

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.23.008

反相高效液相色谱法测定五子补肾强身丸中淫羊藿苷含量

黄 玮¹, 姚强文², 包明燕³

(1. 四川省资阳市食品药品检验检测中心, 四川 资阳 641300; 2. 四川金辉药业有限公司, 四川 资阳 641300; 3. 四川省资阳市第一人民医院, 四川 资阳 641300)

摘要:目的 建立测定五子补肾强身丸中淫羊藿苷含量的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 270 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL。结果 淫羊藿苷进样量在 2.104 ~ 407.300 μg 范围内与峰面积线性关系良好, $r = 0.999\ 6$ ($n = 6$); 平均回收率为 99.07%, RSD 为 0.33% ($n = 6$)。结论 该方法简便、快速、准确, 可用于测定五子补肾强身丸的质量控制。

关键词:反相高效液相色谱; 五子补肾强身丸; 淫羊藿苷; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)23-0026-03

Content Determination of Icariin in Wuzi Bushen Qiangshen Pills by RP-HPLC

Huang Wei¹, Yao Qiangwen², Bao Mingyan³

(1. Ziyang Food and Drug Inspection Center, Ziyang, Sichuan, China 641300; 2. Sichuan Jinhui Pharmaceutical Co., Ltd., Ziyang, Sichuan, China 641300; 3. The First People's Hospital of Ziyang, Ziyang, Sichuan, China 641300)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of icariin in Wuzi Bushen Qiangshen Pills. **Methods** The chromatographic column was Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water, gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 270 nm, the column temperature was 30 ℃, and the sample size was 5 μL. **Results** Icariin showed good linear relationship in the range of 2.104 - 407.300 μg, $r = 0.999\ 6$ ($n = 6$), the average recovery rate was 99.07%, RSD was 0.33% ($n = 6$). **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which can be used for the quality control of Wuzi Bushen Qiangshen Pills.

Key words: RP-HPLC; Wuzi Bushen Qiangshen Pills; icariin; content determination

五子补肾强身丸为简阳市中医医院临床经验方剂, 为由枸杞子、菟丝子、淫羊藿^[1]、制何首乌、当归等 11 味中药制成的大蜜丸, 主治补益肝肾、养血生精, 用于肾虚精少不育, 阳痿早泄、性功能低下、腰脊酸痛、神疲乏力等肾虚体弱症^[2]。参考文献[3-10], 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定五子补肾强身丸中淫羊藿苷的含量, 快速准确。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(安捷伦公司, 包括 VWD 检测器和 LC solution 工作站); XS205 型电子分析天平(十万分之一, 梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ-500DV 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

第一作者: 黄玮, 女, 大学本科, 主管中药师, 主要从事药品检测工作, (电子信箱)37752458@qq.com。

[7] 张春辉, 焦 琦, 王国平. 咽炎片超高效液相色谱特征图谱研究[J]. 中国药业, 2018, 27(3): 19-21.
[8] 陈亮亮, 宋晓凯, 侯文彬, 等. 木蝴蝶化学成分的研究[J]. 中草药, 2007, 38(2): 186-187.
[9] 魏晓楠, 林彬彬, 谢国勇, 等. 木蝴蝶种子化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 204-207.
[10] 温献业, 刘光明, 林善远. 木蝴蝶药材的质量控制方法研究[J]. 中国药房, 2014, 25(23): 2145-2147.
[11] 许 哲. 木蝴蝶提取工艺的研究[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(2): 279-280.
[12] 李 慧, 魏 梅, 陈向东. HPLC 法同时测定木蝴蝶配方颗粒中木蝴蝶苷 B 和黄芩苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6): 713-716.

[13] 曹阳阳, 晏仁义, 杨 滨, 等. HPLC 测定广西木蝴蝶中木蝴蝶苷 B 和黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 82-84.
[14] 张昌壮, 张培旭, 姚 华, 等. HPLC 法测定木蝴蝶中木蝴蝶苷 A 和木蝴蝶苷 B 的质量分数[J]. 吉林大学学报(理学版), 2013, 51(2): 321-324.
[15] 成旭东, 刘 扬. HPLC 法同时测定木蝴蝶中 3 种黄酮成分[J]. 中成药, 2013, 35(3): 567-570.
[16] 谭雄斯, 庞武耀. HPLC 波长切换法同时测定金嗓散结胶囊中的(R,S)-告依春、羟基红花黄色素 A、丹酚酸 B、木蝴蝶苷 B 和木蝴蝶苷 A[J]. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1758-1761.

