

基于5种特征性成分综合评价二至丸的质量

范妙璇, 谭成, 王萌萌, 杜小伟, 刘颖, 王京辉, 陈有根, 傅欣彤*
(北京市药品检验所 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

[摘要] **目的:** 建立二至丸中5种特征性成分特女贞苷、红景天苷、酪醇、木犀草素、蟛蜞菊内酯同时检测的含量测定方法, 并据此评价所收集的11批二至丸样品的质量。**方法:** 采用 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 10%~30% A; 15~25 min, 30%~33% A; 25~30 min, 33% A)。流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 225 nm 和 349 nm, 柱温 30 °C。**结果:** 5个成分的分度良好, 红景天苷、酪醇、特女贞苷、木犀草素和蟛蜞菊内酯的线性范围依次为 202.55~12 153, 84.55~5 073, 244.30~14 657.72, 2.56~153.72, 2.32~139.2 ng。加样回收率平均值处于 95.61%~103.47%, RSD 均 < 2.0%。**结论:** 建立的含量测定方法简便、准确, 重复性好, 可用于市售二至丸样品的含量测定和质量控制。11批样品中5个特征性成分含量差异较大, 特女贞苷含量差异 > 60倍, 最低值 0.15 mg·g⁻¹, 最高值 10.22 mg·g⁻¹, 其原因可能与原料质量和执行标准等因素有一定关系。

[关键词] 二至丸; 女贞子; 墨旱莲; 特女贞苷; 质量控制; 蟛蜞菊内酯

[中图分类号] R22; R289; R283.6; R284; R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0088-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181607

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1126.004.html>

[网络出版时间] 2018-05-24 13:46

Comprehensive Evaluation of Quality of Erzhiwan Based on Five Characteristic Components

FAN Miao-xuan, TAN Cheng, WANG Meng-meng, DU Xiao-wei, LIU Ying,
WANG Jing-hui, CHEN You-gen, FU Xin-tong*
(Beijing Key Laboratory of Composition Analysis and Bioassessment of Chinese Medicine,
Beijing Institute of Drug Control, Beijing 102206, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the quantity of 11 batches of Erzhiwan samples by establishing a HPLC method for simultaneous determination of five characteristic components (specnuezhenide, salidroside, tyrosol, luteolin and wedelolactone) in this preparation. **Method:** Phenomenex Gemini C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was employed with mobile phase of acetonitrile-0.2% formic acid solution for gradient elution (0-15 min, 10%-30% A; 15-25 min, 30%-33% A; 25-30 min, 33% A), flow rate was 1 mL·min⁻¹, detection wavelengths were 225 nm and 349 nm, column temperature was set at 30 °C. **Result:** Salidroside, tyrosol, specnuezhenide, luteolin and wedelolactone were well separated with linear ranges of 202.55-12 153, 84.55-5 073, 244.30-14 657.72, 2.56-153.72, 2.32-139.2 ng, respectively; their average recovery rates were between 95.61% to 103.47% with RSD < 2.0%. **Conclusion:** This determination of five components is simple, accurate and reproducible for the quality control of Erzhiwan. The contents of these five components in 11 batches of samples are quite different. The content of specnuezhenide in samples is ranged from 0.15 mg·g⁻¹ to

[收稿日期] 20170926(011)

[基金项目] 2013年国家药品计划抽验专项

[第一作者] 范妙璇, 硕士, 主管药师, 从事中药质量分析研究, Tel:010-52779500, E-mail: fmxzhy@126.com

[通信作者] * 傅欣彤, 硕士, 主任药师, 从事中药质量分析研究, Tel:010-52779500, E-mail: fuxintong68@163.com

10.22 mg · g⁻¹, which may be caused by the materials, the operative norms and other factors.

