

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.01

超高效液相色谱-紫外检测法测定肾复康合剂中落新妇苷和芦丁的含量

魏秀丽^{1,2}, 丁新仁^{3*}, 徐恩民^{1,2*}, 栾明娜⁴, 李有志^{1,2}, 孙亚磊⁴, 张传津^{1,2}

(1.山东省兽药质量检验所, 济南 250022; 2.山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250022;

3.山东齐发药业有限公司, 济南 250400; 4.青岛蔚蓝生物股份有限公司, 山东青岛 266000)

[收稿日期] 2019-03-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0001-08 [中图分类号] S859.3

[摘要] 建立了超高效液相色谱(UPLC)测定肾复康合剂中主成分落新妇苷和芦丁的含量。采用反相高效液相色谱法对落新妇苷和芦丁进行色谱分离和快速定量测定。以 ACQUITY UPLCTM C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)为分离柱, 柱温 35 ℃; 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液进行梯度洗脱; 流速 0.35 mL/min; 进样量 5 μL; 检测波长为 204 nm。通过光谱图、保留时间和峰面积参数对落新妇苷和芦丁进行定性定量检测。落新妇苷在 2~75 μg/mL 的范围内线性关系良好($R^2 > 0.998$); 方法检出限为 1 μg/mL, 方法定量限为 2 μg/mL; 芦丁在 4~150 μg/mL 的范围内线性良好($R^2 > 0.996$); 方法检出限为 2 μg/mL, 方法定量限为 4 μg/mL, 完全满足检测需求。该方法色谱分离较好, 分析速度较快, 前处理简单, 适用于肾复康合剂中落新妇苷和芦丁的定性定量检测。

[关键词] 肾复康合剂; 超高效液相色谱法; 落新妇苷; 芦丁

Determination of Astilbin and Rutin in Shenfukang Mixture by UPLC-UV

WEI Xiu-li^{1,2}, DING Xin-ren^{3*}, XU En-min^{1,2*}, LUAN Ming-na⁴,LI You-zhi^{1,2}, SUN Ya-lei⁴, ZHANG Chun-jin^{1,2}

(1. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory

of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products, Jinan 250022, China; 3. Shandong Qilu King-phar

Pharmaceutical Co Ltd, Jinan 250400, China; 4. Qingdao Vland Biotech Inc, Qingdao, Shandong 266000, China)

Corresponding authors: XU En-min, E-mail: 306964900@qq.com; DING Xin-ren, E-mail: xinrending@163.com

Abstract: This study was aimed to establish a high performance liquid chromatography (UPLC-UV) test method for the determination of astilbin and rutin in shenfukang mixture. UPLC was used to isolate and quantitatively determine of astilbin and rutin. ACQUITY UPLCTM C18 chromatographic column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was used as the separation column at column temperature 35 ℃; Gradient elution was performed with acetonitrile

基金项目: 2018 年山东省重点研发计划“家禽健康养殖天然药物的研制与开发”(2018GNC111010)

作者简介: 魏秀丽, 高级兽医师, 从事兽药和畜禽产品质量监督检验及新兽药研发工作。

通讯作者: 徐恩民, E-mail: 306964900@qq.com; 丁新仁, E-mail: xinrending@163.com

-0.1% formic acid solution; The flow rate is 0.35 mL/min, the injection volume is 5 μ L, and the detection wavelength is 204 nm. In this paper, the quantitative and qualitative analysis of astilbin and rutin was carried out by spectrogram and retention time and peak area parameters. In the range of 2~75 μ g/mL, the linear relationship of astilbin is good ($R^2>0.998$); the detection limit of the method is 1 μ g/mL, and the quantitative limit of the method is 2 μ g/mL; In the range of 4~150 μ g/mL, the linear relationship of rutin is good ($R^2>0.996$); The detection limit of the method is 2 μ g/mL ($S/N>3$), and the quantitative limit of the method is 4 μ g/mL ($S/N>10$), fully meet testing requirements. The method has good separation performance, fast analysis speed and simple pretreatment, suitable for the qualitative and quantitative detection of astilbin and rutin in shenfukang mixture.

