

HPLC 法测定肾炎灵胶囊中柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯

王启明¹, 魏谭军^{1*}, 贾旭明²

1. 达州市中西医结合医院, 四川 达州 635000

2. 达州市食品药品检验所, 四川 达州 635000

摘要: 目的 建立 HPLC 波长切换法同时测定肾炎灵胶囊中柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯。方法 采用高效液相色谱法, Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈 (1:1) 与 0.5%冰醋酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 330 nm (0~14 min 检测远柳穿鱼叶苷)、203 nm (14~20 min 检测地榆皂苷-I)、224 nm (20~29 min 检测女贞苷和特女贞苷)、351 nm (29~45 min 检测去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯); 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量为 10 μL。结果 柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯分别在 2.97~59.40、19.59~391.80、1.78~35.60、4.96~99.20、1.13~22.60、3.29~65.80 μg/mL 线性关系良好; 平均回收率分别为 97.97%、99.78%、96.98%、98.52%、98.10%、99.10%, RSD 值分别为 0.76%、1.01%、0.66%、1.22%、0.95%、1.56%。结论 该方法简便, 分析速度快, 为完善肾炎灵胶囊的质量标准提供参考。

关键词: 肾炎灵胶囊; 柳穿鱼叶苷; 地榆皂苷-I; 女贞苷; 特女贞苷; 去甲蟛蜞菊内酯; 蟛蜞菊内酯; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2017)10-1824-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.10.003

Determination of pectolarin, ziyu-glycoside I, ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone, and wedelolactone in Shenyanling Capsules by HPLC

WANG Qi-ming¹, WEI Tan-jun¹, JIA Xu-ming²

1. Dazhou Hospital of Integrated TCM & WM, Dazhou 635000, China

2. Dazhou Institute for Food and Drug Control, Dazhou 635000, China

Abstract: Objective To develop an HPLC wavelength switching method for simultaneous determination of pectolarin, ziyu-glycoside I, ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone, and wedelolactone, in Shenyanling Capsules. **Methods** HPLC method was adopted for the analysis on Agilent Extend-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol - acetonitrile (1:1) and 0.5% glacial acetic acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were 330 nm in 0 — 14 min (determination of pectolarin), 203 nm in 14 — 20 min (determination of ziyu-glycoside I), 224 nm in 20 — 29 min (determination of ligustroflavone and specnuezhenide), and 351 nm in 29 — 45 min (determination of demethylwedelolactone and wedelolactone). The flow rate was 0.8 mL/min, and the column temperature was set at 30 °C with injection volume of 10 μL. **Results** Pectolarin, ziyu-glycoside I, ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone and wedelolactone had good linearity in the ranges of 2.97 — 59.40, 19.59 — 391.80, 1.78 — 35.60, 4.96 — 99.20, 1.13 — 22.60, and 3.29 — 65.80 μg/mL, respectively. The average recoveries were 97.97%, 99.78%, 96.98%, 98.52%, 98.10%, and 99.10%, with RSD of 0.76%, 1.01%, 0.66%, 1.22%, 0.95%, and 1.56%, respectively. **Conclusions** The method is simple and rapid which provides reference for quality standard of Shenyanling Capsules.

Key words: Shenyanling Capsules; pectolarin, ziyu-glycoside I, ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone; wedelolactone; HPLC

