

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.017

高效液相色谱法同时检测安神补脑胶囊中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D葡萄糖苷和淫羊藿苷含量*

江 勋,彭婷婷,周 峰

(湖南省衡阳市市场监督管理局检验检测中心,湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 建立同时测定安神补脑胶囊中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D葡萄糖苷和淫羊藿苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为Shimadzu Shim-pack VP-ODS C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~11 min时20% A,11~12 min时20% A~36% A,12~24 min时36% A,24~25 min时36% A~20% A,25~30 min时20% A),流速为1.0 mL/min,检测波长为350 nm,柱温为35℃,进样量为10 μL。结果 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D葡萄糖苷和淫羊藿苷质量浓度分别在16.79~251.84 μg/mL($r=1.000\ 0$)和4.98~74.52 μg/mL($r=0.999\ 9$)范围内与峰面积线性关系良好;平均回收率分别为97.95%和98.75%,RSD分别为1.48%和1.83%($n=9$)。结论 该方法可用于安神补脑胶囊中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D葡萄糖苷和淫羊藿苷的含量测定。市售不同厂家的产品中两者含量差异较大,提升质量标准对其质量控制很有必要。

关键词:安神补脑胶囊;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D葡萄糖苷;淫羊藿苷;高效液相色谱法;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)23-0063-04

Simultaneous Determination of 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D Glucoside and Icaritin in Anshen Bunao Capsules by HPLC

JIANG Xun, PENG Tingting, ZHOU Feng

(Inspection and Testing Center, Hengyang Market Supervision, Hengyang, Hunan, China 421001)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D glucoside and icaritin in Anshen Bunao Capsules. **Methods** The chromatographic column was Shimadzu Shim-pack VP-ODS C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm),the mobile phase was acetonitrile(A)-water(B) with gradient elution(0-11 min 20% A,11-12 min 20% A~36% A,12-24 min 36% A,24-25 min 36% A~20% A,25-30 min 20% A),the flow rate was 1.0 mL/min,the detection wavelength was 350 nm,the column temperature was 35℃,and the sample volume was 10 μL. **Results** The 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D glucoside and icaritin showed good linear relationship with the peak area in the ranges of 16.79-251.84 μg/mL($r=1.000\ 0$),4.98-74.52 μg/mL($r=0.999\ 9$),respectively. The average recoveries were 97.95% and 98.75%,the RSDs were 1.48% and 1.83%($n=9$),respectively. **Conclusion** The method can be used for the content determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D glucoside and icaritin in Anshen Bunao Capsules. The contents of the two components in the products from different manufacturers are quite different,so it is necessary to improve the quality standards for their quality control.

Key words: Anshen Bunao Capsules;2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D glucoside;icaritin;HPLC;content determination

安神补脑胶囊是由鹿茸、制何首乌、淫羊藿、干姜、甘草、大枣经提取后加维生素B₁组成的复方制剂,具有生精补髓、益气补血、健脑安神的功效,用于肾精不足、气血两亏所致失眠、健忘、头晕、神经衰弱等症^[1],临床

应用广泛,疗效较好,且安全性好。全国仅有4家药品生产企业具备批准文号(分别为国家食品药品监督管理局标准YBZ15322009,YBZ02542009,YBZ06762009,YBZ08452009),但其质量标准不一,均以2,3,5,4'-四

*基金项目:湖南省衡阳市科技计划项目[2019jh010833]。

第一作者:江勋,大学本科,副主任药师,研究方向为食品、药品、化妆品、保健品、医疗器械质量管理,(电话)0734-8197121(电子邮箱)86072360@qq.com。

[8] 梁启超. 丹参红花配伍研究评价[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019,6(8):18.

[9] 黄红泓,覃日宏,柳贤福. 中药当归的化学成分分析与药理作用探究[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(58):127.

[10] 欧阳罗丹,肖苏萍,尚兴朴,等. 黄芪薄层鉴别方法的改进[J]. 中国现代中药,2019,21(12):1630-1635.

[11] 李海强,贝光明,李 彤,等. 瑶医药治疗肝硬化腹水的临

床经验及思路挖掘与整理[J]. 中华中医药学刊,2016,34(11):2580-2582.

[12] 段章好,陈新梅. 抗乙肝病毒中药活性成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(11):112-115.

[13] 杨孟妮,张 慧,刘 娟,等. 叶下珠化学成分研究[J]. 中草药,2016,47(20):3573-3577.