[**Key words**] Erzhiwan; Ligustri Lucidi Fructus; Ecliptae Herba; specnuezhenide; quality control; wedelolactone

二至丸出自明代《扶寿精方》^[1],为经典名方,具有悠久的临床应用历史。由酒女贞子、墨旱莲 2 味中药等比例组成^[2]。因女贞子冬至日采收,墨旱莲夏至采收,因此得名——二至丸^[3]。该方具有补益肝肾、滋阴止血等功效,临床用于治疗肝肾阴虚、咽干鼻燥、眩晕耳鸣、腰膝酸痛、月经量多等^[4]。二至丸的制备方法为酒女贞子粉碎成细粉,墨旱莲用水提取后浓缩,与酒女贞子细粉共制成浓缩水蜜丸^[3]。现代研究表明二至丸中含有三萜皂苷类成分(旱莲苷 A 和旱莲苷 D 等),对羟基苯乙醇类成分(红景天苷、酪醇等),环烯醚萜类成分(特女贞苷、女贞苷等^[5]),黄酮类成分(木犀草素、木犀草苷、芹菜素等)和香豆草醚类成分(蟛蜞菊内酯、异蟛蜞菊内酯等^[6])。该制剂具有免疫调节^[7]、抗衰老^[8]、保肝降酶^[9]、抗骨质疏松、抗癌、抗炎、抗氧化^[10]等作用。

目前,针对二至丸的化学成分含量测定研究多集中在女贞子中特女贞苷及非特征成分齐墩果酸和熊果酸方面^[11]。虽然有文献采用 HPLC 同时测定了二至丸中女贞苷、特女贞苷、蟛蜞菊内酯和齐墩果酸 4 个成分的含量^[12]以及二至丸中红景天苷、女贞子苷和蟛蜞菊内酯 3 个成分^[5]的含量,但选择的紫外检测波长分别为 215 nm 和 220 nm,对于最大吸收在 349 nm 的蟛蜞菊内酯等化合物的含量测定存在误差风险。本实验针对该制剂的 5 种特征成分特女贞苷、红景天苷、酪醇、木犀草素、蟛蜞菊内酯同时进行 HPLC 含量测定方法学研究,利用双紫外波长(225 nm 和 349 nm)检测方法建立该制剂的定性定量控制方法,并用于 11 批样品的检测中,为该制剂制定更为合理的质量控制标准提供了依据。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。特女贞苷、蟛蜞菊内酯、红景天苷、酪醇、木犀草素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111926-201404, 111885-201403, 110818-201507, 111676-200602, 111968-201301, 纯度分别为 97.3%, 99.6%, 99.4%, 100%, 93.3%),二至丸样品(编号 1~11,分别来自于安徽、吉林、宁夏、山西、贵州、江苏、江西等省及自治区的经销企业),水为高纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 10%~30% A; 15~25 min, 30%~33% A; 25~30 min, 33% A)。流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 225 nm 和 349 nm,柱温 30 °C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取红景天苷、酪醇、特女贞苷、木犀草素、蟛蜞菊内酯对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 200, 80, 250, 2, 2 mg · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品粉末(过三号筛)约 1~2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 75% 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,即得。

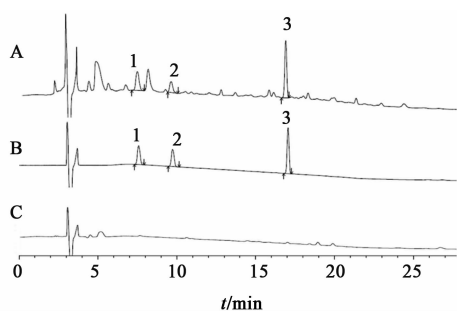
2.3 色谱条件的优化

2.3.1 测定波长的确定 根据紫外全波长扫描图,确定红景天苷、酪醇和特女贞苷的检测波长选择 225 nm,木犀草素和蟛蜞菊内酯的检测波长确定为 349 nm。

2.3.2 甲酸体积分数的确定 分别选取体积分数为 0.1%, 0.2%, 0.5% 的甲酸水溶液作为流动相 B,按 2.1 项下方法进样分析,结果发现选择 0.1% 甲酸水溶液时,指标成分的保留时间偏大,且分离效果较差;另外 2 个体积分数下,色谱峰的分离效果较好,且甲酸体积分数选择 0.2% 与 0.5% 时无明显差别,故最终选用 0.2% 甲酸水溶液作为流动相 B。

2.4 系统适应性试验 按处方中药味的比例,分别配制不含女贞子的群药和不含墨旱莲的群药,按其工艺制成空白制剂,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果发现空白溶液在红景天苷、酪醇、特女贞苷、木犀草素、蟛蜞菊内酯对照品相同保留时间处没有色谱峰,故认为无干扰,见图 1~2。