Key words: shenfukang mixture; high performance liquid chromatography detection method; astilbin; rutin

肾复康合剂由土茯苓、槐花、白茅根、益母草、广藿香等中药经提取加工所制成的口服液体制剂,本处方来源于中华人民共和国药典 2015 年版一部“肾复康胶囊”,具有清热利尿、益肾化浊的功能^[1]。经过提取工艺参数的优化、药学药效、靶动物鸡安全性及稳定性试验等的研究,开发成一种新兽药合剂,主成分土茯苓具有解毒除湿通利关节的作用,槐花具有凉血止血之妙,在中兽医临床上用于防治由鸡大肠杆菌病、鸡传染性法氏囊病、鸡传染性支气管炎、鸡病毒性肾炎或中毒、营养代谢障碍等引起的鸡肾肿湿热证,经临床试验验证在靶动物鸡上兑水饮用^[2],安全有效经济方便。以往常常采用普通高效液相色谱方法检测土茯苓和槐花主成分中落新妇苷和芦丁的含量^[3-6],时间长,检测结果慢。本实验开发了超高效液相色谱-紫外检测法测定肾复康合剂中落新妇苷和芦丁的含量,快速可行,经济环保。

1 材料与方

1.1 药品及试剂 落新妇苷(批号 111574-201404, 20 mg, 中国食品药品检定研究院); 芦丁(批号 111868-201401, 20 mg, 中国食品药品检定研究院)。甲酸、甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯;超纯水。肾复康合剂,批号 20150601,青岛蔚蓝生物股份有限公司小试生产产品。

1.2 仪器 分析天平:感量 0.00001 g;仪器 Waters AcquityTM Ultra performance LC 超高效液相色谱仪;Aglient1260 高效液相色谱仪。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液制备 精密量取本品 0.5~1.0 mL,加 60%甲醇稀释至 50 mL,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.3.2 标准储备液的制备 精密称取落新妇苷 10.03 mg,加 60%甲醇至 10 mL,精密称取芦丁 9.98 mg,加 60%甲醇至 10 mL。

1.3.3 标准工作液的制备 取适量标准储备液,用 60%甲醇稀释,制备成系列浓度为:落新妇苷 2、5、10、25、50、75 μ g/mL,芦丁 4、10、20、50、100、150 μ g/mL 标准工作液,绘制标准曲线。

1.3.4 色谱操作条件及参数 色谱柱:ACQUITY UPLCTM C18 色谱柱(2.1mm \times 100 mm,1.7 μ m);流动相 A:乙腈;流动相 B:0.1%甲酸溶液,进行梯度洗脱;流速:0.35 mL/min;进样量:5 μ L;柱温:35 $^{\circ}$ C,进样室温度 10 $^{\circ}$ C。二极管阵列检测器,检测波长为 204 nm。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件表

Tab 1 Table of gradient eluting conditions			
time/min	Mobile phase A/%	Mobile phase B/%	curve
0	10	90	
1	10 \rightarrow 12	90 \rightarrow 88	6
3.5	12 \rightarrow 15	88 \rightarrow 85	6
7	15	85	6
8	15 \rightarrow 40	85 \rightarrow 60	6
8.5	40 \rightarrow 10	60 \rightarrow 90	6
10	10	90	6

1.3.5 重复性试验和精密度试验 配制 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对照品溶液,重复配置 6 份,进样,计算落新妇苷、芦丁峰面积 *RSD*。配制 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对照品溶液,重复进样 6 次,计算落新妇苷、芦丁峰面积 *RSD*。

1.3.6 检测限和定量限的测定 对落新妇苷和芦丁的标准工作液,进行 UPLC 的分析,并逐级降低其浓度,以溶液检测时的信噪比(S/N)分别大于等于 3 和 10 作为药物的检测限和定量限。

1.3.7 不同色谱条件样品检测比较 使用普通的液相色谱仪和超高效液相色谱仪在不同的色谱条件下运行,对同一合剂样品中两主成分落新妇苷和芦丁的含量、检测波长和出峰时间分别进行比较。

1.3.8 稳定性试验 进样室温度设置到 10 $^{\circ}\text{C}$ 。取 1.3.5 项下 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁溶液,在 10 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3、6、12、24 h;各进样 2 μL ,计算落新妇苷、芦丁峰面积 *RSD*。

