

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

李泽运, 陈晓辉, 马凤, 苏丹, 毕开顺*

(沈阳药科大学, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱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。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-磷酸水为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 220 nm。结果: 红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯进样浓度分别在 2.2~88.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$), 9.9~396.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$), 0.5~20.1 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$) 范围内与峰面积呈良好线性关系; 平均回收率分别为 97.5%, 98.0%, 97.8%, RSD 均小于 3%。结论: 所建立的方法简便、快速、准确, 重复性好, 可用于二至丸的质量控制。

关键词: 二至丸; 红景天苷; 女贞子苷; 蟛蜞菊内酯; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0019-03

RP-HPLC simultaneous determination of salidroside, nuzhenide and wedelolactone in Erzhi pills

LI Ze-yun, CHEN Xiao-hui, MA Feng, SU Dan, BI Kai-shun*

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of salidroside, nuzhenide and wedelolactone in Erzhi pills. **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as mobile phase (gradient elution). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained at 30 ℃, and the detection wavelength was set at 220 nm. **Results** The calibration curves of salidroside, nuzhenide and wedelolactone were linear in the ranges of 2.2~88.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$), 9.9~396.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$), 0.5~20.1 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$), respectively. The average recoveries were 97.5%, 98.0% and 97.8%, respectively with RSD less than 3%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reproducible for quality control of Erzhi pills.

Key words Erzhi pills; salidroside; nuzhenide; wedelolactone; RP-HPLC

二至丸是中医临床补阴剂经典名方, 由女贞子和墨旱莲 2 味药材组成, 收载于中国药典 2010 年版(一部)^[1], 用于肝肾阴虚所致的眩晕耳鸣、咽干鼻燥、失眠多梦、腰膝酸痛、月经量多等症^[2]。女贞子为方中君药, 其中所含有的红景天苷和女贞子苷具有保肝利胆、抗菌消炎、抗肿瘤、降血脂、降血糖、增强机体免疫力等多种药理作用^[3~5]。墨旱莲为方中臣药, 其中所含的香豆素醚成分蟛蜞菊内酯据文献报道具有保肝和促进肝细胞再生等作用^[6]。中国药典 2010 年版(一部)以其中蟛蜞菊内酯含量作为墨旱莲药材质量控制的重要指标^[1]。且目前尚未

见二至丸中以上 3 种有效成分含量测定的报道。中国药典 2010 年版(一部)对二至丸的质量控制方法仍为薄层扫描法测定其中齐墩果酸的含量^[1], 该方法专属性不强, 准确性不高, 亟待提升。本文建立了 RP-HPLC 法, 同时测定红景天苷、女贞子苷和蟛蜞菊内酯的含量, 对于二至丸的质量控制具有重要意义。

1 仪器与试药

韩国英麟公司 YL9100 高效液相色谱仪, YL9120 UV/VIS DETECTOR, YL-Clarity。

对照品红景天苷(批号 110818-200404)购自

* 通讯作者 Tel: (024) 23986016 E-mail: bikaishun@yahoo.com

中国药品生物制品检定所, 女贞子苷(纯度 > 98%) 购自上海中药标准化研究中心, 蟛蜞菊内酯(纯度 > 98%) 购自上海舒展化工有限公司。二至丸(雷允上药业有限公司, 批号 IB34001; 江西仁丰药业有限公司, 批号 090701, 090901)。甲醇、乙腈(山东禹王实业总公司)为色谱纯, 二次蒸馏水自制, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品储备液 取对照品红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯适量, 精密称定, 置于同一 25 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯浓度分别为 $88.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $396.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液 取二至丸适量, 研细, 取约 0.5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 80% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声 (200 W, 40 kHz) 提取 1 h 放冷, 再称定重量, 加 80% 甲醇补足减失的重量, 取适量经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤即得。

2.2 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 15% A → 35% A; 15~25 min, 35% A → 50% A); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 30 °C; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μL 。在上述色谱条件下, 红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯色谱峰对称因子均在 0.95~1.05 之间, 与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 3000。色谱图见图 1。

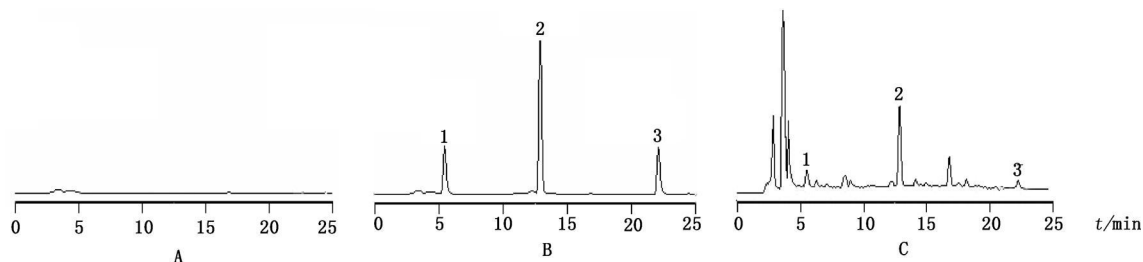


图 1 溶剂 (A)、对照品 (B)、IB34001 号二至丸 (C) 高效液相色谱图

Fig 1 Chromatograms of solvent (A), reference substances (B), sample IB34001 (C)

1 红景天苷 (salidroside) 2 女贞子苷 (nu zhen ide) 3 蟛蜞菊内酯 (wedelolactone)