(收稿日期:2020-03-10;二次修回日期:2020-06-16)

羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷的含量测定作为处方中制何首乌的质控指标。方中制何首乌和淫羊藿为君药。淫羊藿始载于《神农本草经》，具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿等功效，可用于增强免疫力、治疗骨质疏松、改善心肺功能^[2-4]，约有 55 种，我国有 45 种^[5]，其中 4 种收录于 2015 年版《中国药典（一部）》，分别为淫羊藿 *Epimedium Brevicornu* Maxim、箭叶淫羊藿 *Epimedium Sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim、柔毛淫羊藿 *Epimedium Pubescens* Maxim、朝鲜淫羊藿 *Epimedium Koreanum* Nakai 的干燥叶，性辛、温，味甘，补肾阳，强筋骨，祛风湿^[6]。不同品种、产地、采收季节的淫羊藿中的指标性功效成分淫羊藿苷含量差异较大^[7-8]，可能导致不同厂家不同批次产品的疗效差异。为了能更有效地对安神补脑胶囊进行质量控制，本研究中把单一指标定量控制提高到同时控制 2 个指标成分的含量，建立同时测定安神补脑胶囊中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷和淫羊藿苷含量的高效液相色谱（HPLC）法^[9]。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Shimadzu LC-20AT 型液相色谱仪，SPD-M20A 型检测器，均购自日本岛津公司；AE240S 型电子分析天平（瑞士梅特勒-托利多集团公司，精度为十万分之一）；DK-615HT 型超声波清洗仪（深圳市得康洗净电器有限公司，功率为 360 W，频率为 40 kHz）。

1.2 试药

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，纯度为 91.0%），淫羊藿苷对照品（批号为 110737-201516，纯度为 94.2%），均购自中国食品药品检定研究院；安神补脑胶囊（江苏晨牌药业集团股份有限公司，批号分别为 1804152，180523，1807092，1901072，1903082，1904012，1907122；江西南昌桑海制药有限责任公司，批号分别为 181007，181209，190120，190247；亚宝药业集团股份有限公司，批号为 190301）；乙腈（色谱纯，批号为 N9CA1H），甲醇（色谱纯，批号为 T3AG1H），均购自美国 Honey Well 公司；水为屈臣氏蒸馏水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Shimadzu Shim-pack VP-ODSG₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-水（B），梯度洗脱（0~11 min 时 20% A，11~12 min 时 20% A~36% A，12~24 min 时 36% A，24~25 min 时 36% A~20% A，25~30 min 时 20% A）；流速：1.0 mL/min；检测波长：350 nm；柱温：35℃；进样量：10 μL。理论板数按 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷和淫羊藿苷峰计均不低于 10000。在此色谱条件下，2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷和淫羊藿苷与其他组分均能达到基线分离，色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

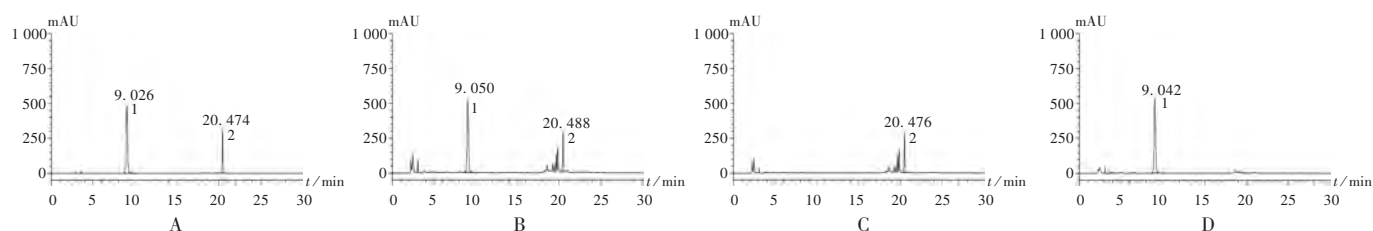
取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷和淫羊藿苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷 251.84 μg、淫羊藿苷 74.52 μg 的混合对照品溶液。取样品 0.25 g，置具塞锥形瓶中，精密加入稀乙醇 50 mL，密塞，称定质量，超声（功率为 300 W，频率为 40 kHz）处理 30 min，取出，放冷，再称定质量，用稀乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。按标准中的处方量及制备方法，分别制备不含制何首乌、淫羊藿的样品，按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

阴性干扰试验：取 2.2 项下 3 种溶液，按拟订色谱条件进样测定。色谱图见图 1。

线性关系考察：分别取对照品溶液适量，加甲醇稀释成含 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷 16.79, 33.58, 67.16, 134.32, 167.90, 201.47, 251.84 μg/mL 和淫羊藿苷 4.98, 9.93, 6.62, 19.86, 49.68, 59.61, 74.52 μg/mL 的系列溶液，按拟订色谱条件进样测定，分别以对照品溶液的质量浓度（X）为横坐标、色谱峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程。结果见表 1。