1.3.9 回收率的测定 精密称定已知含量(原有量)的同一批合剂样品 0.5 mL 共 6 份,加入落新妇苷储备液 1.0 mL 和芦丁储备溶液 2.5 mL,按供试品溶液制备方法分别制备供试品溶液 50 mL,进样,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,计算落新妇苷和芦丁的回收率和 *RSD*。

1.3.10 色谱柱耐受性 本实验选择了 35 $^{\circ}\text{C}$ 流速 0.34、0.35、0.36 mL/min 测试色谱柱保留时间的耐受性。并选择流速 0.35 mL/min 保持不变,柱温 35、38、40 $^{\circ}\text{C}$ 进样,测试色谱柱的耐受性。

2 结果与分析

2.1 色谱分离 在优化的色谱条件下,测得落新妇苷和芦丁色谱峰峰形良好,且均达到基线分离,满足分离度要求。

2.2 线性 在选定的色谱条件下,使用梯度洗脱的方法,可以有效地分离目的峰,落新妇苷在 2~75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内标准曲线方程为 $y = 88300x + 77000$,*Y* 为落新妇苷峰面积,*X* 为落新妇苷的浓度,其相关系数 R^2 大于 0.998,线性良好;芦丁在 4~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内标准曲线为 $y = 43800x + 126000$,*Y* 为芦丁峰面积,*X* 为芦丁的浓度,其相关系数 R^2 大于 0.996,线性良好。

2.3 重复性试验和精密度试验 配制 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对照品溶液,重复 6 份,进样,计算落新妇苷、芦丁峰面积 *RSD* 分别为 0.63%、0.59%,满足实验要求。取 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对照品溶液,重复进样 6 次,计算落新妇苷、芦丁峰面积 *RSD* 为 0.23%、0.26%,满足实验要求。

2.4 检测限和定量限 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对照品溶液信噪比 >3 为检出限,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对照品溶液信噪比 >10 为定量限。

2.5 不同色谱条件样品检测结果比较 对同一合剂样品中两主成分落新妇苷和芦丁的含量、检测波长和出峰时间分别进行了比较,结果如表 2 所示。

表 2 不同色谱条件检测结果表(n=6)

Tab 2 Test results at different chromatographic parameter (n=6)

	waters 超高效液相色谱-紫外检测法(UPLC)		Aglient 高效液相色谱法(HPLC)	
	落新妇苷(<i>RSD</i>)	芦丁(<i>RSD</i>)	落新妇苷(<i>RSD</i>)	芦丁(<i>RSD</i>)
含量/(mg · mL ⁻¹)	1.98 (0.66%)	4.81 (0.72%)	2.01 (0.65%)	4.77(0.75%)
检测波长/nm	204	204	291	257
出峰时间/min	5.8	4.9	13.3	16.4

高效液相色谱运行条件按照中华人民共和国药典方法进行^[1]。由于两种色谱方法均已通过其方法学验证,均可以准确控制其指标成分。从检测效率上看,优选超高效法(UPLC)色谱图见图 1~图 2。普通色谱法采用了双波长检测落新妇苷和芦丁的含量,色谱图见图 3~图 4。

2.6 稳定性试验 落新妇苷、芦丁峰面积 *RSD* 为 0.47%、0.58%,满足实验要求。

2.7 加样回收试验结果 落新妇苷和芦丁的平均回收率为 98.33%和 97.14%,*RSD* 分别为 0.88%和 1.18% (表 3~表 4)。

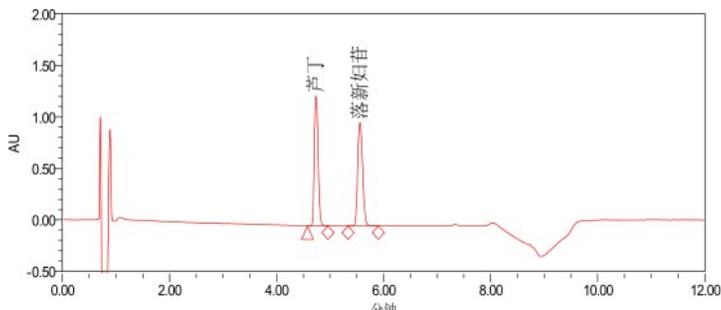


图 1 75 μg/mL 落新妇苷 150 μg/mL 芦丁对照品溶液色谱图(204 nm)

