

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.021

高效液相色谱法测定九叶酒中标志性成分淫羊藿苷含量

李婷婷, 陈茂钦, 张 竞, 王 倩, 王雪芹

(河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450018)

摘要:目的 建立保健酒九叶酒中标志性成分淫羊藿苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 XSelect® CSH C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(30:70, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 °C, 检测波长为 270 nm, 进样量为 10 μL。结果 色谱峰分离度良好, 淫羊藿苷质量浓度在 5.166 9~206.674 8 μg/mL ($r=0.999\ 5$) 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率为 100.57%, RSD 为 0.83% ($n=9$)。结论 该方法可用于九叶酒的质量控制及生产过程控制。

关键词: 高效液相色谱法; 九叶酒; 保健酒; 淫羊藿苷; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)13-0074-03

Content Determination of Icaritin in Jiuye Wine by HPLC

LI Tingting, CHEN Maoqin, ZHANG Jing, WANG Qian, WANG Xueqin

(Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou, Henan, China 450018)

Abstract: **Objective** To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of icaritin in the Jiuye Wine. **Methods** An XSelect® CSH C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted; the mobile phase was acetonitrile-water(30:70, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35 °C, the detection wavelength was 270 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The chromatographic peak separation was good; the icaritin concentration in 5.166 9~206.674 8 μg/mL showed a good linear relationship($r=0.999\ 5$), the average recovery was 100.57%, RSD was 0.83% ($n=9$). **Conclusion** The method can be used for the quality control and production process control of Jiuye Wine.

Key words: high performance liquid chromatography; Jiuye Wine; health wine; icaritin; content determination

九叶酒是以黄芪、淫羊藿、山茱萸、石斛、生地黄、枸杞、桂圆、大枣、白酒、水为主要原料加工制成的保健酒, 具有缓解疲劳、增强免疫力的功能, 方中淫羊藿为主要原料。因此, 本研究中参考文献[1-10]建立了测定九叶酒中淫羊藿苷含量的高效液相色谱(HPLC)法, 为该制剂的生产过程及质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Waters 2695-2998 型液相色谱仪(沃特世公司); XPE205 型电子天平(梅特勒公司, 精度为十万分之一)。

试剂: 淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 110737-201516, 含量为 94.2%); 九叶酒(河南省艾民股份有限公司, 批号分别为 20181123-01, 20181123-02, 20181123-03, 20181124-1, 20181124-3, 20181124-5, 20190212-1, 20190212-2, 20190212-3); 甲醇、乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司); 超纯水; 甲醇、磷酸二氢钠、醋酸、磷酸均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

取淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释成每 1 mL 含 50 μg 的溶液, 即得对照品溶液。精密量取样品(批号为 20181123-03)2 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过,

即得供试品溶液。精密量取不含淫羊藿药材的阴性样品 2 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 即得阴性对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: XSelect® CSH C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(30:70, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测波长: 270 nm; 进样量: 10 μL。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.1 项下 3 种溶液注入色谱仪, 记录色谱图, 详见图 1。淫羊藿苷峰与相邻杂质峰均能基线分离, 表明该方法的专属性良好。

线性关系考察: 取淫羊藿苷对照品 10.97 mg, 精密称定, 置 20 mL 容量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液; 分别精密量取 0.5, 1.0, 1.0, 3.0, 2.0 mL, 分别置 10, 10, 5, 10, 5 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 制成质量浓度为 0.025, 0.050, 0.100, 0.150, 0.200 mg/mL 的线性试验溶液; 再取质量浓度为 0.05, 0.10 mg/mL 的线性试验用溶液各 1 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 制成质量浓度为 0.005, 0.010 mg/mL 的线性试验用溶液, 摇匀, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X , μg/mL)为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $Y=22\ 016\ X-$

