

HPLC法测定肾复康Ⅱ号胶囊中5个成分的含量^Δ

尹继瑶^{1*}, 沈霞¹, 胡静², 崔小敏², 任慧², 曲彤², 李宁², 屈凯^{1,3#}, 陈志永^{1,2#b} (1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西咸阳 712083; 2. 陕西省中医药研究院, 西安 710003; 3. 陕西省中医医院肾病二科, 西安 710003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)15-1838-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.15.09



摘要 目的 建立同时测定肾复康Ⅱ号胶囊中莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹酚酸B和淫羊藿苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 采用Agilent 5 TC-C₁₈色谱柱,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为1 mL/min,检测波长为240 nm,进样量为10 μL。结果 莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹酚酸B和淫羊藿苷的检测质量浓度分别在4.80~240.00、4.84~242.00、7.00~350.00、4.72~236.00、5.18~259.00 μg/mL范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r \geq 0.999 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%($n=6$);平均加样回收率为97.22%~101.36%,RSD为1.19%~2.43%($n=6$)。5批样品中上述5个成分的含量范围依次为2.019 3~2.360 0、1.624 2~1.847 1、5.637 7~6.828 0、5.015 9~5.717 0、1.208 8~1.754 6 mg/g。结论 该方法简便、准确、重复性好,可用于提升肾复康Ⅱ号胶囊的质量控制水平。

关键词 肾复康Ⅱ号胶囊;含量测定;高效液相色谱法;莫诺苷;马钱苷;芍药苷;丹酚酸B;淫羊藿苷

Content determination of five constituents in Shenfukang II capsule by HPLC

YIN Jiyao¹, SHEN Xia¹, HU Jing², CUI Xiaomin², REN Hui², QU Tong², LI Ning², QU Kai^{1,3}, CHEN Zhiyong^{1,2} (1. College of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712083, China; 2. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China; 3. Dept. Two of Nephropathy, Shaanxi Provincial Chinese Medicine Hospital, Xi'an 710003, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of morroniside, loganin, paeoniflorin, salvianolic acid B and icariin in Shenfukang II capsule. **METHODS** The determination was performed on Agilent 5 TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphate acid (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 30 °C, and detection wavelength was set at 240 nm. The sample size was 10 μL. **RESULTS** The linear range of morroniside, loganin, paeoniflorin, salvianolic acid B and icariin were 4.80-240.00, 4.84-242.00, 7.00-350.00, 4.72-236.00 and 5.18-259.00 μg/mL ($r \geq 0.999 8$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3% ($n=6$). Average recoveries were 97.22% -101.36% with the RSDs of 1.19% -2.43% ($n=6$). The contents of above 5 components in 5 batches of samples were 2.019 3-2.360 0, 1.624 2-1.847 1, 5.637 7-6.828 0, 5.015 9-5.717 0 and 1.208 8-1.754 6 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** The method is simple, accurate and reproducible. It can improve the quality control level of Shenfukang II capsule.

KEYWORDS Shenfukang II capsule; content determination; HPLC method; morroniside; loganin; paeoniflorin; salvianolic acid B; icariin

肾复康Ⅱ号胶囊(陕药制字Z20130011)为陕西省中医医院的医疗机构制剂,由山茱萸、菟丝子、熟地黄、淫

Δ 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81603454); 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项课题(No.GZY-KJS-2021-005); 全国中医临床特色技术传承骨干人才培养项目; 陕西省中医药优秀中青年科技骨干人才队伍建设项目; 陕西中医药大学校级科研课题研究生创新项目(No.2021CX17)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:慢性肾病的中医证候规范化。E-mail:yy13505219957@163.com

#a 通信作者 副主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:慢性肾病的中医证候规范化。电话:029-87253062。E-mail:18792508567@163.com

#b 通信作者 副研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药质量控制与活性成分研究。电话:029-85395659。E-mail:chenzhiyong0612@sina.com

