

RP-HPLC法测定补肾强身片中金丝桃苷的含量

方慧祥^{1*}, 杨坤芬², 冯玉茹² (1. 曲靖市食品药品检验所, 云南 曲靖 655000; 2. 云南省药物研究所, 昆明 650111)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0413-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.41

摘要 目的: 建立测定补肾强身片中金丝桃苷含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Amethyst C₁₈-H, 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(16:84, V/V), 流速为1.0 ml/min, 柱温为30 ℃, 检测波长为360 nm, 进样量为10 μl。结果: 金丝桃苷的进样量在0.061 0~1.220 4 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.52%; 平均加样回收率为98.68%, RSD为0.64% ($n=6$)。结论: 本方法快速、简便, 结果准确、可靠, 可用于补肾强身片的含量测定。

关键词 反相高效液相色谱法; 补肾强身片; 金丝桃苷; 含量测定

Content Determination of Hyperoside in Bushen Qiangshen Tablets by RP-HPLC

FANG Hui-xiang¹, YANG Kun-fen², FENG Yu-ru² (1. Qujing Institute for Food and Drug Control, Yunnan Qujing 655000, China; 2. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of hyperoside in Bushen qiangshen tablets. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Amethyst C₁₈-H column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (16:84, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 360 nm, the sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of hyperoside were 0.061 0-1.220 4 μg ($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 98.68% (RSD=0.64%, $n=6$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 0.52%. CONCLUSIONS: This method is accurate, rapid, simple and reliable. It can be used for the content determination of Bushen qiangshen tablets.

KEYWORDS RP-HPLC; Bushen qiangshen tablets; Hyperoside; Content determination

柠檬烯和 α -蒎烯的含量, 结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=3$)

批号	桉油精, mg/粒	RSD, %	柠檬烯, mg/粒	RSD, %	α -蒎烯, mg/粒	RSD, %
20120206	119.91	0.86	91.27	1.01	29.11	1.12
20130401	125.21	0.71	96.64	0.16	30.24	0.52
20130802	118.20	0.37	92.34	1.09	28.55	0.48

3 讨论

近年来, 环境污染日趋严重, 鼻炎、鼻窦炎、支气管炎和肺炎等呼吸系统疾病患者逐年增加。桉柠蒎肠溶软胶囊作为治疗呼吸系统疾病的辅助用药, 临床应用也逐渐增多。本试验建立了同时测定桉油精、柠檬烯和 α -蒎烯含量的方法, 为该胶囊的含量测定提供了简单、快速、准确、有效的方法。

笔者尝试采用甲醇-水^[7]为流动相同时测定桉油精、柠檬烯和 α -蒎烯的含量。结果发现, 桉油精无吸收, 柠檬烯、 α -蒎烯分离度小。由于桉油精分子中无双键, 需采用末端吸收, 而乙腈比甲醇的末端吸收波长小, 因此选用乙腈-水作为流动相。

由于桉柠蒎肠溶软胶囊中 α -蒎烯及某些辅料不溶于乙腈^[8], 故选用异丙醇溶解对照品及软胶囊, 并在流动相中加入适量异丙醇。结果表明, 采用乙腈-水-异丙醇(70:28:2, V/V/V)为流动相同时测定桉油精、柠檬烯和 α -蒎烯的含量, 分离效果好, 分析物质出峰快, 杂峰少, 灵敏度高, 专属性强, 操作简便快

速, 适用于该制剂的含量测定。

综上所述, 该方法简单、快速、结果准确, 可用于桉柠蒎肠溶软胶囊的含量测定。

参考文献

- [1] 张少芳, 张翠欣. 桉柠蒎肠溶软胶囊的质量控制和临床应用研究进展[J]. 临床合理用药, 2014, 7(2): 173.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录62.
- [3] 赵晓岷, 陈晓辉, 谭晓婧, 等. GC同时测定高良姜挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯、桉油精和 α -松油醇的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(27): 2751.
- [4] 张加, 陈晓辉, 张迪, 等. GC法同时测定萹蓄挥发油中6中成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 424.
- [5] 张淑蓉, 裴晓丽, 王华阳. 不同采收期连翘挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的比较[J]. 中国药房, 2013, 24(47): 4469.
- [6] 张少芳. 桉柠蒎肠溶软胶囊质量控制及治疗矽肺合并感染的疗效[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [7] 张瑞伦, 张庆, 徐世艾. HPLC测定留兰香油中柠檬烯[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2): 743.
- [8] 何兵, 田吉, 刘艳, 等. HPLC测定11种中药挥发油中桉油精的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 769.