收稿日期: 2017-07-04

作者简介: 王启明 (1965—), 男, 四川达州人, 本科, 主管药师, 主要从事药品质量控制等医院药学相关工作。

Tel: 13778384282 E-mail: 40447285@qq.com

*通信作者 魏谭军 (1984—), 男, 四川巴中人, 硕士, 主管中药师, 主要从事医院制剂的研究与开发。

Tel: (0818)2288358 E-mail: weitanjun635000@163.com

肾炎灵胶囊由大蓟、地榆、女贞子、墨旱莲等17味中药加工而成,具有清热凉血、滋阴养肾的功效,临床上主要用于慢性肾小球肾炎的治疗^[1]。该制剂处方源于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第十三册,标准中仅对其性状、鉴别、胶囊剂通则项下的检测项目进行了规定^[2]。方中墨旱莲为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L.的干燥地上部分,主要含香草醚类、三萜皂苷类、噻吩类和黄酮类等成分,《中国药典》2015年版一部以蟞蜞菊内酯为其指标成分进行定量测定^[3-4]。方中女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait.的干燥成熟果实,主要含萜类、黄酮类、苯乙醇苷类等成分,萜类和苯乙醇苷类是其中含量高且药效活性研究集中的成分,《中国药典》2015年版一部以其萜类特女贞苷为指标成分进行定量测定^[3,5]。方中大蓟含有柳穿鱼叶苷、蒙花苷、绿原酸、菊糖等多种化学成分,其中黄酮类化合物柳穿鱼叶苷为其主要止血活性成分^[6]。方中地榆主要含三萜及其苷类、鞣质酚酸类和黄酮类化合物,分离得到的三萜及其苷类化合物大多数为乌苏烷型五环三萜及其苷类化合物,以地榆皂苷-I为主要代表成分。因此本实验采用HPLC波长切换法同时测定肾炎灵胶囊中柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟞蜞菊内酯和蟞蜞菊内酯6个成分,为肾炎灵胶囊质量标准的提高提供参考。

1 试剂与仪器

肾炎灵胶囊由吉林省抚松制药股份有限公司提供,规格0.25 g/粒;柳穿鱼叶苷(批号111728-201703,质量分数99.6%)、地榆皂苷-I(批号111952-201301,质量分数95.1%)、女贞苷(批号111918-201102,质量分数88.6%)、特女贞苷(批号111926-201605,质量分数93.3%)、蟞蜞菊内酯(批号111885-201403,质量分数99.6%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;去甲蟞蜞菊内酯对照品(批号6468-55-9,质量分数98.0%)购自成都德思特生物技术有限公司。Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);BT25S型电子天平(德国赛多利斯公司);SB-5200 DTD型超声波发生器(宁波新芝生物科技股份有限公司);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Agilent Extend-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈(1:1)与0.5%

冰醋酸溶液,梯度洗脱:0~9 min, 18.0% A; 9~14 min, 18.0%→22.0% A; 14~20 min, 22.0%→31.0% A; 20~29 min, 31.0%→40.0% A; 29~38 min, 40.0%→46.0% A; 38~45 min, 46.0%→18.0% A^[6-8];检测波长:330 nm(0~14 min检测远柳穿鱼叶苷^[9-10])、203 nm(14~20 min检测地榆皂苷-I^[11])、224 nm(20~29 min检测女贞苷和特女贞苷^[12])、351 nm(29~45 min检测去甲蟞蜞菊内酯和蟞蜞菊内酯^[13]);体积流量:0.8 mL/min;柱温:30℃;进样量为10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟞蜞菊内酯和蟞蜞菊内酯对照品适量,用70%乙醇分别制成0.594、3.918、0.356、0.992、0.226、0.658 mg/mL的对照品储备溶液。再分别依次量取各对照品储备液5.0、5.0、2.5、5.0、5.0、5.0 mL,置100 mL量瓶中,用70%乙醇稀释至刻度,摇匀,制成含柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟞蜞菊内酯和蟞蜞菊内酯分别为29.7、195.9、8.9、49.6、11.3、32.9 μg/mL的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取肾炎灵胶囊适量,倾出内容物,研细,取约2.0 g,精密称定,置50 mL量瓶中,加入70%乙醇45 mL,超声提取30 min,放冷,用70%乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

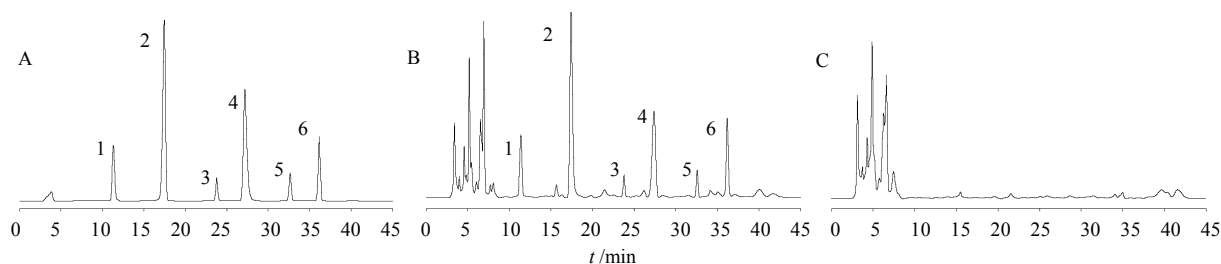
按肾炎灵胶囊的处方和工艺过程,制备不含大蓟、地榆、女贞子和墨旱莲的阴性样品,再按供试品溶液的制备项下方法处理,即得。

