

HPLC法同时测定补肾通络方中马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷的含量^Δ

刘湘丹^{1*}, 黄攀², 袁林祥¹, 卢岳华^{3#}, 马铭²(1.湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2.湖南师范大学化学化工学院, 长沙 410081; 3.湖南师范大学医学院, 长沙 410081)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4455-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.13

摘要 目的:建立同时测定补肾通络方中马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%醋酸水溶液(35:65, V/V), 检测波长为 240 nm(马钱苷)、320 nm(阿魏酸和二苯乙烯苷), 柱温为 30 ℃, 流速为 1.0 ml/min, 进样量为 10 μl。结果:马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷的质量浓度分别在 0.050~2.500($r=0.999\ 9$)、0.005~0.250($r=0.999\ 9$)、0.060~3.000($r=0.999\ 8$) μg/ml 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系;精密度的 RSD<2%, 稳定性、重复性试验的 RSD<3%;马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷的平均加样回收率分别为 98.31%(RSD=1.92%, $n=6$)、96.33%(RSD=1.91%, $n=6$)和 100.78%(RSD=1.93%, $n=6$)。结论:该方法简单、准确, 灵敏度高, 可用于补肾通络方的质量控制。

关键词 补肾通络方; 马钱苷; 阿魏酸; 二苯乙烯苷; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Loganin, Ferulic Acid and Stibene Glucoside in Bushen Tongluo Formula by HPLC

LIU Xiang-dan¹, HUANG Pan², YUAN Lin-xiang¹, LU Yue-hua², MA Ming²(1.College of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China; 2.College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 3.The Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of loganin, ferulic acid and stibene glucoside in Bushen tongluo formula. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% acetic acid solution (35:65, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection temperature was 30 ℃ and sample size was 10 μl. The detection wavelength was set at 240 nm for loganin and 320 nm for ferulic acid and stibene glucoside. RESULTS: The linear range were 0.050-2.500 μg/ml for loganin($r=0.999\ 9$), 0.005-0.250 μg/ml for ferulic acid ($r=0.999\ 9$) and 0.060-3.000 μg/ml for stibene glucoside ($r=0.999\ 8$), respectively. RSD of precision test was lower than 2%, and RSDs of stability and reproducibility tests were lower than 3%. The average recoveries were 98.31% (RSD=1.92%, $n=6$), 96.33% (RSD=1.91%, $n=6$) and 100.78% (RSD=1.93%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and sensitive, and can be used for the quality control of Bushen tongluo formula.

KEYWORDS Bushen tongluo formula; Loganin; Ferulic acid; Stibene glucoside; HPLC; Content determination

补肾通络方为卢岳华教授根据全国第一批名老中医赵尚久先生临床常用治疗肾病综合征的有效方化裁而成, 由山茱萸、当归、川芎、制首乌、黄芪、丹参、马鞭草等药物组成。临床药理学^[1]研究表明, 该方具有减轻尿蛋白、提升血浆白蛋白、促进肾小管上皮细胞修复、改善肾功能的作用, 且副作用较少; 动物实验^[2-3]表明, 该方能改善膜性肾炎大鼠血液高凝状态和防止肾小球内微小栓形成, 缓解肾小球基底膜增生及其余肾

组织损伤。该方主药为山茱萸、当归、川芎、制首乌, 2010年版《中国药典》^[4]记载, 其主要活性成分为马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷。上述化学成分存在多种药材中, 被证明具有十分显著的药理活性, 可改善脂质代谢、保护血管内皮细胞、提高机体免疫、对抗细胞增殖、延缓肾病进展等^[5-7]。本研究拟建立同时测定补肾通络方中二苯乙烯苷、阿魏酸和马钱苷3种主要活性成分含量的方法, 以为后续探讨补肾通络方治疗肾病综合征的药效物质基础、开发有效治疗肾病综合征的复方新药提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FA1004型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); RE501型旋转蒸