Fig 1 Chromatogram of reference solution of 75μg/mL astilbin and 150μg/mL rutin at 204 nm

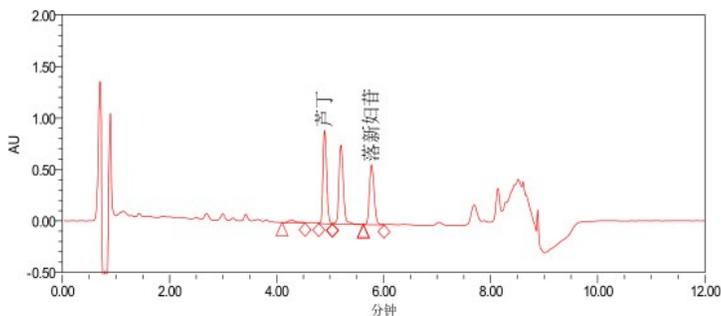


图 2 肾复康合剂样品色谱图 204 nm

Fig 2 chromatogram of Shenfukang mixture sample at 204 nm

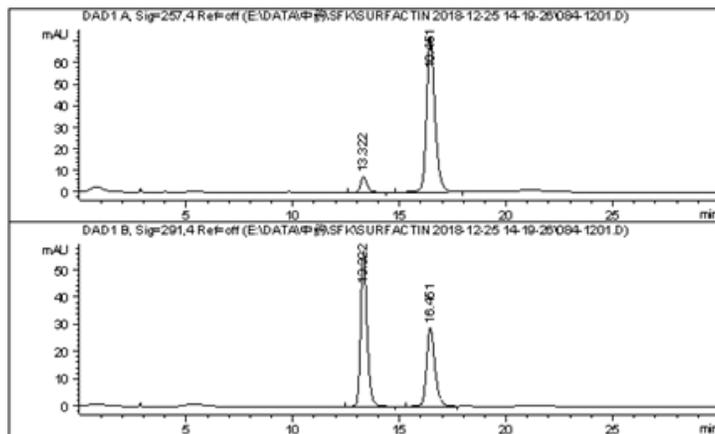


图 3 高效液相色谱法 对照品色谱图

Fig 3 chromatogram of reference standard by HPLC

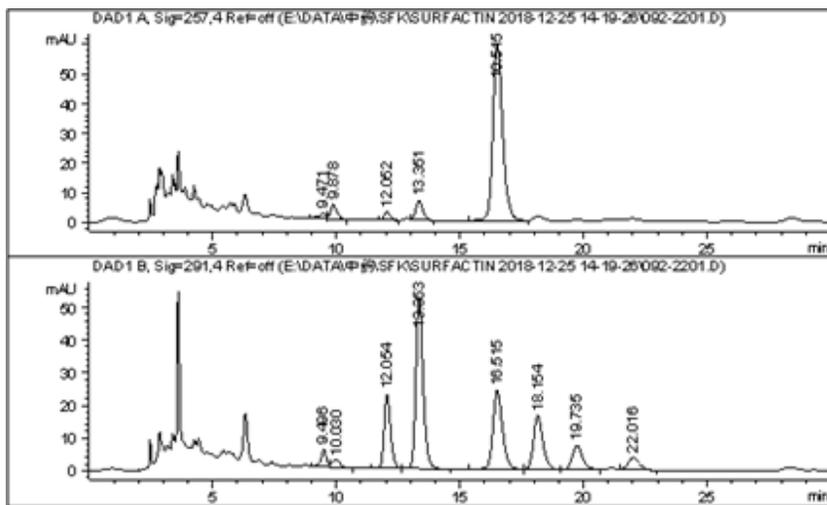


图 4 高效液相色谱法 肾复康合剂色谱图

Fig 4 Chromatogram of Shenfukang mixture by HPLC

表 3 落新妇苷加样回收率试验结果

Tab 3 Test results of recovery rate of astilbin

原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.988	1.001	1.972	99.16	98.33	0.88
0.988	1.001	1.932	97.11		
0.988	1.001	1.961	98.57		
0.988	1.001	1.975	99.28		
0.988	1.001	1.933	97.20		
0.988	1.001	1.962	98.65		