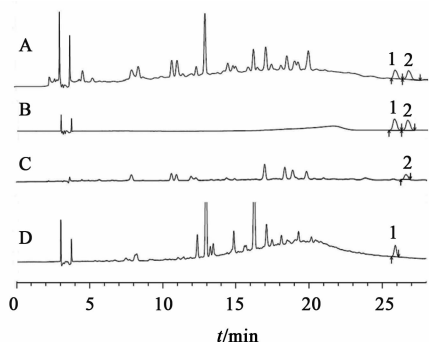
2.5 线性关系考察 分别精密吸取含红景天苷(202.55 mg · L⁻¹),酪醇(84.55 mg · L⁻¹),特女贞苷(244.30 mg · L⁻¹),木犀草素(2.56 mg · L⁻¹)和蟛蜞菊内酯(2.32 mg · L⁻¹)的混合对照品溶液 1, 2, 4, 6,



A. 供试品; B. 对照品; C. 缺女贞子阴性; 1. 红景天苷; 2. 酪醇; 3. 特女贞苷

图1 二至丸样品1在225 nm处的HPLC色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of Erzhiwan sample 1 at 225 nm



A. 供试品; B. 对照品; C. 缺女贞子阴性; D. 缺墨旱莲阴性; 1. 木犀草素; 2. 虻蜚菊内酯

图2 二至丸样品1在349 nm处的HPLC色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of Erzhiwan sample 1 at 349 nm

8, 10, 15 μL , 分别精密吸取含红景天苷 ($810.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 酪醇 ($338.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 特女贞苷 ($977.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 木犀草素 ($10.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和虻蜚菊内酯 ($9.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的混合对照品溶液 5, 7.5, 10, 15 μL , 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得红景天苷、酪醇、特女贞苷、木犀草素和虻蜚菊内酯的回归方程分别为 $Y = 648\ 906X + 118\ 924$ ($r = 0.999\ 7$), $Y = 1\ 573\ 202X + 62\ 647$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 1\ 102\ 932X + 78\ 172$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 4\ 112\ 243X + 331$ ($r = 1.000$), $Y = 4\ 331\ 178X + 455$ ($r = 1.000$), 线性范围依次为 202.55 ~ 12 153, 84.55 ~ 5 073, 244.30 ~ 14 657.72, 2.56 ~ 153.72, 2.32 ~ 139.2 ng。

2.6 稳定性试验 取同一二至丸供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24, 32 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果 5 个指标成分峰面积的 RSD 0.1% ~ 0.5%, 表明供试品溶液在 32 h 内稳定。

2.7 精密度试验 取上述同一混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 结果红景天苷、酪

醇、特女贞苷、木犀草素和虻蜚菊内酯峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 0.3%, 0.3%, 0.5% 和 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一二至丸样品 (样品 1), 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果红景天苷、酪醇、特女贞苷、木犀草素和虻蜚菊内酯的平均质量分数分别为 3.009, 0.743, 3.604, 0.028, 0.028 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 均 < 1.0%, 表明该方法重复性较好。

2.9 加样回收试验 精密称取同一二至丸样品 (样品 1) 9 份, 每份约 1.0 g, 精密加入一定量的红景天苷、酪醇、特女贞苷、木犀草素、虻蜚菊内酯对照品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 见表 1 ~ 5。结果表明 5 个指标成分的回收率均处于 95% ~ 104%, 且 RSD 均 < 2.0%, 说明该方法准确可行。

表1 红景天苷的加样回收试验

Table 1 Recovery test of salidroside

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%
0.993 5	2.989 2	1.265 94	4.263 2	100.64	100.93
0.992 8	2.987 1	1.265 94	4.274 2	101.67	
0.995 7	2.995 8	1.265 94	4.267 8	100.47	
0.995 4	2.994 9	2.531 88	5.404 2	95.16	95.61
0.995 2	2.994 3	2.531 88	5.411 2	95.46	
0.996 8	2.999 1	2.531 88	5.435 3	96.22	
0.991 1	2.982 0	5.063 75	8.075 1	100.58	99.86
0.997 8	3.002 1	5.063 75	8.048 1	99.65	
0.993 6	2.989 5	5.063 75	8.019 8	99.34	