羊藿、金樱子、赤芍、丹参、黄芪、山药、王不留行、姜黄、醋鳖甲12味中药组成;其作为防治肾小球硬化的有效方剂,临床疗效显著^[1-4]。方中山茱萸能壮元气,功专补阳固阴,菟丝子可温肾固精,二者共为君药;熟地黄能滋阴填髓,淫羊藿、金樱子可温肾壮阳,三者均能助君药补肾之力;丹参、赤芍、姜黄能活血化瘀、散体内凝滞之血,黄芪、山药可补益脾气以养肾,王不留行、醋鳖甲可活血通经而散结;诸药合用,共奏益肾散结之效。

本课题组的前期研究结果显示,肾复康Ⅱ号胶囊组方及拆方均可调节Notch信号通路相关蛋白表达,从而抑制肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)的晚期凋亡,有效改善肾小球硬化症^[5];同时,其组方可抑制肾组织中纤溶酶原激活物抑制剂1和转化生

长因子 β_1 的表达,从而对抗肾间质纤维化的发生^[1,5-7];此外,肾复康Ⅱ号胶囊亦可作用于肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其受体间质表皮转化因子(c-mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met),调控间充质干细胞的旁分泌功能,起到改善肾功能的作用^[8]。为提高肾复康Ⅱ号胶囊的质量控制水平,本研究选取该制剂中各组方药材在2020年版《中国药典》(一部)^[9]中的质量控制成分,采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定山茱萸中的莫诺苷、马钱苷,赤芍中的芍药苷,丹参中的丹酚酸B和淫羊藿中的淫羊藿苷含量,首次建立了该制剂的含量测定方法,以期保障其临床使用的有效性和安全性。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260系列HPLC仪系统(包括VWD检测器和Agilent Chem Station工作站)购自美国Agilent公司;KQ-100型超声波清洗机购自昆山超声仪器有限公司;BS210S型电子分析天平($d=0.1$ mg)、BT25S型电子分析天平($d=0.01$ mg)均购自北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 主要药品与试剂

肾复康Ⅱ号胶囊由陕西省中医医院生产,规格为0.3 g×45粒/瓶,批号分别为20201101、20201110、20210724、20210929、20211013。莫诺苷对照品(批号P11M11F2846,纯度 $\geq 98.0\%$)、马钱苷对照品(批号P24O11F128801,纯度 $\geq 98.0\%$)、丹酚酸B对照品(批号P13N11F130912,纯度 $\geq 98.0\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司;芍药苷对照品(批号MUST-17031901,纯度 $\geq 99.3\%$)购自成都曼斯特生物科技有限公司;淫羊藿苷对照品(批号0737-200111,纯度 $\geq 98.0\%$)购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯)购自美国Thermo Fisher Scientific公司。其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Agilent 5 TC-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 10% A→20% A; 20~30 min, 20% A→30% A; 30~40 min, 30% A→40% A);柱温为30 $^{\circ}$ C;流速为1 mL/min;检测波长为240 nm;进样量为10 μ L。