表 4 芦丁加样回收率试验结果

Tab 4 test results of Recovery of rutin

原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.405	2.293	4.520	96.22	97.14	1.18
2.405	2.293	4.619	98.32		
2.405	2.293	4.565	97.16		
2.405	2.293	4.589	97.68		
2.405	2.293	4.480	95.36		
2.405	2.293	4.608	98.09		

2.8 色谱柱耐受性 本实验选择了 35 °C 流速 0.34、0.35、0.36 mL/min 进行进样测试,保留时间如表 5 所示,流动相流速的微小变化对保留时间影响不大,最终选择 0.35 mL/min。

本实验选择流速 0.35 mL/min 保持不变,35、38、40 °C 下进样测试,保留时间如表 6 所示,分离度均满足要求。考虑到色谱柱的耐受性,最终选择 35 °C。

表 5 不同流速主成分保留时间表

Tab 5 Retention time of principal components at different flow rate

不同流速	保留时间芦丁/min	落新妇苷/min
0.34 mL/min	4.951	5.891
0.35 mL/min	4.897	5.830
0.36 mL/min	4.755	5.685

表 6 不同柱温主成分保留时间表

Tab 6 Retention time of principal components at different column temperatures

不同柱温	保留时间芦丁/min	落新妇苷/min
35℃	4.901	5.830
38℃	4.730	5.562
40℃	4.599	5.377

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择 芦丁、落新妇苷对照品和肾复康合剂样品待测液,在 2.1 项条件下,色谱保留时间为 4.884、5.760 min 左右,分离度均满足要求(图 1~图 2、图 5~图 8)。光谱图如图 9 所示。由色谱图和光谱图可以看出对照品和样品中,257 nm 落新妇苷响应值很低,291 nm 芦丁响应值较低,定量波长为顾及两者相应值都高,定为 204 nm(204 nm 基线噪音干扰并不明显),峰面积见表 7。

波长选择方面,比较了 204、291、257 nm 三个波长下落新妇苷和芦丁的峰面积,考虑到两种目标产物的检测,本方法最终选择了波长 204 nm,光谱图亦提示在这一波长处两种成分均有较大吸收,因此,检测波长由药典上的双波长简化为单波长。

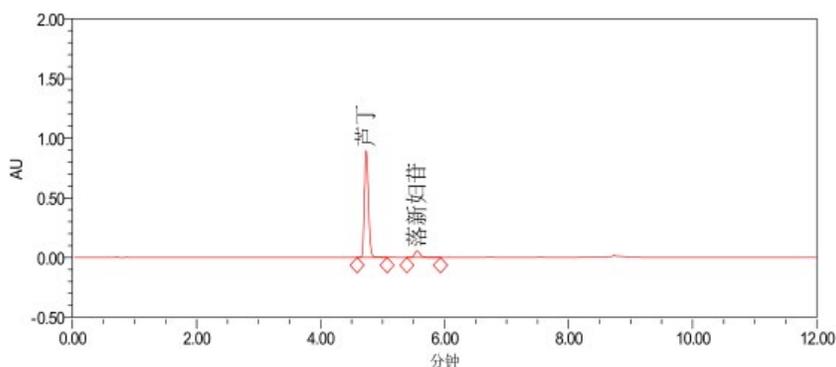


图 5 75 µg/mL 落新妇苷 150 µg/mL 芦丁对照品溶液色谱图(257 nm)

Fig 5 Chromatogram of reference solution of 75 µg/mL astilbin and 150µg/mL rutin at 257 nm

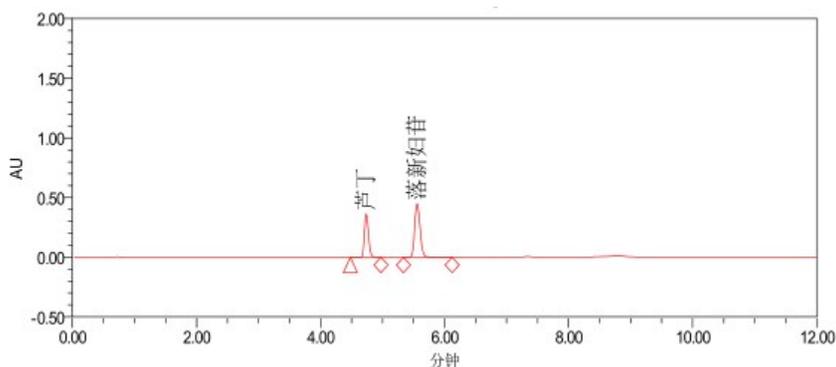


图 6 75 µg/mL 落新妇苷 150 µg/mL 芦丁对照品溶液色谱图(291 nm)