(收稿日期: 2018-06-21)

1.2 试药

淫羊藿苷对照品(批号为110737-201516,含量为94.2%,中国食品药品检定研究院);五子补肾强身丸(大蜜丸,每丸重9g,医院自制制剂,批号分别为150623,151014,160405,160801,161120,170309);乙醇(分析纯,成都科龙化学试剂厂);乙腈(色谱纯,Fisher公司);试验用水(四川科伦药业股份有限公司,批号为M18011302);灭菌注射用水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~8 min时10% A,9~35 min时10% A→35% A,35~40 min时10% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:270 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL。在此色谱条件下,理论板数按淫羊藿苷峰计应不低于5000,相邻峰之间分离度均大于1.5。色谱图见图1。

2.2 溶液制备

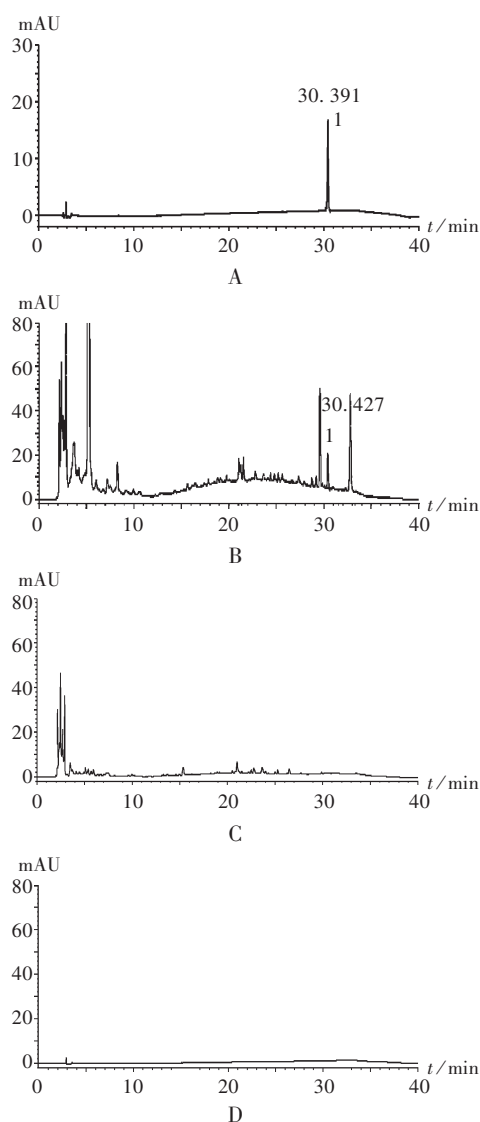
称取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,置100 mL容量瓶中,用稀乙醇溶解并定容至刻度,即得淫羊藿苷对照品质量浓度为0.1034 g/L的对照品贮备液。精密量取对照品贮备液2.0 mL,置25 mL容量瓶中,加稀乙醇配制成约为10 μg/mL的标准品溶液,即得对照品溶液。剪碎本品,取约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇50 mL,称定质量,超声处理(功率为300 W,频率为60 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例和样品制备工艺制成不含淫羊藿的阴性样品,同供试品溶液制备方法制备,即得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察^[11-15]

专属性试验:取2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各5 μL,进样测定。色谱图中,在与对照品溶液淫羊藿苷色谱峰处,阴性对照品溶液无此峰出现,表明其对样品测定无干扰。

线性关系考察:精密吸取对照品贮备液0.25,0.50,1.00,2.00,3.00,5.00 mL,分别置10 mL容量瓶中,加稀乙醇定容至刻度,摇匀,即得1~5号标准溶液,分别精密吸取上述系列标准溶液各5 μL,注入液相色谱仪,测定,以对照品质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得淫羊藿苷回归方程 $Y = 1.422X + 2.343$, $r = 0.9996$ ($n = 6$),进样质量浓度线性范围为2.104~407.300 μg/mL。

精密度试验:精密吸取2.2项下对照品溶液5 μL,连续进样6次,记录峰面积。结果淫羊藿苷峰面积的



1. 淫羊藿苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液
C. 阴性对照品溶液 D. 空白溶液

图1 高效液相色谱图

RSD 为0.56% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为160405)适量,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,记录峰面积,计算含量。结果的 RSD 为0.92% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为160405)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,24 h时进样测定。结果的 RSD 为0.78% ($n = 6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:取样品(批号为160405,含量为0.103 mg/g)6份,每份约2 g,置具塞锥形瓶中,分别精密加入对照品贮备液80%,100%,120%,各2份,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,记录峰面积,计算回收率。结果见表1。

表1 淫羊藿苷加样回收试验结果($n=6$)

称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
2.0378	0.1030	0.0827	0.1848	98.91	99.07	0.33
2.0153	0.1030	0.0827	0.1852	99.40		
2.0226	0.1030	0.1030	0.2047	98.74		
2.0042	0.1020	0.1030	0.2042	99.22		
2.0072	0.1020	0.1240	0.2253	99.44		
2.0229	0.1030	0.1240	0.2254	98.71		

2.4 样品含量测定

分别取6批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,采用外标法计算样品含量。结果批号为150623,151014,160405,160801,161120,170309样品中淫羊藿苷含量分别为每丸0.973,1.022,0.924,0.986,1.055,0.947 mg。