注: 平均加样回收率的 RSD 均为 0.6%。

表2 酪醇的加样回收试验

Table 2 Recovery test of tyrosol

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.993 5	0.738 1	0.528 44	1.251 4	97.13	97.53	0.6
0.992 8	0.737 6	0.528 44	1.251 5	97.25		
0.995 7	0.739 7	0.528 44	1.258 7	98.22		
0.995 4	0.739 5	1.056 88	1.745 2	95.16	95.61	0.6
0.995 2	0.739 6	1.056 88	1.748 5	95.46		
0.996 8	0.740 5	1.056 88	1.757 5	96.22		
0.991 1	0.736 3	2.113 75	2.790 4	97.18	97.01	0.5
0.997 8	0.741 3	2.113 75	2.779 6	96.43		
0.993 6	0.738 2	2.113 75	2.797 4	97.42		

表 3 特女贞苷的加样回收试验

Table 3 Recovery test of specnuezhenide

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.993 5	3.580 2	1.526 85	5.115 6	100.56	100.78	0.4
0.992 8	3.577 7	1.526 85	5.124 2	101.29		
0.995 7	3.588 1	1.526 85	5.122 4	100.49		
0.995 4	3.587 0	3.053 69	6.608 4	98.94	99.36	0.6
0.995 2	3.587 8	3.053 69	6.613 7	99.09		
0.996 8	3.592 1	3.053 69	6.647 0	100.04		
0.991 1	3.571 5	6.107 38	9.506 7	97.18	97.01	0.5
0.997 8	3.595 7	6.107 38	9.485 0	96.43		
0.993 6	3.580 5	6.107 38	9.530 4	97.42		

表 4 木犀草素的加样回收试验

Table 4 Recovery test of luteolin

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.993 5	0.027 85	0.016 01	0.044 43	103.56	102.33	1.5
0.992 8	0.027 84	0.016 01	0.044 31	102.87		
0.995 7	0.027 93	0.016 01	0.044 03	100.56		
0.995 4	0.027 92	0.032 03	0.059 70	99.22	99.69	0.4
0.995 2	0.027 92	0.032 03	0.059 98	100.09		
0.996 8	0.027 96	0.032 03	0.059 91	99.75		
0.991 1	0.027 80	0.064 05	0.091 31	99.16	98.59	0.9
0.997 8	0.027 98	0.064 05	0.091 44	99.08		
0.993 6	0.027 87	0.064 05	0.090 34	97.53		

表 5 蟛蜞菊内酯的加样回收试验

Table 5 Recovery test of wedelolactone

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.993 5	0.028 05	0.014 49	0.043 16	104.28	103.47	1.1
0.992 8	0.028 02	0.014 49	0.042 82	102.14		
0.995 7	0.028 11	0.014 49	0.043 18	104.00		
0.995 4	0.028 10	0.028 98	0.057 61	101.83	101.09	1.4
0.995 2	0.028 10	0.028 98	0.056 92	99.45		
0.996 8	0.028 14	0.028 98	0.057 70	102.00		
0.991 1	0.027 98	0.057 97	0.085 69	99.55	98.26	1.4
0.997 8	0.028 17	0.057 97	0.085 21	98.40		
0.993 6	0.028 05	0.057 97	0.084 19	96.84		

2.10 样品测定 取各批次二至丸样品 1~7 约 2.0 g 和样品 8~11 约 1.0 g, 精密称定, 平行 2 份,

按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 见表 6。

表 6 二至丸样品中 5 种指标成分的含量测定 (n=2)

Table 6 Determination of five components in Erzhiwan samples

样品	mg·g ⁻¹				
	红景天苷	酪醇	特女贞苷	木犀草素	蟛蜞菊内酯
1	3.01	0.74	3.60	0.028	0.028
2	2.93	0.69	3.59	0.032	0.041
3	2.62	0.66	3.62	0.026	0.036
4	0.94	0.29	1.94	0.016	0.026
5	0.95	0.26	1.74	0.015	0.029
6	1.09	0.27	0.15	0.006	0.002
7	1.46	0.37	0.21	0.008	0.002
8	0.71	0.43	7.13	0.034	0.015
9	0.70	0.45	7.05	0.035	0.015
10	0.76	0.45	6.28	0.040	0.015
11	0.63	0.72	10.22	0.034	0.022

