

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.021

反相高效液相色谱法测定滋肾育胎丸中 金丝桃苷、毛蕊花糖苷和二苯乙烯苷含量*

杨丽娟¹, 张君娜², 苗晓红³, 辛娜¹

(1. 河北省石家庄市妇幼保健院产科, 河北 石家庄 050000; 2. 河北省石家庄市第四医院药剂科, 河北 石家庄 050000; 3. 河北省唐山市妇幼保健院产科, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 建立测定中成药滋肾育胎丸中金丝桃苷、毛蕊花糖苷和二苯乙烯苷3种活性成分含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。方法 色谱柱为 Waters Spherisorb ODS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 波长为 346 nm, 柱温为 27 ℃, 进样量为 15 μL, 流动相为乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~6 min 时 12% A, 6~22 min 时 12% A~48% A, 22~30 min 时 48% A~80% A, 30~31 min 时 80% A~12% A, 32~36 min 时 12% A)。结果 金丝桃苷、毛蕊花糖苷和二苯乙烯苷质量浓度在 0.04~32.00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率分别为 100.38%, 100.51%, 100.03%, RSD 分别为 1.91%, 1.34%, 1.28% (n=6)。结论 该方法操作简单、重复性好、精密度高, 可用于滋肾育胎丸中成药的质量控制。

关键词:反相高效液相色谱法; 中成药; 滋肾育胎丸; 金丝桃苷; 毛蕊花糖苷

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0074-04

Content Determination of Hyperin, Verbascoside and Stilbene Glycoside in Zishen Yutai Pills by RP-HPLC Method

YANG Lijuan¹, ZHANG Junna², MIAO Xiaohong³, XIN Na¹

(1. Department of Obstetrics, Shijiazhuang Maternal and Child Health Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China 050000; 2. Department of Pharmacy, Shijiazhuang Fourth Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China 050000; 3. Department of Obstetrics, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Tangshan, Hebei, China 063000)

Abstract: Objective To explore a reversed phase high-performance liquid chromatography(RP-HPLC) method for the content determination of hyperin, verbascoside and stilbene glycoside in the Chinese patent medicine Zishen Yutai Pills. **Methods** Waters Spherisorb ODS C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) liquid chromatography column was used for separation; the wavelength was settled at 346 nm and column temperature of 27 ℃, and the injection volume was 15 μL. The mobile phase was acetonitrile(A)-0.2% phosphate acid solution(B). Gradient elution procedure was as follows: 0-6 min 12% A, 6-22 min 12% A-48% A, 22-30 min 48% A-80% A, 30-31 min 80% A-12% A, 32-36 min 12% A. **Results** The components of hyperin, verbascoside and stilbene glycoside showed good linear relationships in the range of 0.04-32.00 μg/mL. The average recoveries were 100.38%, 100.51% and 100.03%, respectively, and the RSDs were 1.91%, 1.34% and 1.28%, respectively (n=6). **Conclusion** The method has the advantages of simple operation, good repeatability and high precision, which can be used for the quality control of the Chinese patent medicine Zishen Yutai Pills.

Key words: reversed phase high-performance liquid chromatography; Chinese patent medicine; Zishen Yutai Pills; hyperin; verbascoside

滋肾育胎丸是由菟丝子、砂仁、熟地黄、杜仲、人参、桑寄生、阿胶(炒)、首乌、艾叶、巴戟天、白术、党参、鹿角霜、枸杞子、续断等15味药材组方的中药成方制剂, 临床用于治疗脾肾两虚、冲任不固所致滑胎, 防治习惯性流产和先兆性流产^[1-3]。方中菟丝子具有补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻等功效^[4-6], 熟地黄具有补血滋阴、益精填髓等功效^[7-9], 杜仲具有补肝肾、强筋骨、安胎等功效^[10-12]。其质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第16册)》(WS₃-B-3113-98), 但仅对性状、鉴别和检查项作出规定, 无含量测定项, 无法更全面地控制滋肾育胎丸质量。方中菟丝子为君药, 杜仲为臣药, 熟地黄为佐药, 且3种药