定量限和检测限确定：精密量取对照品溶液，用甲醇依次稀释至由高到低的溶液，测得 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷和淫羊藿苷的检测



1. 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷 2. 淫羊藿苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺何首乌阴性对照品溶液 D. 缺淫羊藿阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

表1 线性关系、定量限和检测限考察结果

成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
G	$Y=9279.3X-16261$	1.000 0	16.79~251.84	0.279 8	0.839 5
I	$Y=11406X-1473.9$	0.999 9	4.98~74.52	0.082 8	0.248 4

注:G为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷,I为淫羊藿苷,下表同。

限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)。结果见表1。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液10 μL ,按拟订色谱条件连续进样5次。结果2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷色谱峰面积的RSD分别为0.47%和0.61% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为1807092)适量,分别于

表2 加样回收试验结果($n=9$)

取样量(g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
	G	I	G	I	G	I	G	I	G	I	G	I
0.248 2	3.220 5	0.246 6	1.217 5	0.100 6	4.407 9	0.345 9	97.53	98.71				
0.250 1	3.245 2	0.248 5	1.217 5	0.100 6	4.419 8	0.345 6	96.48	96.52				
0.250 9	3.255 5	0.249 3	1.217 5	0.100 6	4.417 5	0.346 2	95.44	96.32				
0.249 6	3.238 7	0.248 0	2.434 9	0.201 1	5.643 1	0.451 2	98.75	101.04				
0.251 3	3.260 7	0.249 7	2.434 9	0.201 1	5.618 5	0.445 5	96.83	97.36	97.95	98.75	1.48	1.83
0.248 9	3.229 6	0.247 3	2.434 9	0.201 1	5.632 2	0.450 3	98.67	100.94				
0.250 2	3.246 5	0.248 6	3.652 4	0.301 7	6.891 4	0.545 7	99.79	98.48				
0.251 7	3.265 9	0.250 1	3.652 4	0.301 7	6.887 5	0.553 5	99.16	100.56				
0.250 6	3.251 6	0.249 0	3.652 4	0.301 7	6.865 3	0.547 1	98.94	98.81				

2.4 样品含量测定

取样品约0.25 g,精密称定,依法制备供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液和样品溶液各20 μL ,注入液相色谱仪,平行测定2次,计算2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷含量。结果见表3。

表3 安神补脑胶囊成分定量测定结果(mg/g , $n=12$)

批号	G	I	批号	G	I
1804152	12.953 2	2.365 1	1907122	12.256 3	2.365 4
180523	10.368 5	2.414 1	181007	9.698 5	5.012 3
1807092	12.033 2	1.049 2	181209	9.273 4	5.597 4
1901072	11.035 8	2.365 4	190120	10.586 3	4.986 5
1903082	11.268 5	1.698 5	190247	10.147 5	4.215 5
1904012	12.001 4	2.058 7	190301	11.659 5	2.080 1

3 讨论

3.1 测定波长选择

紫外吸收图谱显示,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷最大吸收波长分别为320 nm^[9]和270 nm^[6],但其色谱图中二者对应保留

配制后0,4,8,12,18,24 h时按拟订色谱条件进样测定。结果2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷色谱峰峰面积的RSD分别为0.41%和0.62% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:精密称取同一批(批号为1807092)样品6份,分别依法制备供试品溶液,进样测定。结果2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷峰面积的RSD分别为0.87%和0.95% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为1807092)样品9份,分别精密加入2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷对照品适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表2。

时间处均有干扰峰存在。试验表明,在350 nm波长处二者均有良好吸收,且相应保留时间处无杂质峰干扰,故选择350 nm作为测定波长^[9]。

3.2 流动相选择

分别考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液的等度洗脱和梯度洗脱,结果仅乙腈-水梯度洗脱可以同时使2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷的分离都达到满意效果,且流动相本身干扰小,稳定、可靠,故选择乙腈-水梯度洗脱。

3.3 提取方法选择

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷和淫羊藿苷均在稀乙醇中有良好的溶解度,且提取效果佳,干扰少,故选择稀乙醇为提取溶剂。分别考察了提取时间为20,30,40 min时二者的含量,结果30 min的提取效果最佳。

3.4 样品分析

对收集到的12批不同厂家生产的样品进行检测,发现2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D葡萄糖苷含量较接近,但淫羊藿苷含量差异较大。考虑不同