^Δ基金项目: 国家中医药管理局中医药重点学科资助项目(No.国中医药发[2009]30号); 湖南省高校科研项目(No.12A098); 湖南省中药学重点学科建设项目资助(No.湘教通[2011]76号); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划与竞赛项目(No.2013-176)

* 讲师, 博士研究生。研究方向: 中药资源与质量, 肾病药物。电话: 0731-88458233。E-mail: paeonia_dd@126.com

通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 中西医结合治疗肾病。E-mail: lyh@hunnu.edu.cn

发仪(巩义市予华仪器有限公司);DK-98-1型水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);JG-10型蒸汽夹层锅(湖南省浏阳医药设备总厂);-20℃冰箱(青岛海尔集团);SZ-93型自动双重纯水蒸馏器(上海雅荣生化仪器设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

补肾通络方浓缩液[规格:10 g(生药)/ml]由湖南中医药大学第一附属医院制剂科提供;马钱苷对照品(批号:11640-201005,纯度≥98%)、阿魏酸对照品(批号:110773-201012,纯度≥91%)、二苯乙烯苷对照品(批号:110844-201310,纯度≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯,天津恒兴化学制品有限公司);乙醇、冰乙酸均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5μm);流动相: 甲醇-0.1%醋酸溶液(35:65, V/V);检测波长: 马钱苷0~≤13.00 min, 240 nm;阿魏酸和二苯乙烯苷>13.00~≤26.00 min, 320 nm, >26.00 min, 240 nm;柱温: 30℃;流速: 1.0 ml/min;进样量: 10 μl。

2.2 系统适用性试验

在“2.1”项色谱条件下,样品中马钱苷、阿魏酸、二苯乙烯苷与其他峰能够达到基线分离,分离度佳。马钱苷、阿魏酸、二苯乙烯苷的保留时间分别约在9.65、18.91、23.53 min左右。理论板数按相应色谱峰分别为3 736、6 461、5 069;分离度分别为2.12、11.60、3.87。色谱见图1。

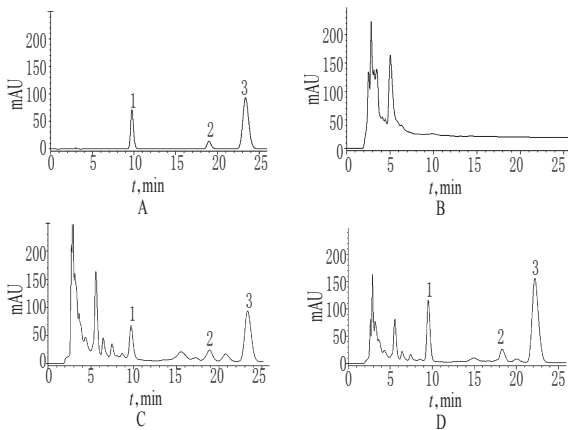


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.阴性对照;C.供试品;D.供试品加标;1.马钱苷;2.阿魏酸;3.二苯乙烯苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B.negative control; C.test samples; D.test samples mixed with internal standard; 1.loganin; 2.ferulic acid; 3.stibene glucoside

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品贮备液 精密称取马钱苷、阿魏酸、二苯乙烯苷对照品各10.06、10.09、9.96 mg,分别置10 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,分别制得质量浓度为1.006、1.009、0.996 mg/ml的马钱苷、阿魏酸、二苯乙烯苷对照品贮备液,密封,低温避光贮藏,备用。