Fig 6 Chromatogram of reference solution of 75 µg/mL astilbin and 150µg/mL rutin at 291 nm

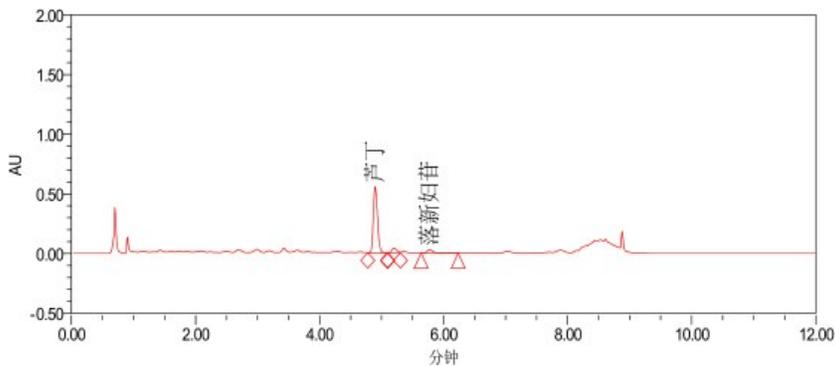


图 7 肾复康合剂样品色谱图(出峰顺序: 芦丁、落新妇苷) 257 nm

Fig 7 Chromatogram of Shenfukang Mixture(peak sequence: rutin, astilbin) at 257 nm

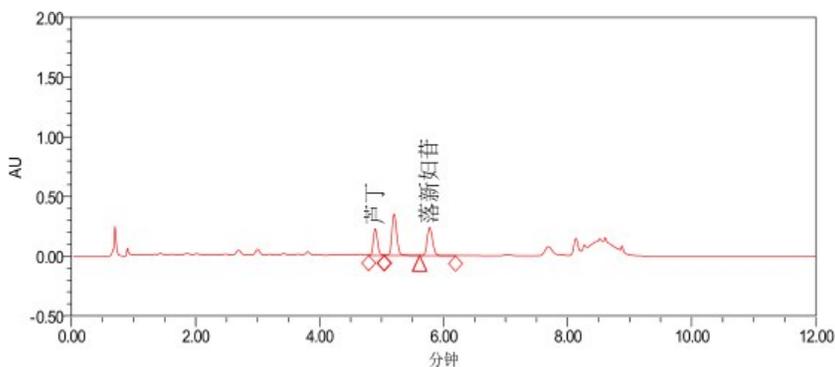


图 8 肾复康合剂样品色谱图(出峰顺序: 芦丁、落新妇苷) 291 nm

Fig 8 Chromatogram of Shenfukang Mixture(peak sequence: rutin, astilbin) at 291 nm