材活性成分毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷均在紫外光区有较强吸收。本研究中采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法检测中成药滋肾育胎丸中金丝桃苷、毛蕊花糖苷和2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(二苯乙烯苷)3种活性成分的含量^[13-17], 旨在为药品标准的完善提供技术参考。现报道如下。

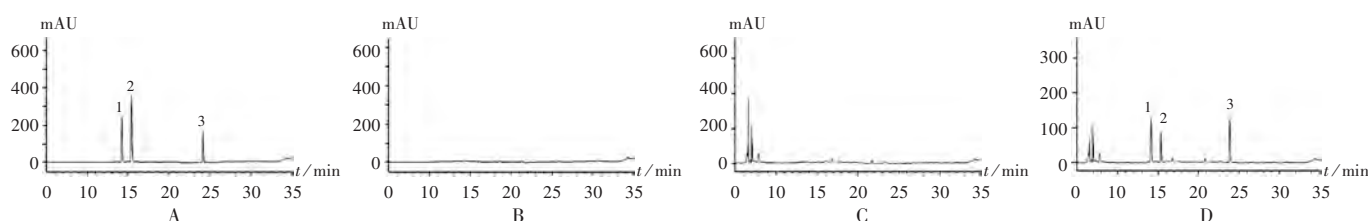
1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-1260 INFINITY 型高效液相色谱仪(包括在线脱气机、G1313A 自动进样器、G1316C 自动柱温箱和 G1315C 二极管阵列检测器, 美国安捷伦公司); BSA 124S-CW 型电子天平(德国赛多利斯公司, 精度为十

*基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目[2018242]。

第一作者: 杨丽娟, 大学本科, 主治医师, 研究方向为药学, (电子信箱)ylj2015_2016@163.com。



1. 毛蕊花糖苷 2. 金丝桃苷 3. 二苯乙烯苷

A. 对照品溶液 B. 空白溶液 C. 阴性对照品溶液 D. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

万分之一); Multiskan Sky 型紫外可见分光光度计(美国热电公司); Milli-Q Advantage A10 型纯水仪(美国密理博公司); KQ-300TDE 型高频超声波清洗仪(昆山舒美仪器公司, 功率为 300 W, 频率为 40 kHz)。

1.2 试药

金丝桃苷对照品(批号为 111521-201809, 含量以 94.9% 计), 毛蕊花糖苷对照品(批号为 111530-201713, 含量以 92.5% 计), 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品(批号为 110844-201814, 含量以 91.0% 计), 均购自中国食品药品检定研究院; 滋肾育胎丸(广州白云山一药业有限公司, 规格为每瓶 60 g, 批号分别为 S00015, ER00012, W00103); 磷酸、冰醋酸(优级纯, 国药集团); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Spherisorb ODS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 检测波长: 346 nm; 柱温: 27 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 15 μL; 流动相: 乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B, 移取 2.0 mL 磷酸至 1 000 mL 容量瓶中, 超声 5 min, 放冷), 梯度洗脱(0~6 min 时 12% A, 6~22 min 时 12% A~48% A, 22~30 min 时 48% A~80% A, 30~31 min 时 80% A~12% A, 32~36 min 时 12% A)。

2.2 溶液制备

取金丝桃苷 26.34 mg、毛蕊花糖苷 27.03 mg、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 27.47 mg, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加 95% 甲醇 20 mL, 超声溶解, 取出放冷, 定容至刻度, 摇匀, 即得对照品贮备溶液。精密移取对照品贮备溶液 1.0 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加 95% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。取样品适量, 研钵研成细粉, 过 80 目筛网, 取细粉 1.0 g, 精密称定, 置 20 mL 容量瓶中, 加 95% 甲醇 15 mL, 超声处理(功率 200 W, 频率 60 kHz) 20 min, 取出放冷, 加 95% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。按处方制备方法和药材配比比例, 制备缺紫苏子、熟地黄和杜