3 讨论

检测成分选择:该复方制剂的主要药味有枸杞子、菟丝子、淫羊藿、制何首乌、当归等,其中淫羊藿为方中主药,投药量较大,其主要功效为补肾阳、强筋骨、祛风湿,用于治疗阳痿遗精、筋骨痠软、风湿痹痛、麻木拘挛,更年期高血压。与淫羊藿补肾阳、强筋骨功效主治相关的药理作用为增强性腺功能,调节机体免疫功能,促进骨生长,延缓衰老等,其还具有强心、降血压、抗心律失常、增加脑血流量、抑菌、抗病毒、抗炎、调血脂、抗肿瘤等多种作用,具有较高的药用和保健价值。

色谱条件选择:本研究中采用梯度洗脱法分离的成分,40 min内完成分离,淫羊藿苷分离效果良好,符合含量测定要求。本研究中通过二极管阵列检测器考察所测物质紫外吸收度,在270 nm波长处有较大吸收,故选择270 nm作为检测波长。流动相比较了乙腈-水和乙腈-0.05%磷酸系统,乙腈-水梯度洗脱各色谱峰均实现基线分离,能达到定量要求。

稀释溶剂选择:标准品和样品的稀释溶剂曾选择水、稀乙醇、乙醇、50%甲醇和甲醇分别检测,发现用稀乙醇检测时样品杂质峰较少,且淫羊藿苷出峰时间无干扰。

提取条件优化:本研究中对不同提取方式(加热回流和超声)、提取溶剂(稀乙醇、70%乙醇溶液和乙醇)及提取时间(30,45,60 min)和取样量(0.5,1.0,2.0 g)进行考察,最终确定,称取样品2.0 g,加稀乙醇50 mL,超声提取30 min为最佳提取条件。

耐用性考察:本研究中分别考察了日本岛津LC-20AT型高效液相色谱仪、美国安捷伦1260型高效液相色谱仪和3种同类填料不同品牌的色谱柱进行淫羊藿苷的可重复性测定,并验证方法的可重复性。结果表明,该方法适用性及耐用性良好。

该医院制剂现行标准为《四川省食品药品监督管理局标准SZBZ20081208-11(Z)》^[2],仅有显微鉴别、当归药材的薄层色谱鉴别,未对含量进行控制,不能全面反映该制剂的质量水平,且国内尚未见对五子补肾强身丸中淫羊藿苷有效成分含量进行控制的报道。本研究中建立的方法可测定五子补肾强身丸淫羊藿苷成分的含量,方法简便、快速,可用于五子补肾强身丸的含量测定,为综合评价其质量提供准确、快速的定量分析方法,也为五子补肾强身丸的质量控制提供依据。在进行化学成分含量测定时,有2个不明物质的峰较高,从样品测定结果来看,这3种成分的含量均大于每丸1.0 mg,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:327.
- [2] SZBZ20081208-11(Z),四川省食品药品监督管理局标准·五子补肾强身丸[S].
- [3] 陈英红,黄恩喜,高阳,等. 抗骨增生丸定性定量方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(7):20.
- [4] 韩丽萍,陈行愉,刘志刚. HPLC法同时测定抗骨质疏松中成药中柚皮苷及淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房,2010,21(43):4083.
- [5] 韩丽萍,陈行愉,邓伟民. HPLC法同时测定补肾壮骨颗粒中淫羊藿苷及柚皮苷含量[J]. 中成药,2011,33(1):18.
- [6] 任春萍,王鸽,赵怀清,等. HPLC法同时测定抗骨增生片中麦角甾苷、柚皮苷和淫羊藿苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(3):211.
- [7] 欧阳露,夏勇,夏鹏,等. 高效液相色谱法同时测定补肾化痰浸膏中淫羊藿苷及柚皮苷含量[J]. 医药导报,2014,33(9):1224.
- [8] 杨立志. 双波长高效液相色谱法同时测定风湿安泰片中柚皮苷、淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2016,25(23):71-73.
- [9] 田元春,李双蕾,邓紫婷,等. 高效液相色谱法同时测定壮骨方煮散中朝藿定C和淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2016,25(22):64-66.
- [10] 潘伟,赵悦,王小柳. 高效液相色谱法测定巴戟口服液中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2016,25(22):67-68.
- [11] 白荣,龚小倩,邱海蕴,等. 反相高效液相色谱法测定心脉康合剂中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2015,24(24):158-160.
- [12] 谭安军. 高效液相色谱法测定健阳片中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2015,24(15):34-35.
- [13] 王芳,石悦,曹健. 高效液相色谱法测定延肾胶囊中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2014,23(4):37-38.
- [14] 刘源,石继伟. 高效液相色谱法测定安神补脑片中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2014,23(1):14-15.
- [15] 鲍蕾蕾,陈海飞,卞俊,等. 高效液相色谱法测定健步关节胶囊中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业,2012,21(20):42-43.

(收稿日期:2018-06-27)