

双波长HPLC法同时测定滋补肝肾丸中4种成分的含量

王玉娟^{1*},陶利¹,崔苏镇¹,梁竹¹,周金辉^{2#}(1.济南军区总医院药剂科,济南 250031;2.济宁医学院药学院,山东日照 276000)

中图分类号 R446.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4266-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.32

摘要 目的:建立同时测定滋补肝肾丸中女贞苷、特女贞苷、异去甲蟞蜩菊内酯和蟞蜩菊内酯含量的方法。方法:采用双波长高效液相色谱法。色谱柱为Elite C₁₈,流动相为乙腈-0.5%醋酸溶液(梯度洗脱),流速为0.9 ml/min,柱温为25℃,检测波长0~30 min为224 nm,30~50 min为351 nm,进样量为20 μl。结果:女贞苷、特女贞苷、异去甲蟞蜩菊内酯和蟞蜩菊内酯质量浓度分别在6.75~135.00、6.54~130.80、4.90~98.00、6.42~128.40 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 5$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 4$ 、 $0.999\ 6$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.25%;加样回收率为96.15%~99.96%,RSD<2%($n=6$)。结论:该方法快速、灵敏、准确,可用于滋补肝肾丸中女贞苷、特女贞苷、异去甲蟞蜩菊内酯和蟞蜩菊内酯的含量测定。

关键词 滋补肝肾丸;女贞苷;特女贞苷;异去甲蟞蜩菊内酯;蟞蜩菊内酯;双波长高效液相色谱法

Simultaneous Determination of the Contents of 4 Ingredients in Zibu Ganshen Pill by Dual-wavelength HPLC

WANG Yu-juan¹, TAO Li¹, CUI Su-zhen¹, LIANG Zhu¹, ZHOU Jin-hui²(1.Dept. of Pharmacy, the General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China; 2.School of Pharmacy, Jining Medical University, Shandong Rizhao 276000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of the contents of ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone and wedelolactone in Zibu ganshen pill. METHODS: Dual-wavelength HPLC was performed on the column of Elite C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.5% acetic acid (gradient elution) at flow rate of 0.9 ml/min, column temperature was 25℃, detection wavelengths were 224 nm(0-30 min) and 351 nm (30-50 min), and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 6.75-135.00 μg/ml($r=0.999\ 5$) for ligustroflavone, 6.54-130.80 μg/ml($r=0.999\ 8$) for specnuezhenide, 4.90-98.00 μg/ml($r=0.999\ 4$) for demethylwedelolactone and 6.42-128.40 μg/ml($r=0.999\ 6$) for wedelolactone; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.25%; average recoveries were 96.15%-99.96% (RSD<2%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is rapid, sensitive and accurate, and can be used for the contents determination of ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone and wedelolactone in Zibu ganshen pill.

KEYWORDS Zibu ganshen pill; Ligustroflavone; Specnuezhenide; Demethylwedelolactone; Wedelolactone; Dual-wavelength HPLC

表3 10批次毛鸡骨草种子各共有峰相对峰面积

Tab 3 Relative peak areas of the 10 batches of *A. mollis* seed

峰号	编号										RSD, %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.96	1.00	0.99	1.01	0.99	0.99	1.02	0.97	1.04	0.99	2.33
2	0.08	0.06	0.07	0.07	0.06	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	9.52
3	0.09	0.04	0.06	0.04	0.04	0.05	0.03	0.06	0.04	0.03	37.78
4	1.64	0.65	1.12	0.80	0.84	1.16	0.95	1.48	1.41	1.05	28.81
5	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.04	11.58
6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
7	0.18	0.08	0.12	0.10	0.10	0.11	0.09	0.14	0.15	0.11	25.83
8	0.29	0.28	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.29	0.29	0.29	1.63
9	0.10	0.04	0.06	0.04	0.04	0.06	0.04	0.08	0.05	0.04	37.61
10	1.02	0.47	0.67	0.51	0.52	0.82	0.68	1.03	0.84	0.66	27.88
11	0.23	0.12	0.15	0.13	0.14	0.20	0.18	0.26	0.18	0.15	26.01
12	0.54	0.43	0.45	0.42	0.44	0.46	0.46	0.49	0.48	0.47	7.41

* 药师。研究方向:药事管理与药物分析。E-mail: zhoujin-huilunwen1@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:药物合成与药物分析。电话:0633-2983691。E-mail: zhoujinhuilunwen1@163.com