2.2 溶液的制备

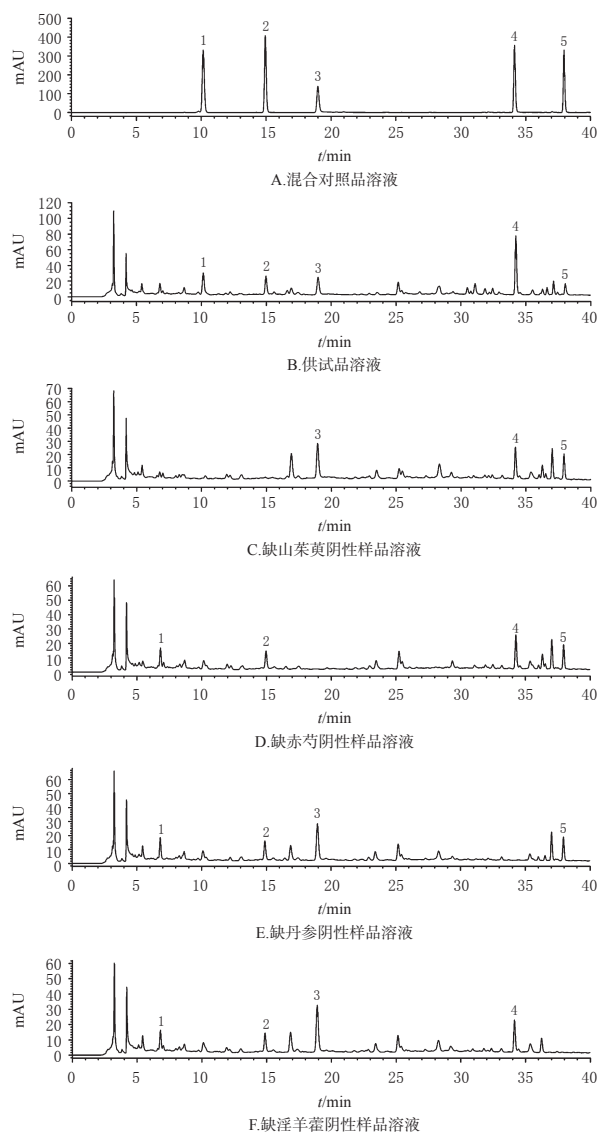
2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹酚酸B、淫羊藿苷对照品各适量,置于10 mL容量瓶中,加80%甲醇稀释并定容,即得含莫诺苷0.240 mg/mL、马钱苷0.242 mg/mL、芍药苷0.350 mg/mL、丹酚酸B 0.236 mg/mL、淫羊藿苷0.259 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取肾复康Ⅱ号胶囊内容物,研细,精密称取0.5 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,按料液比1:100(g/mL)加80%甲醇50 mL使之溶解,称定质量;超声(频率40 kHz,功率300 W)处理30 min,冷却至室温,再称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀;经0.22 μ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照处方制剂工艺,分别制得缺山茱萸、缺赤芍、缺丹参和缺淫羊藿的阴性样品,再分别按“2.2.2”项下方法制备各阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

取上述供试品溶液、混合对照品溶液和阴性样品溶液各10 μ L,注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。由图1可知,肾复康Ⅱ号胶囊中莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹酚酸B、淫羊藿苷均能达到有效分离,理论板数分别为20 522、52 856、55 345、347 545、259 194,分离度分别为1.63、1.72、2.80、2.77、2.69,阴性样品无干扰,表明该方法系统适用性良好。



1:莫诺苷;2:马钱苷;3:芍药苷;4:丹酚酸B;5:淫羊藿苷

图1 肾复康Ⅱ号胶囊中5个成分的HPLC图

2.4 线性关系、定量限和检测限考察

精密量取上述混合对照品溶液 0.2、0.5、1、2、5、10 mL,用 80% 甲醇分别定容至 10 mL 容量瓶中,再按“2.1”项下色谱条件进样 10 μ L,记录峰面积。以对照品的质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得到 5 个成分的回归方程、相关系数(r)和线性范围,结果见表 1。再以信噪比 10:1、3:1 分别计算定量限和检测限,求得莫诺昔、马钱昔、芍药昔、丹酚酸 B 和淫羊藿昔的定量限分别为 0.166、0.198、0.877、0.220、0.260 μ g/mL,检测限分别为 0.056、0.066、0.292、0.073、0.086 μ g/mL。

表 1 5 个成分的线性回归考察结果

成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$
莫诺昔	$Y=15\ 866X-3\ 404\ 1$	0.999 9	4.80~240.00
马钱昔	$Y=15\ 881X+9\ 005\ 2$	0.999 9	4.84~242.00
芍药昔	$Y=5\ 166X+22\ 674\ 0$	0.999 8	7.00~350.00
丹酚酸 B	$Y=13\ 513X+7\ 384\ 7$	0.999 8	4.72~236.00
淫羊藿昔	$Y=10\ 083X+2\ 913\ 2$	0.999 9	5.18~259.00