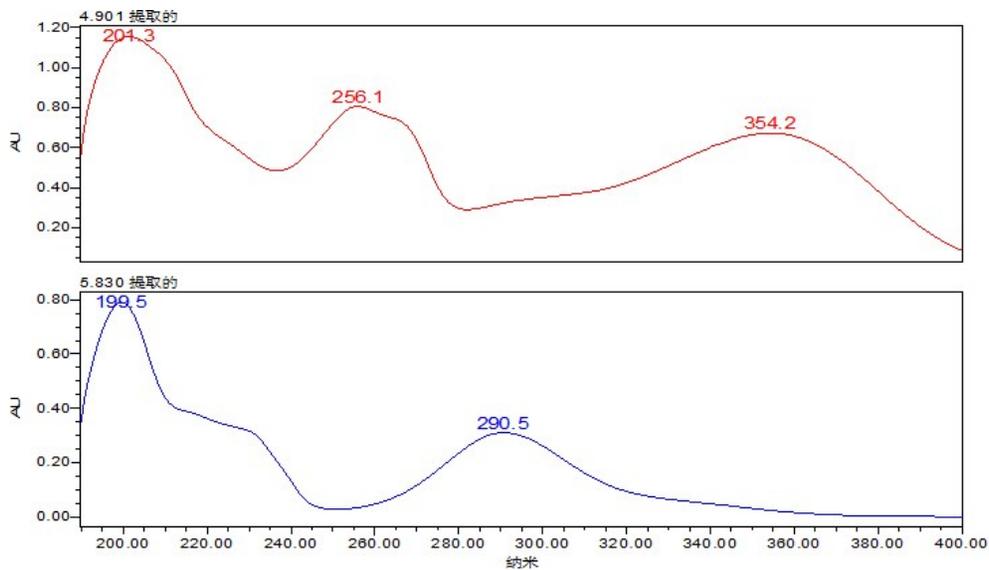


图 9 75 µg/mL 落新妇苷 150 µg/mL 芦丁对照品溶液光谱图

Fig 9 Spectrogram of reference solution of 75µg/mL astilbin and 150µg/mL rutin

表 7 与药典规定波长下比较相应峰面积表

Tab 7 comparison of peak response at the wavelength specified in Pharmacopoeia

75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 落新妇苷 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦丁对照 品溶液不同波长下 峰面积响应	落新妇苷峰面积	芦丁峰面积
204 nm	6444186	6502000
291 nm	2695327	1638965
257 nm	291056	4036425

3.2 流动相的选择 在色谱条件流动相的选择上,分别考察了有机相甲醇和乙腈及找到各自合适的比例,发现同一样品采用乙腈洗脱相比甲醇,色谱图中目标峰响应信号相对低一点,但根据两种溶剂的截止波长甲醇 205 nm 和乙腈 190 nm,因此,最终选择了乙腈-0.1%甲酸系统。

本实验选择了超高效液相色谱-紫外检测法对肾复康合剂中落新妇苷和芦丁进行定性和定量测定。与普通高效液相色谱方法相比,鉴别增加了光谱法;二是定量的色谱图出峰保留时间在 5 min 左右,每针运行时间 10 min 足够,流速 0.35 mL/min;而普通液相每针运行 35 min,流速 1.0 mL/min;超高效液相色谱方法比普通高效液相色谱方法运行时间缩短 25 min,每运行一针流动相节省 31.5 mL。在废液处理高成本的今天,超高效液相色谱方法更有优势,更经济和快捷。

综上所述,使用超高效液相色谱法,对肾复康合剂中落新妇苷和芦丁进行定性和定量测定,方法快速,可以作为企业内控标准方法,在产品工艺参

数不断调整优化的过程中,具备精准快捷、经济环保的特点,可有效控制肾复康合剂的质量。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版一部)[S]. National Pharmacopoeia Committee. Shenfukang Capsule Standard, Chinese Pharmacopoeia (1 part, 2015) [S].
- [2] 农业部兽药评审中心. 兽药研究技术指导原则[S]. Center for Veterinary Drug Evaluation, Ministry of Agriculture. Guidance for Veterinary Drug Research Technology[S].
- [3] 严爱娟,郭增喜,张文婷,等. 土茯苓落新妇苷含量测定药典方法的改进[J]. 中药材, 2016, 8:1822-1823. Yan A J, Guo Z X, Zhang W T, et al. Improvement of test method for content of Rhizoma Smilacis glabrae and astilbin in Chinese Pharmacopoeia [J]. Chinese Traditional Medicine, 2016, 8:1822-1823.
- [4] 白梅,刘为萍,李素珍. HPLC 测定不同产地土茯苓中落新妇苷和黄杞苷含量[J]. 药物分析杂志, 2013, (8):1352-1354. Bai M, Liu W P, Li S Zh. Determination of content of astilbin and engelitin in Rhizoma Smilacis glabrae from different place [J]. Journal of Medicine Analysis, 2013, (8):1352-1354.
- [5] 张笑颜,詹丽茵,曾祥腾. 高效液相色谱法测定不同产地土茯苓药材中落新妇苷的含量[J]. 中国医药导报, 2010, (7):90-91. Zhang X Y, Zhan L Y, Zeng X T. Using HPLC to test the content of astilbin in Rhizoma Smilacis glabrae from different place [J]. China Medicine Herald, 2010, (7):90-91.
- [6] 隋欣,王人悦. 落新妇苷稳定性的研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 8:10-12. Sui X, Wang R Y. Study of astilbin stability [J]. Food Study and Research, 2015, 8:10-12.

(编辑:侯向辉)