综上所述,本研究从10批次毛鸡骨草种子中确定了12个共有特征峰,相似度均>0.9;所建立的毛鸡骨草种子指纹图谱具有专属性,可为其鉴别和质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 中国科学院植物志编委会.中国植物志[M].北京:北京科学出版社,1984:190.
- [2] 《中华本草》编委会.中华本草:第4卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:305.
- [3] 严永清,余传隆,黄泰康,等.中药辞海:第1卷[M].北京:中国医药科技出版社,1996:1114.
- [4] 温晶,史海明,屠鹏飞.毛鸡骨草的化学成分研究[J].中草药,2006,5(12):234.
- [5] 史海明,黄志勤,温晶,等.毛鸡骨草中新的异黄酮[J].中国天然药物,2006,1(12):35.
- [6] 陈晓白,莫志贤,甘耀坤,等.毛鸡骨草对高脂血症模型大鼠血脂和肝脂的影响[J].中国药房,2010,21(3):202.

(收稿日期:2015-04-29 修回日期:2015-07-31)

(编辑:张静)

滋补肝肾丸处方出自《国家药品标准中药成方制剂》(第一册)^[1],由女贞子、墨旱莲、当归、熟地黄、何首乌(黑豆、酒炙)、五味子(醋炙)、北沙参、麦冬、续断、陈皮、浮大麦等11味药物组成,具有滋补肝肾、养血柔肝的功效,常用于治疗肝肾阴虚、头晕失眠、心悸乏力、胁痛、午后低烧以及慢性肝炎、慢性肾炎而见阴虚证等。女贞子和墨旱莲为本方中的主要药物,原滋补肝肾丸标准未对其进行定量研究^[2],而定性的标准并不能有效地控制本方的质量。因此,本试验采用双波长高效液相色谱(HPLC)法测定了滋补肝肾丸中主药女贞子所含女贞苷、特女贞苷和墨旱莲所含异去甲蟛蜞菊内酯、蟛蜞菊内酯的含量,以为完善滋补肝肾丸制剂的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1322A脱气机、G1311A四元泵、G1329A自动进样器、G1315B可变波长检测器、Agilent Chemstation色谱工作站(美国安捷伦公司);KJ-SY-150型超声波提取器(北京同德创业科技有限公司);XP205电子天平(精度:0.01 mg,瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

滋补肝肾丸(批号:13012652、14010036、14010951,规格:9 g/丸)购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂;女贞苷对照品(批号:111918-201102,纯度:88.6%)、特女贞苷对照品(批号:111926-201203,纯度:96.4%)、蟛蜞菊内酯对照品(批号:111885-201403,纯度:99.6%)均购自中国食品药品检定研究院;异去甲蟛蜞菊内酯对照品(批号:6468-55-9,纯度:98.0%)购于上海士锋生物科技有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯)购自天津市大茂化学试剂厂;醋酸(分析纯)购自济宁恒泰化工有限公司;水为双重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Elite C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~12 min, 20.0% A; 12~30 min, 20.0%→35.0% A; 30~42 min, 35.0%→45.0% A; 42~50 min, 45.0%→20.0% A)^[3-7];流速:0.9 ml/min;柱温:25℃;检测波长:0~30 min为224 nm^[8-9], 30~50 min为351 nm^[10];进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取女贞苷、特女贞苷、异去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯对照品各适量,置于4个20 ml量瓶中,加50%甲醇溶解并定容,制成女贞苷、特女贞苷、异去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯质量浓度分别为0.675、0.654、0.490、0.642 mg/ml的对照品贮备液。分别吸取上述对照品贮备液1.0、2.5、1.5、2.5 ml,置于同一50 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得女贞苷、特女贞苷、异去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯质量浓度分别为0.013 5、0.032 7、0.014 7、0.032 1 mg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取滋补肝肾丸适量,剪碎,精密称取6.0 g,置于50 ml具塞锥形瓶中,加入50%甲醇50 ml,称定总质量并记录,超声(功率:300 W,频率:35 kHz)处理30 min,取出,自然冷却,再次称定总质量,以50%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按照滋补肝肾丸处方中各药比例,分

别称取除女贞子的其余药味、除墨旱莲的其余药味各一份,分别制备缺女贞子和缺墨旱莲的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备,即得缺女贞子的阴性对照溶液和缺墨旱莲的阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别精密吸取“2.2”项下供试品溶液、混合对照品溶液、缺墨旱莲的阴性对照溶液、缺女贞子的阴性对照溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,供试品溶液在混合对照品溶液色谱相应的保留时间处有相同的吸收峰;但缺女贞子的阴性对照溶液色谱中未显示女贞苷和特女贞苷吸收峰,缺墨旱莲的阴性对照溶液色谱中未显示异去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯吸收峰。