2.5 精密度考察

取混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录各成分峰面积。结果显示,莫诺昔、马钱昔、芍药昔、丹酚酸 B 和淫羊藿昔峰面积的 RSD 分别为 0.42%、0.54%、1.62%、0.38% 和 0.23% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性考察

取同一批肾复康 II 号胶囊(批号 20201101)制备的供试品溶液,室温存放,分别于 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录各成分峰面积。结果显示,莫诺昔、马钱昔、芍药昔、丹酚酸 B 和淫羊藿昔峰面积的 RSD 分别为 0.65%、2.03%、0.62%、0.36% 和 2.36% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性考察

取同一批肾复康 II 号胶囊(批号 20201101),共 6 份,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,记录各成分峰面积,以外标法计算样品中 5 个成分的含量。结果显示,莫诺昔、马钱昔、芍药昔、丹酚酸 B 和淫羊藿昔含量的 RSD 分别为 1.66%、2.36%、1.09%、0.17% 和 1.45% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.8 准确度考察

精密称取莫诺昔、马钱昔、芍药昔、丹酚酸 B 和淫羊藿昔对照品各适量,加 80% 甲醇溶解并稀释,制成上述 5 个成分质量浓度依次为 1.000、0.816、2.984、2.860、0.616 mg/mL 的单一对照品溶液。精密称取已知 5 个成分含量的肾复康 II 号胶囊(批号 20201101)内容物约 0.25 g,共 6 份,精密加入各单一对照品溶液,再按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液后,按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算各成分的平均加样回收率,结果表明方法准确度良好,详见表 2。

表 2 莫诺昔等 5 个成分的准确度考察结果($n=6$)

成分	取样量/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回 收率/%	平均加样 回收率/%	RSD/ %
莫诺昔	0.250 6	0.506 0	0.500 0	0.988 7	96.54	98.95	2.07
	0.250 5	0.505 8	0.500 0	1.006 2	100.08		
	0.250 7	0.506 2	0.500 0	1.011 4	101.04		
	0.251 0	0.506 8	0.500 0	1.011 1	100.86		
	0.250 7	0.506 2	0.500 0	0.999 3	98.62		
马钱昔	0.250 6	0.506 0	0.500 0	0.988 8	96.56	97.22	1.86
	0.250 6	0.407 0	0.408 0	0.810 5	98.90		
	0.250 5	0.406 9	0.408 0	0.801 9	96.81		
	0.250 7	0.407 2	0.408 0	0.814 6	99.85		
	0.251 0	0.407 7	0.408 0	0.798 5	95.78		
芍药昔	0.250 7	0.407 2	0.408 0	0.795 5	95.17	101.36	2.14
	0.250 6	0.407 0	0.408 0	0.801 9	96.79		
	0.250 6	1.490 2	1.492 0	3.040 7	103.92		
	0.250 5	1.489 6	1.492 0	2.993 7	100.81		
	0.250 7	1.490 8	1.492 0	2.982 2	99.96		
丹酚酸 B	0.251 0	1.492 6	1.492 0	2.977 1	99.50	100.53	2.43
	0.250 7	1.490 8	1.492 0	3.046 3	104.26		
	0.250 6	1.490 2	1.492 0	2.977 5	99.68		
	0.250 6	1.432 7	1.430 0	2.833 9	97.99		
	0.250 5	1.432 1	1.430 0	2.841 7	98.57		
淫羊藿昔	0.250 7	1.433 2	1.430 0	2.897 4	102.39	98.04	1.19
	0.251 0	1.435 0	1.430 0	2.881 7	101.17		
	0.250 7	1.433 2	1.430 0	2.847 6	98.91		
	0.250 6	1.432 7	1.430 0	2.921 8	104.13		
	0.250 6	0.305 8	0.308 0	0.606 7	97.69		
淫羊藿昔	0.250 5	0.305 7	0.308 0	0.607 4	97.95	98.04	1.19
	0.250 7	0.305 9	0.308 0	0.612 0	99.38		
	0.251 0	0.306 3	0.308 0	0.604 6	96.85		
	0.250 7	0.305 9	0.308 0	0.612 3	99.48		
	0.250 6	0.305 8	0.308 0	0.604 2	96.88		