(收稿日期: 2014-07-23 修回日期: 2014-09-15)

(编辑: 孙冰)

* 主管药师。研究方向: 食品药品质量标准。电话: 0874-8994091。E-mail: 2224029987@qq.com

补肾强身片由淫羊藿、菟丝子、金樱子、女贞子、狗脊(烫)等5味中药材组成,临床一般用于治疗腰酸足软、头晕耳鸣、眼花心悸^[1]。其中,菟丝子为方中臣药,是旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R.Br.或菟丝子 *C. chinensis* Lam.的干燥成熟种子,具有补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻之功效,可用于治疗肝肾不足、腰膝酸软、阳痿遗精、遗尿、尿频、肾虚胎漏、胎动不安、目昏耳鸣、脾肾虚泻等^[2]。补肾强身片现行的质量标准为原卫生部颁药品标准《中药成方制剂》(第十五册),但其标准较为简单。为了更好地控制补肾强身片的质量、确保临床疗效,本研究参照2010年版《中国药典》^[2]及相关文献^[3-7],建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定补肾强身片中金丝桃苷含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包含真空在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、VCD检测器和Chemstation化学工作站(日本岛津公司);KQ-300VDB型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);MS205DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

补肾强身片(企业1,批号:131109;企业2,批号:120702;企业3,批号:130101);金丝桃苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111521-201004,纯度:93.9%);乙腈为色谱纯,水为重蒸水,磷酸、盐酸、甲醇、乙醇、乙酸乙酯均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Amethyst C₁₈-H(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(16:84, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长:360 nm;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取金丝桃苷对照品10.83 mg,置于100 ml量瓶中,加甲醇使溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为对照贮备液(质量浓度为0.101 7 mg/ml)。精密吸取对照品贮备液15 ml,置于50 ml量瓶中,加80%甲醇稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得(质量浓度为30.51 μg/ml)。

2.2.2 供试品溶液 取样品30片,除去包衣,研细,精密称取约2.50 g(相当于10片补肾强身片)置于具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25 ml,密塞,称定质量,超声(功率:300 W,频率:45 kHz)处理60 min,放冷,再次精密称定,加80%甲醇补足缺失的质量,摇匀,静置,取上清液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按补肾强身片的处方比例及制备工艺制备不含菟丝子的阴性样品。取阴性样品适量,按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下供试品溶液、对照品溶液、阴性样品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可见,阴性样品溶液在对照品色谱峰所在位置无干扰峰,供试品溶液中的主峰与其相邻色谱峰均能达到基线分

离;理论板数按金丝桃苷峰计应不低于5 000。

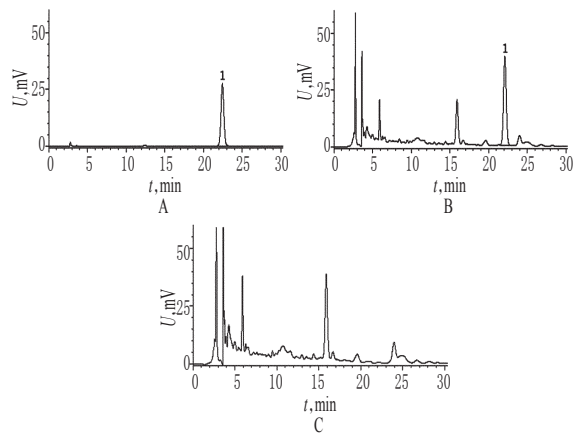


图1 高效液相色谱图

A. 金丝桃苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 金丝桃苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. hyperoside control; B. test sample; C. negative control; 1. hyperoside

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液2、5、10、15、20、25、30、40 μl,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品的进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=2\ 335\ 668x-6\ 967$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,金丝桃苷的进样量在0.061 0~1.220 4 μg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样7次,记录峰面积。结果,金丝桃苷峰面积的RSD为0.25%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,分别在放置0、2、4、8、16、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,金丝桃苷峰面积的RSD为0.32%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取本品(批号:131109)适量,研细,精密称取6份,每份约2.50 g,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,金丝桃苷的平均含量为0.427 1 mg/g,金丝桃苷峰面积的RSD为0.52%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取本品(批号:131109)适量,研细,精密称取6份,每份约1.25 g,分别精密加入质量浓度为0.515 7 mg/ml的金丝桃苷对照品溶液1.0 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取3家不同企业的样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