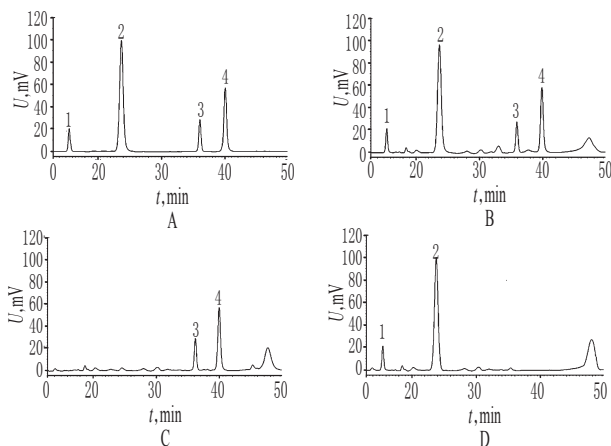


图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.缺女贞子的阴性对照溶液;D.缺墨旱莲的阴性对照溶液;1.女贞苷;2.特女贞苷;3.异去甲蟛蜞菊内酯;4.蟛蜞菊内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance solution; B.samples solution; C.negative solution without *Ligustri lucidum*; D.negative solution without *Ecliptae herba*; 1.ligustroflavone; 2.specnuezhenide; 3.demethylwedelolactone; 4.wedelolactone

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下制备的对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 ml,分别置于10 ml量瓶中并用甲醇定容,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得女贞苷回归方程为 $y=5.9813 \times 10^4 x + 219.7$ ($r=0.9995$),特女贞苷回归方程为 $y=2.1642 \times 10^5 x - 513.2$ ($r=0.9998$),异去甲蟛蜞菊内酯回归方程为 $y=8.0165 \times 10^4 x + 359.1$ ($r=0.9994$),蟛蜞菊内酯回归方程为 $y=1.2476 \times 10^5 x - 199.8$ ($r=0.9996$)。结果表明,女贞苷、特女贞苷、异去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯的质量浓度分别在6.75~135.00、6.54~130.80、4.90~98.00、6.42~128.40 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定。结果,女贞苷、特女贞苷、异去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯峰面积的RSD分别为0.46%、1.12%、0.73%、1.25% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一滋补肝肾丸样品(批号:13012652)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0.2、4、8、12、24

h时进样测定。结果,女贞苷、特女贞苷、异去甲蟾蜍菊内酯和蟾蜍菊内酯峰面积的RSD分别为0.98%、0.73%、1.19%、0.56%(n=6),表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

称取同一批号的滋补肝肾丸(批号:13012652)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,每丸含女贞苷、特女贞苷、异去甲蟾蜍菊内酯和蟾蜍菊内酯的量分别为0.981、2.448、1.134、2.331 mg, RSD分别为1.05%、0.87%、1.24%、0.36%(n=6),表明本方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

称取已知含量的滋补肝肾丸(批号:13012652)适量(女贞苷为0.109 mg/g、特女贞苷为0.273 mg/g、异去甲蟾蜍菊内酯为0.126 mg/g、蟾蜍菊内酯为0.258 mg/g),剪碎,取3.0 g,精密称定,共6份,分别置于50 ml具塞锥形瓶中,加入对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品试液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率及其RSD,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取3批滋补肝肾丸样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算4种成分的含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的优化

笔者在试验过程中曾考察了不同溶剂、超声提取时间对样品所测指标成分提取效果的影响。提取溶剂分别选取甲

表1 加样回收率试验结果(n=6)

待测成分	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
女贞苷	3.019 2	0.329 1	0.337 5	0.665 7	99.73	97.86	1.74
	2.994 3	0.326 4	0.337 5	0.652 3	96.56		
	2.988 6	0.325 8	0.337 5	0.660 1	99.05		
	3.020 7	0.329 3	0.337 5	0.653 8	96.15		
	3.015 5	0.328 7	0.337 5	0.664 2	99.41		
	3.009 6	0.328 0	0.337 5	0.652 9	96.27		
特女贞苷	3.019 2	0.824 2	0.817 5	1.630 2	98.59	98.98	1.25
	2.994 3	0.817 4	0.817 5	1.633 8	99.87		
	2.988 6	0.815 9	0.817 5	1.623 7	98.81		
	3.020 7	0.824 7	0.817 5	1.641 9	99.96		
	3.015 5	0.823 2	0.817 5	1.614 3	96.77		
	3.009 6	0.821 6	0.817 5	1.638 2	99.89		
异去甲蟾蜍菊内酯	3.019 2	0.380 4	0.367 5	0.735 8	96.71	98.04	1.13
	2.994 3	0.377 3	0.367 5	0.740 1	98.72		
	2.988 6	0.376 6	0.367 5	0.741 6	99.32		
	3.020 7	0.380 6	0.367 5	0.738 9	97.50		
	3.015 5	0.380 0	0.367 5	0.736 5	97.01		
	3.009 6	0.379 2	0.367 5	0.742 9	98.97		
蟾蜍菊内酯	3.019 2	0.779 0	0.802 5	1.561 4	97.50	96.88	0.80
	2.994 3	0.772 5	0.802 5	1.559 8	98.11		
	2.988 6	0.771 1	0.802 5	1.547 9	96.80		
	3.020 7	0.779 3	0.802 5	1.551 6	96.24		
	3.015 5	0.778 0	0.802 5	1.549 7	96.16		
	3.009 6	0.776 5	0.802 5	1.550 7	96.47		