2.9 样品含量测定

取 5 批肾复康 II 号胶囊,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,记录各成分峰面积,以外标法计算样品中 5 个成分的含量,每批样品平行测定 3 次,结果见表 3。

表 3 莫诺昔等 5 个成分的含量测定结果(mg/g, $n=3$)

批号	莫诺昔	马钱昔	芍药昔	丹酚酸 B	淫羊藿昔
20201101	2.019 3	1.624 2	5.946 5	5.717 0	1.220 3
20201110	2.153 4	1.847 1	5.842 9	5.147 8	1.436 5
20210724	2.360 0	1.802 7	6.828 0	5.381 6	1.754 6
20210929	2.081 5	1.833 3	5.637 7	5.015 9	1.392 7
20211013	2.180 0	1.711 5	5.993 0	5.310 7	1.208 8

3 讨论

3.1 指标成分的选择

现代药理研究证实,山茱萸中的莫诺昔可通过晚期糖基化终末产物(advanced glycosylation end products, AGEs)-AGE 受体(receptor of AGE, RAGE)信号通路抑制 RAGE、核因子 κ B 蛋白和丝裂原激活蛋白激酶的表达,减轻氧化应激损伤,从而起到对肾损伤的改善作用^[10];山茱萸中的马钱昔可有效调节 AGEs 诱导 GMCs 产生的内质网应激,减轻炎症反应,抑制氧化应激,从而改善肾功能^[11-12];赤芍中的芍药昔可以通过抑制硫氧还蛋白结合蛋白的表达而拮抗氧化应激对 GMCs 的损伤,

从而发挥肾脏保护作用^[13-14];丹参中的丹酚酸B可通过抗糖^[15]、抗炎^[16]、控制氧化应激^[17]等途径减轻肾功能损伤;淫羊藿中的淫羊藿苷可通过免疫调节等作用改善肾功能^[18]。以上5个成分均有良好的肾脏保护作用,且均为2020年版《中国药典》(一部)中各药材的质量控制成分^[9],因此,本研究选取其作为肾复康Ⅱ号胶囊的质量控制指标成分。

3.2 供试品溶液制备方法的考察

为优化供试品溶液的制备方法,本研究分别考察了提取溶剂(乙醇、甲醇、20%甲醇、40%甲醇、60%甲醇、80%甲醇)、提取方式(超声提取、加热回流提取)、提取时间(15、30、45 min)、料液比(1:50、1:100、1:150, g/mL)、提取次数(1、2、3次)对提取效果的影响,最终确定的制备方法为:以80%甲醇为提取溶剂,料液比为1:100(g/mL),超声提取1次,提取30 min。

3.3 色谱柱和流动相等色谱条件的考察

本研究考察了月旭XB-C₁₈、Agilent 5 TC-C₁₈这2种色谱柱对指标成分峰形的影响,结果发现,利用这2种色谱柱所得5个成分的峰形相近,即两者均可用于肾复康Ⅱ号胶囊的含量测定。同时,还考察了不同柱温(25、30、35℃)对5个成分分离度的影响,结果发现,5个成分在30℃时的分离效果最佳,故最终选择Agilent 5 TC-C₁₈色谱柱,并将柱温设置为30℃。

本研究考察了甲醇-磷酸溶液、甲醇-甲酸溶液、乙腈-磷酸溶液、乙腈-甲酸溶液等流动相系统,并考察了不同浓度(0.1%、0.3%)的甲酸、磷酸对5个成分分离度的影响。结果显示,采用乙腈作为流动相系统时,色谱峰基线较平稳、分离度较好;甲酸和磷酸的浓度对最终的分离效果影响不大,但磷酸的分离度优于甲酸,故最终选择乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相。