3 讨论

由表 6 可知, 5 个指标成分的含量在不同样本中参差不齐。5 种特征性成分中, 含量偏移最大的是特女贞苷, 最低值 0.15 mg·g⁻¹, 最高值 10.22 mg·g⁻¹; 其次变异较大的是红景天苷。女贞子的特征性成分特女贞苷和红景天苷以及墨旱莲的特征性成分蟛蜞菊内酯的含量差异在二至丸成药中均较大, 提示二至丸原料女贞子及墨旱莲的饮片质量亟待改善。同时, 特征成分含量产生较大差异的原因也可能与其生产时间不同、所执行标准不同有关。样品 1~7 生产时间为 2015 年 12 月以前, 执行标准为 2010 年版《中国药典》, 标准中含量控制指标为女贞子中的齐墩果酸, 此成分非女贞子特征性成分, 在多种植物中均有存在^[11]。样品 8~11 为 2015 年 12 月以后生产, 执行标准为 2015 年版《中国药典》, 新标准含量控制指标为女贞子特征性成分特女贞苷, 限度为 4.0 mg·g⁻¹。2015 年版《中国药典》的二至丸标准提高后, 制药企业有可能通过原料质量控制或改进工艺确保了二至丸产品的质量。本研究结果提示, 为提升二至丸的质量, 减少批间差异, 应重点加强对女贞子及墨旱莲饮片的质量控制, 从源头保障成药质量。同时, 为进一步探究二至丸的质量差异成因, 本研究还对市售的 8 批女贞子和 14 批酒女贞子进行比较, 发现二者的合格率分别为 87.50% 和 64.29%, 说明女贞子在药材饮片

也存在问题。并且发现市售的生女贞子中的特女贞苷含量普遍较高,而在酒女贞子中的含量则普遍较低,这也进一步验证了笔者所提出的应加强二至丸原料质量控制的观点。

综上所述,本研究建立了二至丸中5种特征性成分的系统含量测定方法,方法简便、结果稳定、重复性好,对女贞子和墨旱莲中的主要成分进行了控制,弥补了对墨旱莲特征性成分在含量测定上控制缺失的问题。相较于前人研究,本文在质控指标的选择及质控方法的建立上更为合理,实现了在不同波长下特征性质控指标的同时检测,也可有效区分不同执行标准下的二至丸样本。同时,本研究提出,二至丸质量差异较大的主要原因应为投料饮片含量差异,尤其是在女贞子的质量控制上应当加强^[13-14],对控制二至丸的质量具有一定的实用价值和意义。后续研究将依托此方法进一步扩大样本量,为二至丸的质量控制提供更为深入的数据支撑。

[参考文献]

[1] 吴旻. 扶寿精方[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1986:11.

[2] 王三才. 医便[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015:22.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:437-438.

[4] 蔡秀江, 黄美艳, 丁安伟, 等. 二至丸考源及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 272-274.

[5] 李泽运, 陈晓辉, 马凤, 等. RP-HPLC法同时测定二至

丸中红景天苷、女贞子苷和蟛蜞菊内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1):19.

[6] 李磷, 丁安伟, 孟丽. 二至丸免疫调节作用活性部位的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2002, 18(5):42-43.

[7] 赵雪莹, 李冀. 二至丸对D-半乳糖致衰老模型大鼠NO、NOS影响的实验研究[J]. 中医药学报, 2011, 39(5):39-40.

[8] 闫冰, 丁安伟, 张丽. 二至丸水提物对体外肝细胞损伤的保护作用[J]. 药学实践杂志, 2010, 28(6): 433-436.

[9] 邢薇薇, 张宏, 吴锦忠, 等. 二至丸对肾虚骨质疏松大鼠的影响[J]. 福建中医药, 2008, 39(6):45-47.

[10] 薛娣, 王卫娜. 二至丸对老年痴呆小鼠抗氧化能力的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(20): 1550-1551.

[11] 刘菊, 白明学, 张红伟, 等. 反相高效液相色谱法测定二至丸中特女贞苷的含量[J]. 中南药学, 2016, 14(2):794-796.

[12] 何睦, 姚卫峰, 张丽, 等. 高效液相色谱法同时测定二至丸中4种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5):594-596.

[13] 肖永庆, 李丽, 刘颖, 等. 制定中药饮片行业标准, 促进中药饮片产业发展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6):216-218.

[14] 张村, 刘颖, 肖永庆. 加强中药材生产管理, 稳定中医药产品质量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):1-4.

[责任编辑 刘德文]