2.5 专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,进样测定,记录色谱图,见图1。结果柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟞蜞菊内酯和蟞蜞菊内酯与其他成分峰的分离度均大于1.5,理论塔板数按各成分色谱峰计均大于3 500,阴性样品溶液色谱图显示阴性样品无干扰。

2.6 线性关系考察

精密量取对照品储备液各10.0 mL,用70%乙醇稀释至100 mL,再用70%乙醇分别稀释2、4、8、16、20倍,依次制得系列溶液,进样测定。以质量浓度作为横坐标,峰面积作为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程,见表1。



1-柳穿鱼叶苷 2-地榆皂苷-I 3-女贞苷 4-特女贞苷 5-去甲蟛蜞菊内酯 6-蟛蜞菊内酯
1-pectolarin 2-ziyu-glycoside I 3-ligustroflavone 4-specnuezhenide 5-demethylwedelolactone 6-wedelolactone

图 1 混合对照品 (A)、肾炎灵胶囊 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Shenyangling Capsules (B) and negative sample (C)

表 1 6 种成分的线性方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, and linear range of six components

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
柳穿鱼叶苷	$Y=8.8923 \times 10^5 X+433.2$	0.999 5	2.97~59.40
地榆皂苷-I	$Y=7.1241 \times 10^5 X+197.5$	0.999 7	19.59~391.80
女贞苷	$Y=5.9772 \times 10^5 X-339.8$	0.999 9	1.78~35.60
特女贞苷	$Y=1.4075 \times 10^6 X-380.7$	0.999 3	4.96~99.20
去甲蟛蜞菊内酯	$Y=6.5916 \times 10^5 X-224.1$	0.999 8	1.13~22.60
蟛蜞菊内酯	$Y=1.1579 \times 10^6 X+154.6$	0.999 9	3.29~65.80

2.7 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯的峰面积值,计算得其 RSD 值分别为 0.95%、0.61%、1.24%、0.93%、1.18%、1.02%。

2.8 重复性试验

取批号 160706 肾炎灵胶囊样品 6 份,制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积值,分别计算柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯的质量分数,结果其 RSD 值分别为 1.55%、1.03%、0.49%、1.16%、1.38%、1.27%。

2.9 稳定性试验

取批号 160706 肾炎灵胶囊样品,制备供试品溶液,在室温下放置 0、2、4、8、16、24 h,进样测定,记录柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯的峰面积值,计算得其 RSD 值分别为 1.08%、0.74%、1.29%、1.16%、1.25%、0.98%,结果表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.10 回收率试验

取批号 160706 肾炎灵胶囊样品 6 份,将内容物研细,每份约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,

依次精密加入柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯、蟛蜞菊内酯对照品贮备液 1.2、1.4、0.7、1.2、1.4、1.5 mL,制备供试品溶液,进样测定峰面积值,计算得柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯的平均回收率分别为 97.97%、99.78%、96.98%、98.52%、98.10%、99.10%,RSD 值分别为 0.76%、1.01%、0.66%、1.22%、0.95%、1.56%。

2.11 样品测定

取 3 批肾炎灵胶囊样品,制备供试品溶液,依法进样测定,采用外标法计算柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯的质量分数,结果见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

分别考察了甲醇-水^[10]、乙腈-水^[11]、甲醇-乙腈(1:1)与水流动相体系^[6],结果甲醇-乙腈(1:1)与水流动相体系所测各色谱峰的峰形、分离度优于甲醇-水、乙腈-水流动相体系,但部分色谱峰拖尾、峰形不够对称;因此采用 0.1%甲酸溶液^[7-8]、0.1%磷酸溶液^[9,12]、0.1%冰醋酸溶液^[13]不同酸代替流动相中的水,分别考察对所测各色谱峰的影响,结果冰醋酸溶液优于甲酸溶液和磷酸溶液;最后实