仲药材的阴性样品, 按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

专属性试验: 取 2.2 项下 3 种溶液, 按拟订色谱条件分别进样, 记录色谱图。结果毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷峰分离良好, 分离度均不低于 1.5, 理论板数和拖尾因子等均符合《中国药典》要求, 且阴性对照无干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察: 取 2.2 项下对照品贮备溶液适量, 加入 95% 甲醇, 得质量浓度分别为 0.04, 0.10, 4.00, 8.00, 16.00, 32.00 μg/mL 的系列标准溶液, 按拟订色谱条件分别进样测定, 记录色谱图。以 3 种活性成分的质量浓度(X)为横坐标、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 结果见表 1。可见, 毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷质量浓度在 0.04~32.0 μg/mL 范围内与其峰面积线性关系良好。

表1 3种活性成分线性回归方程、线性范围及相关系数(n=6)

成分	线性回归方程	线性范围(μg/mL)	相关系数(r ²)
毛蕊花糖苷	$Y = 177.165X + 109.332$	0.04~32.00	0.9991
金丝桃苷	$Y = 437.517X + 271.573$	0.04~32.00	0.9994
二苯乙烯苷	$Y = 2016.229X + 83.655$	0.04~32.00	0.9990

稳定性试验: 取样品(批号为 S00015), 依法制备供试品溶液, 于室温下放置 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时, 按拟订色谱条件进样分析, 记录色谱图, 并根据色谱图中 3 种活性成分峰面积计算 RSD。结果毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷峰面积的 RSD 分别为 2.13%, 1.02%, 1.91% (n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验: 取样品(批号为 S00015) 6 份, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件分别进样分析, 记录色谱图, 并计算 RSD。结果毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷含量的 RSD 分别为 3.09%, 2.31%, 3.38% (n=6), 表明方法重复性良好。

精密度试验: 取 2.2 项下对照品溶液, 按拟订色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图; 按 3 种活性成分峰面积计算 RSD。结果毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷峰面积的 RSD 分别为 1.64%, 0.93%, 1.37% (n=6), 表明仪器精密度良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为S00015),研钵研成细粉,过80目筛网;取细粉1.0g,精密称定,置20mL容量瓶中,称取6份,依照供试品溶液制备方法进行处理,得6份样品加样溶液;按拟订色谱条件分别进样测定,记录色谱图,计算3种活性成分加样回收率。结果见表2。

表2 3种活性成分加样回收试验结果(n=6)

成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
毛蕊花糖苷	1.0365	0.3016	0.4	0.7122	102.65	100.38	1.91
	1.0202	0.3145	0.4	0.7157	100.30		
	0.9889	0.3418	0.4	0.7314	97.40		
	1.0017	0.2928	0.4	0.7019	102.28		
	1.0214	0.3308	0.4	0.7303	99.88		
	0.9986	0.3138	0.4	0.7128	99.75		
金丝桃苷	1.0365	0.5764	0.4	0.9813	101.22	100.51	1.34
	1.0202	0.5549	0.4	0.9476	98.18		
	0.9889	0.5328	0.4	0.9392	101.60		
	1.0017	0.5816	0.4	0.9845	100.73		
	1.0214	0.5445	0.4	0.9432	99.68		
	0.9986	0.5261	0.4	0.9326	101.63		
二苯乙烯苷	1.0365	0.4136	0.4	0.8098	99.05	100.03	1.28
	1.0202	0.4481	0.4	0.8448	99.18		
	0.9889	0.4392	0.4	0.8462	101.75		
	1.0017	0.4606	0.4	0.8577	99.28		
	1.0214	0.4227	0.4	0.8201	99.35		
	0.9986	0.4179	0.4	0.8243	101.60		

2.4 样品含量测定

取3批样品,按供试品溶液制备方法制备溶液,按拟订色谱条件分别进样分析,采集色谱图,根据峰面积计算含量。结果见表3。

表3 各批样品中3种活性成分含量测定结果(mg/g)

批号	毛蕊花糖苷	金丝桃苷	二苯乙烯苷
S00015	0.3159	0.5527	0.4337
ER00012	0.3024	0.5126	0.4725
W00103	0.3476	0.5207	0.4439