2.3.2 供试品溶液 用移液管精密吸取补肾通络方浓缩液2 ml,置50 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,超声(功率:300 W;频率:40 kHz)处理10 min,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3.3 阴性对照溶液 按处方比例称取除山茱萸、当归、川芎、制首乌以外的其他药材适量,按补肾通络方浓缩液的制备工艺制备阴性样品,并按照“2.3.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.3.1”项下的对照品贮备液适量,加甲醇制成以下浓度的混合标准品溶液:(1)马钱苷250 μg/ml+阿魏酸25 μg/ml+二苯乙烯苷300 μg/ml;(2)马钱苷125 μg/ml+阿魏酸12.5 μg/ml+二苯乙烯苷150 μg/ml;(3)马钱苷100 μg/ml+阿魏酸10 μg/ml+二苯乙烯苷120 μg/ml;(4)马钱苷50 μg/ml+阿魏酸5 μg/ml+二苯乙烯苷60 μg/ml;(5)马钱苷25 μg/ml+阿魏酸2.5 μg/ml+二苯乙烯苷30 μg/ml;(6)马钱苷5 μg/ml+阿魏酸0.5 μg/ml+二苯乙烯苷6 μg/ml。精密吸取上述混合标准品溶液10 μl,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(A)为纵坐标,各成分的质量浓度(c, μg/ml)为横坐标,绘制标准曲线,得马钱苷的回归方程: $A=16.810c+11.793$ ($r=0.9999$),线性范围:5~250 μg/ml;阿魏酸的回归方程: $A=48.384c-0.264$ ($r=0.9999$),线性范围:0.5~25 μg/ml;二苯乙烯苷的回归方程: $A=37.419c+33.301$ ($r=0.9998$),线性范围:6~300 μg/ml。结果表明,各成分的质量浓度在其线性范围内与其峰面积积分值均呈良好线性关系。

2.5 精密度的试验

精密吸取同一混合对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷峰面积的RSD分别为1.42%、1.25%和1.68%(n均为6),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

用移液管精密吸取同一质量浓度的补肾通络方浓缩液6份,分别按“2.3.2”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,记录峰面积。结果,马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷峰面积的RSD分别为1.87%、2.02%和1.93%(n均为6),表明本方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密量取同一供试品溶液10 μl,分别于0、2、4、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷峰面积的RSD分别为1.70%、2.26%和1.56%(n均为6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

用移液管精密吸取已知质量浓度的补肾通络方浓缩液6份,每份2 ml,分别精密加入相同量的马钱苷、阿魏酸、二苯乙烯苷对照品,按“2.3.2”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,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

表1 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

成分	取样量, ml	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
马钱苷	2	4.980 7	5.000 0	10.070 1	101.79	98.31	1.92
	2	4.980 7	5.000 0	9.921 0	98.81		
	2	4.980 7	5.000 0	9.870 8	97.80		
	2	4.980 7	5.000 0	9.854 3	97.47		
	2	4.980 7	5.000 0	9.865 4	97.69		
	2	4.980 7	5.000 0	9.765 3	95.69		
阿魏酸	2	0.574 7	0.550 0	1.100 7	96.29	96.33	1.91
	2	0.574 7	0.550 0	1.096 5	94.87		
	2	0.574 7	0.550 0	1.120 8	99.29		
	2	0.574 7	0.550 0	1.110 6	97.44		
	2	0.574 7	0.550 0	1.093 2	94.27		
	2	0.574 7	0.550 0	1.105 4	96.49		
二苯乙烯苷	2	6.215 6	6.200 0	12.753 5	103.84	100.78	1.93
	2	6.215 6	6.200 0	12.267 8	99.23		
	2	6.215 6	6.200 0	12.550 9	102.18		
	2	6.215 6	6.200 0	12.409 8	99.91		
	2	6.215 6	6.200 0	12.134 1	98.69		
	2	6.215 6	6.200 0	12.467 6	100.84		

取5批补肾通络方浓缩液各适量,分别按“2.3.2”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,记录峰面积,并计算马钱苷、阿魏酸和二苯乙烯苷的质量浓度,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=5)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=5)

试验号	马钱苷, mg/ml	阿魏酸, mg/ml	二苯乙烯苷, mg/ml
1	2.490 4	0.287 4	3.178 0
2	2.508 3	0.300 4	3.125 5
3	2.531 3	0.289 1	3.105 1
4	2.466 3	0.302 5	3.134 1
5	2.577 3	0.283 1	3.122 5
平均值	2.5147	0.292 5	3.119 0