表2 样品含量测定结果(n=3, mg/丸)

Tab 2 Results of contents determination of samples (n=3, mg/pill)

批次	女贞苷		特女贞苷		异去甲蟾蜍菊内酯		蟾蜍菊内酯	
	平均含量	RSD, %	平均含量	RSD, %	平均含量	RSD, %	平均含量	RSD, %
13012652	0.981	0.89	2.457	1.03	1.134	0.64	2.322	0.97
14010036	1.039	0.73	2.498	0.80	1.092	0.78	2.195	0.39
14010951	1.102	0.93	2.504	0.98	1.301	0.54	2.463	0.66

醇、乙醇、50%乙醇、50%甲醇进行对比试验,结果发现50%甲醇提取率优于甲醇、乙醇、50%乙醇;在功率为300 W、频率为35 kHz的超声条件下,依次处理15、30、45 min,结果发现超声提取30 min与45 min提取率差异不大,但明显高于超声提取15 min。综合评定,50%甲醇超声(功率:300 W,频率:35 kHz)提取30 min为供试品溶液制备的最优方案。

3.2 流动相的选择

在流动相的选择中,笔者考察了不同比例的乙腈-水^[3]、甲醇-水^[6]、乙腈-4%冰醋酸^[7]、乙腈-0.5%醋酸溶液为流动相进行梯度洗脱。结果,以乙腈-水为流动相梯度洗脱时,异去甲蟾蜍菊内酯和蟾蜍菊内酯与其他峰达不到基线分离;以甲醇-水为流动相梯度洗脱时,女贞苷峰形不对称,拖尾现象严重;以乙腈-4%冰醋酸为流动相梯度洗脱时,特女贞苷峰形拖尾现象严重;而以乙腈-0.5%醋酸溶液为流动相梯度洗脱时,各组分均能达到基线分离,分离度均大于2。

综上所述,本方法快速、灵敏、准确,可用于滋补肝肾丸中女贞苷、特女贞苷、异去甲蟾蜍菊内酯和蟾蜍菊内酯的含量测定。

参考文献

[1] 国家药典委员会.国家药品标准中药成方制剂:第一册[S].北京:人民卫生出版社,2004:161.
[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年

版.北京:中国医药科技出版社,2010:43、351-352、附录30、附录36.
[3] 郭丹,陈晓辉,李玫,等.反相高效液相色谱法测定女贞子中女贞子苷的含量[J].中南药学,2010,8(5):362.
[4] 杨丽萍,陈继舜,李志浩.HPLC法测定女贞二至膏中特女贞苷的含量[J].儿科科学杂志,2012,18(7):40.
[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、女贞子苷和蟾蜍菊内酯的含量[J].药物分析杂志,2011,31(1):19.
[6] 李超,李跃辉,吴艳,等.高效液相色谱法测定活血通络片中特女贞苷的含量[J].湖南中医杂志,2014,30(6):154.
[7] 顾嘉钦,朱珺.HPLC法同时测定七叶灵颗粒中特女贞苷与柚皮苷的含量[J].中国药房,2012,23(43):4 086.
[8] 封丽彬.HPLC测定生新发胶囊中特女贞苷的含量[J].中国中医药信息杂志,2013,20(12):54.
[9] 郭培果.HPLC测定参茸珍宝片中特女贞苷的含量[J].中国现代应用药学,2014,31(10):1 231.
[10] 原红霞,赵云丽,王晓英,等.反相高效液相色谱法同时测定墨旱莲中的蟾蜍菊内酯和异去甲基蟾蜍菊内酯[J].色谱,2007,25(3):371.

(收稿日期:2015-02-13 修回日期:2015-07-29)

(编辑:刘明伟)