社会两个方面提高女性的地位,对其增加人文关怀,减轻其心理负担,从而减少睡眠障碍发生,提高生活质量。

参考文献:

- [1] 王婷,张艳秋,谷多.长春市社区老年人抑郁现状及影响因素[J].中国老年学杂志,2015,35(11):3120-3121.
- [2] 戴悦,张宝泉,李映兰,等.中国老年人睡眠质量与抑郁、焦虑相关性的 meta 分析[J].中华护理杂志,2016,51(4):488-493.
- [3] 李洋,钟玉杰,吴悠,等.长春市老年人睡眠质量及其影响因素[J].中国老年学杂志,2015,35(13):3725-3727.
- [4] 温丽雅,陈长香,李淑杏.老年人睡眠质量的相关因素分析[J].现代预防医学,2010,37(15):2871-2872.
- [5] 翟力蕊,陈长香,高甜,等.夜间睡眠时间对老年人健康状况的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(12):3412-3413.
- [6] BUYASSE D J, REYNOLDS C F, MONK T H, et al. The pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research[J]. Psychiatry research, 1989, 28(2):193-213.
- [7] 李洋,钟玉杰.老年人睡眠质量的影响因素及护理对策[J].中国老年学杂志,2015,35(14):4088-4090.
- [8] ROBERTS R E, SHEMA S J. Sleep complaints and depression in an aging cohort: A prospective perspective[J]. American journal of psychiatry, 2000, 157(1):81.
- [9] 李亚宁,陈长香,李建民.不同地区老年人睡眠质量及相关因素分析[J].现代预防医学,2007,34(6):1015-1016.
- [10] 王群,李小妹.西安市社区老年人睡眠质量及其影响因素研究[J].护理研究,2012,26(7):591-594.
- [11] 叶猛飞,丁春丽,俞瑶瑶,等.浙江省农村老年人睡眠质量及其影响因素[J].中国老年学杂志,2016,36(5):1183-1185.
- [12] 陈长香,李建民,王静.22 省(市)老年人睡眠障碍现状调查[J].中国健康心理学杂志,2007,15(2):188-189.
- [13] 李艳玲,张文英,吕亚静.老年人积极情感、心理幸福感与良好睡眠的关系[J].中国老年学杂志,2012,32(3):578-580.
- [14] 胡荣,林建龙,黄丽等.老年慢性病居家患者夜间睡眠质量及影响因素[J].中国老年学杂志,2015,35(9):2513-2516.
- [15] 杨馥,徐辉,巢健茜,等.老龄化背景下慢性病对老年人健康状况的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(18):5277-5279.

[收稿日期:2017-09-27]

(本文编辑 张巧莲)

(上接 888 页)

参考文献:

- [1] 楼金艳.芪蓉润肠口服液联合聚乙二醇 4000 散治疗老年人慢性便秘[J].中国社区医师,2018,34(8):108-110.
- [2] 杜秋,吴霞.基于阳虚便秘模型的肉苁蓉通便作用的量效关系及机制研究[J].中南药学,2016,14(1):23-27.
- [3] 张岩.高效液相色谱法测定宽肠理气汤中松果菊苷和毛蕊花糖苷[J].中草药,2010,41(12):1994-1995.
- [4] 屠鹏飞,张正高.肉苁蓉类生药中苯乙醇甙类成分的 RP-HPLC[J].药学学报,1997,32(4):294-296.
- [5] 吾买尔江·牙合甫,姚刚.肉苁蓉功效的实验研究进展[J].湖南中医杂志,2016,32(4):193-195.
- [6] JIA Y M, GUAN Q N. Echinacoside stimulates cell proliferation and prevents cell apoptosis in intestinal epithelial MODE-K cells by up-regulation of transforming growth factor- β 1 expression[J]. Pharmacol Sci, 2012, 118(1): 99-108.
- [7] 韩丽娟,巩江,骆蓉芳,等.中药毛蕊花研究现状[J].安徽农

业科学,2010,38(26):14346-14347.

- [8] 刘雄,吴蓉,余晓晖,等. HPLC 法测定不同产地肉苁蓉中松果菊苷的含量[J].甘肃中医学院学报,2009,26(5):42-44.
- [9] 张贵财,朱旭江,杜兴,等. HPLC 法测定兰州肉苁蓉中毛蕊花糖苷的含量[J].中国药事,2010,24(8):801-803.
- [10] 尹明,牟娟,肖华芬,等. HPLC 法测定蜜桶花颗粒中毛蕊花糖苷的含量[J].中药新药与临床药理,2008,19(6):485-487.
- [11] 徐荣,朱维成,陈君,等.栽培与野生肉苁蓉主要有效成分比较研究[J].中国药学杂志,2011,46(12):903-906.
- [12] 王义明,张思巨,罗国安,等.用 LC/ESI-MS/MS 研究肉苁蓉与其代用品中的苯乙醇苷类化合物[J].药学学报,2000,35(11):839-842.

[收稿日期:2017-07-09]

(本文编辑 施洋)