3.4 检测波长的选择

由2020年版《中国药典》(一部)^[9]及相关文献可知,上述5个成分的最佳检测波长不同,最大吸收在230~270 nm之间。本研究考察了230~270 nm之间不同波长(230、240、260、270 nm)下各成分的出峰情况,结果发现在240 nm波长下各成分分离度较高、峰形较好,故以240 nm为检测波长。

综上,本研究选取了肾复康Ⅱ号胶囊中含量较高且与其临床药效紧密相关的5个成分作为指标成分,首次建立了该制剂的多指标含量测定方法。该方法简便、准确、重复性好,有助于提升肾复康Ⅱ号胶囊的质量控制水平,保证其临床应用的有效性和安全性。

参考文献

[1] 程小红,邢斌,刘建红,等.益肾散结法对大鼠肾脏间质纤维化组织TGF- β_1 和PAI-1表达的影响[J].陕西中医,2018,39(2):143-145,153.
[2] 屈凯,李现成,张楠,等.肾复康Ⅱ号胶囊的有效成分对高糖环境中大鼠肾小球系膜细胞氧化应激反应的影响[J].

中国中西医结合肾病杂志,2016,17(5):400-402.

[3] 王悦彤,李现成,张楠,等.益肾散结复方及拆方对阿霉素诱导的HBZY-1肾小球系膜细胞凋亡的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(11):947-950,1035.
[4] 史健,刘建红,程小红,等.肾复康Ⅱ号对大鼠肾间质纤维化及转化生长因子- β_1 的影响[J].中药药理与临床,2012,28(3):99-101.
[5] 程小红,毛加荣,赵亚峰,等.肾复康Ⅱ号对5/6肾切除大鼠肾功能及TGF- β_1 /Smads信号通路的影响[J].国际中医中药杂志,2018,40(12):1165-1169.
[6] 史健,杨洪涛,胡锐,等.肾复康Ⅱ号抗肾间质纤维化及对肾小管上皮小管细胞转分化的作用[J].陕西中医,2014,35(1):103-105.
[7] 王淑非,王悦彤,李现成,等.益肾散结复方及其拆方对阿霉素肾病大鼠肾脏组织的影响研究[J].陕西中医,2020,41(1):3-7.
[8] 张晓凤,田耘,程小红,等.肾复康Ⅱ号联合骨髓间充质干细胞移植对肾间质纤维化大鼠肾功能、HGF和C-Met的作用研究[J].四川中医,2017,35(10):51-54.
[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:29,77,165,340.
[10] LV G H, LV X, TAO Y H, et al. Effect of morroniside on glomerular mesangial cells through AGE-RAGE pathway[J]. Hum Cell, 2016, 29(4):148-154.
[11] WANG D Y, LI C X, FAN W C, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a polysaccharide from Fructus Corni in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 133:420-427.
[12] WU L L, WANG D, XIAO Y, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a role in the advanced glycation end product-induced inflammatory response in endothelial cells[J]. Life Sci, 2014, 110(1):44-51.
[13] 马丽,李作孝.白芍总苷的免疫调节功能及其临床应用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(17):244-246.
[14] TAN Y Q, CHEN H W, LI J, et al. Efficacy, chemical constituents, and pharmacological actions of Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:1054.
[15] 魏丹丹,张超,朱星昊,等.丹参多酚酸盐对肾间质纤维化模型大鼠的改善作用及机制研究[J].中国药房,2021,32(8):915-920.
[16] XIAO Z, LIU W, MU Y P, et al. Pharmacological effects of salvianolic acid B against oxidative damage[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:572373.
[17] HU Y, WANG M, PAN Y Z, et al. Salvianolic acid B attenuates renal interstitial fibrosis by regulating the HPSE/SDC1 axis[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2):1325-1334.
[18] 陈威辛,戴恩来,王新斌,等.淫羊藿苷对局灶节段性肾小球硬化模型大鼠泼尼松抵抗的影响[J].中国中医药信息杂志,2019,26(11):46-51.

(收稿日期:2022-01-06 修回日期:2022-07-13)

(编辑:胡晓霖)