3 讨论

3.1 检测波长的选择

使用紫外检测器在200~800 nm范围内进行紫外吸收全波长扫描,结果马钱苷最大吸收波长为240 nm,阿魏酸最大吸收波长为320 nm,二苯乙烯苷最大吸收波长为320 nm,因此本研究选择240、320 nm进行梯度波长检测。

3.2 流动相的选择

本试验先后考察了甲醇-水、甲醇-10 mmol/L磷酸二氢钾水溶液(加磷酸调pH至4)、甲醇-0.1%醋酸溶液作流动相,从目标化合物分离情况和出峰时间综合考虑,最终选择了甲醇-0.1%醋酸溶液(35:65, V/V)进行洗脱。由于二苯乙烯苷在强酸性环境下极不稳定,阿魏酸在弱酸性环境下稳定但见光易分解,故试验过程采用棕色容量瓶进行避光保存,并在流动相中加入醋酸(调pH值至4)以保证指标成分的稳定性。

综上所述,本研究建立的分析方法操作简便,结果准确、可靠,重复性好,可用于补肾通络方的质量控制。

参考文献

- [1] 卢岳华,陈小光,金红,等.补肾通络方治疗NS的临床观察[J].湖南中医药大学学报,2007,27(6):47.
- [2] 皮亦华,金红,郭少三,等.补肾通络方治疗大鼠C-BSA膜性肾炎的药效学研究[J].湖南师范大学学报:医学版,2006,3(4):4.
- [3] 汪保和,皮亦华,黄畅,等.补肾通络方对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾炎大鼠高凝状态的影响[J].中草药,2009,40(7):1 095.
- [4] 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,2010:165、26、124.
- [5] 汪娇,何首乌中二苯乙烯苷的现代研究[J].社区用药指导,2011,13(31):17.
- [6] 赵武述.山茱萸成分的免疫活性研究[J].中草药,1990,21(3):17.
- [7] 欧阳臻,潘璐琳,汤建明,等.阿魏酸、川芎及复方脑得生中阿魏酸在大鼠体内的药动学研究[J].中国中药杂志,2010,35(2):226.

(收稿日期:2014-05-29 修回日期:2014-09-23)

国家卫生计生委主任李斌出席第七届中日韩卫生部长会议

本刊讯 2014年11月23日,国家卫生计生委主任李斌出席了在京举行的第七届中日韩卫生部长会议,并发表主旨演讲。韩国保健福祉部部长文亨杓(Moon Hyung-pyo)和日本厚生劳动大臣盐崎恭久(Yasuhisa Shiozaki)率团出席会议。来自中日韩三国卫生部门的政府和专家70余人参加了会议。

会议回顾了在中日韩合作机制下卫生领域合作取得的成果,交流了三国在新发再发传染病和埃博拉出血热疫情防控、慢性病防控和全民健康覆盖领域的做法和经验,探讨了三国在上述领域的合作。会议通过了《第七届中日韩卫生部长会议联合声明》和《第七届中日韩卫生部长会议关于准备和应对埃博拉出血热疫情暴发的联合声明》。

李斌发言强调,随着全球化推进和社会发展,中日韩三国加强新发再发传染病、慢性病防控和全民健康覆盖等领域的

合作意义重大。她指出,中日韩三国在卫生领域合作渊源深厚,三方应共同探索,开拓创新。为此提出3点合作倡议:第一,三国应不断深化传统领域合作,共同防范公共卫生安全威胁;第二,稳步拓展合作领域,多渠道开拓合作资源;第三,发挥三国卫生合作机制作用,加强在其他多边机制中的协调,为增进人民健康福祉做出贡献。李斌主任的倡议得到了日韩两国的积极响应。

此外,三国卫生部长共同出席了中日韩健康老龄社会论坛开幕式并致辞。三国代表就“促进养老服务业发展政策与实践”和“卫生体系应对老龄化挑战”两个议题展开了交流和讨论。

中日韩三国卫生部长会议机制于2006年建立,会议由中日韩三国按轮值顺序举办。