表2 肾炎灵胶囊中柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯的测定结果 (n=3)
 Table 2 Determination of pectolinarin, ziyu-glycoside I, ligustroflavone, specnuezhenide, demethylwedelolactone, and wedelolactone in Shenyanling Capsules (n=3)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	柳穿鱼叶苷	地榆皂苷-I	女贞苷	特女贞苷	去甲蟛蜞菊内酯	蟛蜞菊内酯
160706	0.719	5.467	0.251	1.192	0.315	0.974
160911	0.596	5.550	0.273	1.249	0.281	0.869
161102	0.744	4.938	0.222	1.078	0.353	1.017

验又对 0.1%、0.5%、1.0%冰醋酸溶液及梯度洗脱比例进行了摸索,最终选取甲醇-乙腈(1:1)与 0.5%冰醋酸溶液为流动相梯度洗脱,此时色谱图基线平稳、各色谱峰峰形对称、分离度好。

3.2 供试品溶液制备提取方法的确定

实验先考察了提取方法(超声、回流)及提取溶剂(50%乙醇、70%乙醇、乙醇、甲醇)对所测各成分提取效率的影响,结果超声提取和回流提取对6个成分提取效率差异不大,同时70%乙醇优于其他提取溶剂。考虑到超声提取较为便捷,重复性好,优选70%乙醇超声提取;实验又对提取时间(15、30、45 min)进行了考察,结果提取30 min和提取45 min所测各成分含量相当,但优于提取15 min结果。故最终优选肾炎灵胶囊供试品溶液制备的最佳提取方式为70%乙醇超声提取30 min。

肾炎灵胶囊方中墨旱莲、女贞子补肾益肝,为方中君药;大蓟、小蓟、茜草凉血止血,地榆、马齿苋、茯苓、猪苓、车前子、栀子清热解毒、利湿化浊、行水消肿,为方中臣药;附以当归养血和血、川芎行气活血、赤芍调血祛瘀、地黄滋阴补血、山药健脾固肾、狗脊壮腰益肾,诸药合用,共奏清热凉血、滋阴养肾之功效。本实验采用高效液相波长切换法测定肾炎灵胶囊中6个成分柳穿鱼叶苷、地榆皂苷-I、女贞苷、特女贞苷、去甲蟛蜞菊内酯和蟛蜞菊内酯,方法简便,分析速度快,为完善肾炎灵胶囊的质量标准提供了重要参考依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁布药品标准(中药成方制剂第十三册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:103.

[2] 中国药典[S]. 四部. 2015:6-7.
 [3] 中国药典[S]. 一部. 2015:25,126-127,45-46,374-375.
 [4] 吴红霞,高晓霞,赵云丽,等. 墨旱莲药材的高效液相指纹图谱及聚类分析[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(2):97-100.
 [5] 刘亭亭,王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):228-234.
 [6] 杨桂燕,代良敏,熊永爱,等. HPLC-ELSD法测定地榆药材中地榆皂苷-I和地榆皂苷-II的含量[J]. 中华中医药杂志,2016,31(8):3340-3343.
 [7] 蒋叶娟,姚卫峰,张丽,等. HPLC法同时测定女贞子中6种成分的含量[C]. 海峡两岸暨CSNR全国第10届中药及天然药物资源学术研讨会论文集. 兰州:中国自然资源学会天然药物资源专业委员会、中国药材GAP研究促进会(香港)、甘肃省人民政府,2012:461-463.
 [8] 侯雪峰,孙帅,汪刚,等. UPLC同时测定墨旱莲药材中8种成分的含量[J]. 中国中药杂志,2016,41(21):3982-3987.
 [9] 符玲,龚千锋,吕武清,等. RP-HPLC法测定大蓟中柳穿鱼叶苷的含量[J]. 中草药,2004,35(11):1306-1307.
 [10] 倪晓霓,许前辉. 大蓟小蓟的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志,2007,27(6):929-932.
 [11] 张东方,袁长季,祝峥,等. HPLC法测定不同地区地榆中地榆皂苷-I的含量[J]. 云南中医学院学报,2009,32(1):37-39,42.
 [12] 钱永健,张超. HPLC法测定出血热预防片中的女贞苷,特女贞苷,哈巴苷和哈巴俄苷[J]. 中成药,2015,37(1):116-120.
 [13] 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蟛蜞菊内酯和异去甲基蟛蜞菊内酯[J]. 色谱,2007,25(3):371-373.