3 讨论

3.1 检测波长优化

分别配制含毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷质量浓度为8μg/mL的标准溶液,加95%甲醇溶解并定容,取上述标准溶液分别在190~400nm波长范围内扫描。结果毛蕊花糖苷、金丝桃苷和二苯乙烯苷分别在335,359,321nm波长处有最大吸收;取对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录190~400nm全波段谱图,结果于346nm波长处3种活性成分响应最佳,故选择346nm作为检测波长。

3.2 流动相优化

曾选择乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶

液、乙腈-0.3%磷酸溶液和乙腈-0.4%磷酸溶液作为流动相体系,考察不同体系对3种活性成分分离和峰形的影响。按拟订色谱条件分别选择上述4种流动相体系,分别进样对照品溶液、阴性对照品溶液和供试品溶液,采集色谱图。结果选择乙腈-0.2%磷酸溶液作为流动相体系时,3种活性成分完全分离,且各色谱峰峰形较好。故选择其作为流动相体系。

3.3 色谱柱优化

曾选择色谱柱Waters sunfire C₁₈, Agilent Zorbax XDB C₁₈, Waters Spherisorb ODS C₁₈和Kromasil C₁₈作为分离柱,考察不同色谱柱对3种活性成分分离情况的影响。结果以色谱柱Waters Spherisorb ODS C₁₈作为分离柱时,3种活性成分完全分离,故选择其作为分析柱。

3.4 提取条件优化

滋肾育胎丸由15味药材加工而成,基质较复杂,选择最佳的提取条件对消除基质干扰有重要作用。分别选择甲醇和95%,90%,85%甲醇溶液时,考察对滋肾育胎丸中3种活性成分的提取效果,结果选择95%甲醇溶液时提取效果最佳。确定提取溶剂后,分别考察超声时间(10,15,20,25,30min)和超声功率(150,180,200,220,250W)的影响,最终确定95%甲醇溶液作为提取溶剂,功率为200W、时间为20min为最佳提取条件。

3.5 方法评价

该方法前处理简单,准确度高,重复性好,适用于滋肾育胎丸中成药产品的质量控制,可为国家药品标准的完善提供技术参考。

参考文献:

- [1] 马新想,崔海玲,张富青. 滋肾育胎丸对不孕症患者卵巢储备功能及妊娠结局的影响[J]. 陕西中医,2019,40(2):198-200.
- [2] 李莹,王宇,徐德伟. 滋肾育胎丸对多囊卵巢综合征合并不孕患者的疗效及激素水平的影响分析[J]. 当代医学,2019,25(8):48-50.
- [3] 哈斯夫,刘莉娜,孙林. 滋肾育胎丸联合地屈孕酮对促排卵周期黄体支持的疗效分析[J]. 中国医药指南,2019,17(7):154-155.
- [4] 罗晖明,赵勇,黄晓燕,等. 中药材菟丝子中金丝桃苷含量测定的影响因素研究[J]. 中国药品标准,2019,20(1):20-24.
- [5] 胡素芹,郭健,简郭血骄,等. 菟丝子黄酮对幼年大鼠睾丸支持细胞增殖和分化的影响及机制[J]. 北京中医药大学学报,2019,42(2):131-137.
- [6] 邵建柱,郭杏林,张婧,等. 菟丝子临床应用及其用量[J]. 吉林中医药,2019,39(1):36-39.
- [7] 杜珂,高晓霞,王锋,等. 基于药效物质基础的熟地黄质-效评价研究进展[J]. 中草药,2019,50(6):1477-1484.
- [8] 胡广操,张梦娇,詹倩,等. 熟地黄治疗原发性骨质疏松症的现代研究概述[J]. 浙江中医杂志,2019,54(3):232-233.
- [9] 胡勇军,彭翔,王鹏,等. 熟地黄提取物对心肌梗死模型大鼠血小板衍生生长因子及Bcl-2的影响[J]. 国际中医中