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系考察 分别精密量取混合对照品储备液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得系列混合对照品溶液。按上述色谱条件进样测定。以对照品溶液浓度 $X (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得红景天苷、女贞子苷与蟛蜞菊内酯的回归方程, 分别为:

$$Y = 4.290 \times 10^4 X - 3.15 \times 10^4 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 2.915 \times 10^4 X - 5.92 \times 10^4 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 1.073 \times 10^5 X - 5.91 \times 10^4 \quad r = 0.9995$$

结果表明: 红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯浓度分别在 $2.2 \sim 88.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $9.9 \sim 396.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5 \sim 20.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.3.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯色谱峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.9%, 0.9%。结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批号样品 (批号 090701), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下进样测定。红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯含量的平均值 ($n = 6$) 分别为 $1.135, 4.432, 0.057 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.8%, 1.5%, 1.3%。结果表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 进样测定, 记录色谱峰面积。红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯色谱峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 1.0%, 1.3%, 表明供试品溶液 12 h 内稳定。

2.3.5 回收率试验 取已知含量 (批号 090701, 红景天苷、女贞子苷、蟛蜞菊内酯含量分别为 $1.135, 4.432, 0.057 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的二至丸样品 6 份, 每份约 0.25 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别加入女贞子苷对照品 1.1 mg 、 $0.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 红景天苷对照品溶液 0.5 mL 、 $0.028 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蟛蜞菊内酯对照品溶液 0.5 mL , 照“2.1.2”项下方法制备供试溶液, 按上述色谱条件测定, 计算回收率。红景天苷、女贞子

苷与蟾蜍菊内酯的平均回收率 ($n = 6$) 分别为 97. 5%, 98. 0%, 97. 8%; RSD 分别为 1. 5%, 1. 1%, 1. 2%。

2.4 样品测定 取各批次二至丸样品约 0. 5 g 精密称定, 按“2. 1. 2”项下方法制备供试品溶液。在上述色谱条件下对 3 批样品进行 3 样本分析, 以外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 二至丸中红景天苷、女贞子苷和蟾蜍菊内酯的含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

Tab 1 Contents of salidroside, nuzhenide and wedelactone in Erzhi pills

生产厂家 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	红景天苷 (salidroside)	女贞子苷 (nuzhenide)	蟾蜍菊内酯 (wedelactone)
雷允上药业有限公司 (Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd.)	B34001	4. 472	20. 019	0. 038
江西仁丰药业有限公司 (Jiangxi Renfeng Pharmaceutical Co., Ltd.)	090701	1. 135	4. 432	0. 057
江西仁丰药业有限公司 (Jiangxi Renfeng Pharmaceutical Co., Ltd.)	090901	0. 679	4. 361	0. 031

3 讨论

3.1 提取条件的选择 分别考察了加热回流法、超声提取法对 3 种成分的提取效率, 结果表明超声提取法提取效率更高, 且简便易行; 提取溶剂考察了水、30% 甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇、甲醇, 结果表明 80% 甲醇对 3 种成分提取效率均较高; 同时对 80% 甲醇用量 20, 50, 100 倍量进行考察, 结果表明 50 倍量即可提取完全; 对超声 20, 40, 60, 80 min 进行考察, 结果表明超声 60 min 即可提取完全。

3.2 检测波长的选择 取供试品溶液, 按上述色谱条件在 200~400 nm 范围内进行二极管阵列检测, 红景天苷、女贞子苷和蟾蜍菊内酯分别在 275, 240, 351

nm 处有最大吸收, 但在以上 3 个波长处 3 种成分不能兼顾, 而 220 nm 波长下三成分均有较强吸收。

3.3 流动相的选择 分别考察了甲醇-水、乙腈-水系统、乙腈-磷酸水系统, 结果以乙腈-磷酸水系统色谱峰峰形较好, 分离较理想。酸性流动相有利于改善蟾蜍菊内酯的色谱峰形。本实验采用梯度洗脱, 25 min 内完成了对 3 种有效成分的同时测定, 大大缩短了分析时间。

3.4 小结 由表 1 可见不同厂家二至丸制剂间红景天苷、女贞子苷与蟾蜍菊内酯含量差异较大, 表明很有必要对制剂中该 3 种有效成分含量进行控制。本研究所建立的 RP-HPLC 法简便、快速、准确, 重复性好, 可以为二至丸的质量控制提供依据。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 43, 351, 412
- 2 HU Hui-juan(胡慧娟), HANG Bing-qian(杭秉茜). Influences of Erzhi pills on immune system (二至丸对免疫系统的影响). *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1997, 7(6): 1
- 3 CHEN Hong-wei(陈红卫). Research progress of Fructus Ligustri Lucidi(女贞子的研究进展). *Shizhen J Tradit Chin Med Res* (时珍国药研究), 1997, 8(4): 376
- 4 LI Yang(李阳), ZUO Yan(左燕), SUN Wen-ji(孙文基). Study on antioxidant activity of two major secoiridoid glucosides in Fructus Ligustri Lucidi(女贞子中 2 种主要裂环环醚苷成分的分离鉴定及其抗氧化活性研究). *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30(5): 543
- 5 SHI Li-fu(石力夫), CAI Qi-in(蔡漆), CAO Ying-ying(曹颖瑛), et al. Chemical and pharmacodynamic studies on constituents from the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait (中药女贞子的化学成分及其药理作用). *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 1997, 15(4): 197
- 6 Wagner H, Geyer B, Kiso Y, et al. Coumestans as the main active principles of the liver drugs *Eclipta alba* and *Wedelia calendulacea* *Planta Med*, 1986, 52(5): 370

(本文于 2010 年 1 月 22 日收到)