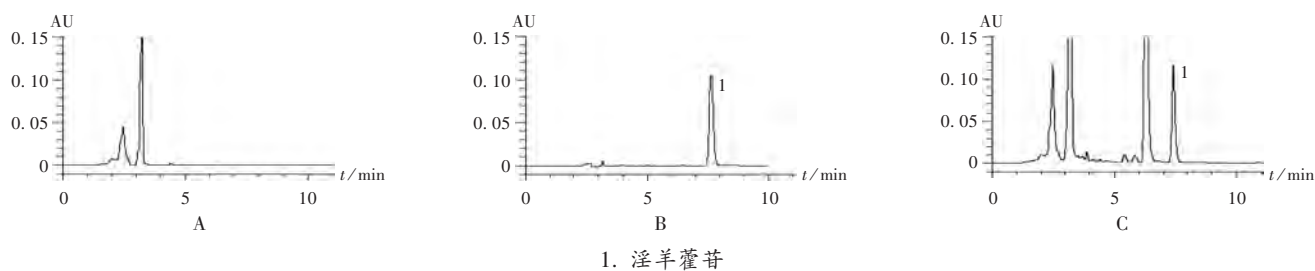


图1 高效液相色谱图

19 645, $r = 0.999 5$ 。结果表明,淫羊藿苷质量浓度在 5.166 9 ~ 206.674 8 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一对照品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,连续测定 6 次,记录峰面积。结果淫羊藿苷峰面积的 RSD 为 1.01% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 20181123-03)样品依法制备供试品溶液,取 2 mL 置 25 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,配制 6 份,分别进样计算含量。结果平均含量为 0.637 mg/mL, RSD 为 0.44% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取上述对照品溶液及供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 h 时进样测定。结果淫羊藿苷含量的 RSD 分别为 1.22% 和 0.34%,表明待测溶液在 24 h 内稳定。

定量限与检测限确定:取线性关系考察项下的质量浓度最低的对照品溶液逐级稀释后测定,按信噪比 10 : 1 为定量限,3 : 1 为检测限。结果表明,本方法定量限为 103.34 ng/mL,检测限为 20.67 ng/mL。

加样回收试验:称取淫羊藿苷对照品 10 mg,精密称定,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇适量,超声使溶解,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品浓溶液,精密量取 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。精密量取已知含量的样品(批号 20181123-03,含量为每 100 mL 含 63.9 mg)1 mL,平行取 9 份,置 25 mL 容量瓶中,分别加入质量浓度为 0.479 48 mg/mL 的对照品溶液 0.7, 1.3, 2.0 mL(每个浓度 3 份),用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,得供试品溶液。取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 9 批样品,依法制备供试品溶液,按拟定色谱条件测定,计算含量。批号为 20181123-01, 20181123-02, 20181123-03, 20181124-1, 20181124-3, 20181124-5, 20190212-1, 20190212-2, 20190212-3 的样品中淫羊藿苷含量分别为每 100 mL 含 58.8, 59.2, 63.7, 55.1, 55.7, 69.1, 73.2, 73.5, 73.3 mg。

表1 淫羊藿苷加样回收试验结果($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.639	0.335 6	0.979 9	101.57	100.57	0.83
0.639	0.335 6	0.978 5	101.16		
0.639	0.335 6	0.975 2	100.16		
0.639	0.623 3	1.257 6	99.24		
0.639	0.623 3	1.270 0	101.23		
0.639	0.623 3	1.268 6	101.00		
0.639	0.959 0	1.592 3	99.41		
0.639	0.959 0	1.607 9	101.04		
0.639	0.959 0	1.600 9	100.31		

3 讨论

3.1 测定波长选择

提取淫羊藿苷的 HPLC-PDA 图,显示淫羊藿苷在 269 nm 波长处有最大吸收,故选 270 nm 为测定波长。

3.2 流动相选择

参考文献[1-10],曾分别对乙腈-水^[1-6]、乙腈-0.05% 磷酸溶液^[7-8](pH 为 2.5)、甲醇-水^[9]、乙腈-0.4% 醋酸水溶液^[10](pH 为 3.2)、乙腈-10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 为 5.0)系统进行了考察,发现当有机相用甲醇时,比例提高至水-甲醇(50 : 50, V/V)时,淫羊藿苷峰保留时间为 21.8 min,且供试品溶液主峰与前面杂质峰未达到有效分离,显示甲醇对目标测定成分淫羊藿苷的洗脱能力比乙腈弱,故选用有机相为乙腈。无论水相中加醋酸、磷酸或磷酸二氢钠溶液,都与选用等比例纯水时,淫羊藿苷主峰保留时间、峰形及分离度无差异,故选用水相为纯水。淫羊藿苷水相比例微调,对保留时间影响较大,但调整比例在 2% 内时,色谱峰形尖锐,其分离度均大于 1.5。结合 2015 年版《中国药典(一部)》中淫羊藿中淫羊藿苷的含量测定方法,选定流动相比比例为乙腈-水(30 : 70, V/V)。

3.3 耐用性考察

曾用色谱柱 Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)和 Hypersil™ GOLD 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),分离效果好,换用仪器 Waters 2695-2998 液相色谱仪、安捷伦 1260 液相色谱仪、戴安 U3000 液相色谱仪测得结果均相近,表明该方法耐用性较好,重复性强。