称样量,g	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
1.253 6	0.535 4	0.515 7	1.044 6	98.74		
1.249 2	0.533 5	0.515 7	1.037 2	97.67		
1.238 5	0.529 0	0.515 7	1.040 7	99.22		
1.250 4	0.534 0	0.515 7	1.042 6	98.62	98.68	0.64
1.241 7	0.530 3	0.515 7	1.043 2	99.46		
1.252 2	0.534 8	0.515 7	1.042 1	98.37		

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

药品来源	批号	含量,mg/g	平均含量,mg/g	RSD,%
企业1	131109	0.425 6	0.426 8	0.40
		0.428 0		
		0.426 6		
企业2	120702	0.321 3	0.322 9	0.51
		0.324 6		
		0.322 8		
企业3	130101	0.103 7	0.103 7	0.72
		0.102 9		
		0.104 4		

3 讨论

3.1 提取条件的选择

笔者曾采用3种提取方法进行提取:第1种参照《中国药典》^[2]及文献[7, 10],精密加入80%甲醇25 ml,称定质量,超声(功率:300 W,频率:45 kHz)处理60 min,放冷,再次精密称定,加80%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过;第2种是精密加入乙醇25 ml,称定质量,超声(功率:300 W,频率:45 kHz)提取60 min,放冷,再次精密称定,加乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过;第3种是先用石油醚脱脂后再按第1种方法进行提取。此外,笔者还比较了超声与回流提取的效果。结果显示,同一种方法超声与回流提取结果没有差别;用第2、第3种提取方法处理的样品,所测结果均低于第1种提取方法;且采用第1种提取方法处理的样品,金丝桃苷峰形好、附近杂质峰少、分离度好。由于超声提取比回流提取操作更简单,本研究最终确定用80%甲醇超声(功率:300 W,频率:45 kHz)提取60 min。

3.2 检测波长的选择

取金丝桃苷对照品的80%甲醇溶液适量,在200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,结果显示金丝桃苷对照品在254 nm及360 nm处有最大吸收。考虑到254 nm处的干扰因素多,并参考2010年版《中国药典》^[2]及文献[4-6],最终将检测波长定为360 nm。

3.3 流动相的选择

参照2010年版《中国药典》^[2]及文献[5, 7],笔者分别考察了乙腈-0.1%磷酸(17:83, V/V)、乙腈-0.2%醋酸(18:82, V/V)及甲醇-0.2%磷酸(36:64, V/V)等3种流动相系统,并根据分离情况,将流动相比例进行调整。结果显示,当流动相为乙腈-0.1%磷酸(16:84, V/V)时,金丝桃苷的分离效果最佳,所以最终选择乙腈-0.1%磷酸(16:84, V/V)为本研究的流动相。

3.4 测定结果分析

菟丝子是补肾强身片中臣药,是补肾固精之根本。据

文献资料报道,黄酮类化合物是菟丝子主要的有效成分,总黄酮含量较高,高达3%,其中又以金丝桃苷含量较高^[8-11]。所以本研究选择金丝桃苷作为补肾强身片中菟丝子的质量控制指标。聂新华^[12]用HPLC法测定了菟丝子中金丝桃苷的含量,结果显示质量分数为0.07%~0.37%;管群等^[13]用HPLC法测定了几种不同产地的菟丝子中总黄酮及金丝桃苷的含量,结果显示质量分数为0.012%~0.276%。上述两项研究均能得出不同产地菟丝子中金丝桃苷含量差别较大的结论。按2010版《中国药典》规定,并结合补肾强身片处方中菟丝子的用量,本研究结果显示,3家企业的3批样品(平均片质量均为0.25 g左右)中有2批达不到要求。因此,有必要完善补肾强身片的质量控制标准,严格控制原料药材的质量及投料量,以保证补肾强身片的质量,确保临床用药疗效。

综上所述,该方法快速、简便,结果准确、可靠,可用于补肾强身片的含量测定。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第十五册[S].1997:99.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010版.北京:中国医药科技出版社,2010:290-291.
- [3] 田春元,刘倩,韦水林,等.HPLC测定参杞强精胶囊中金丝桃苷含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):149.
- [4] 林慧彬,杨金平,林建群,等.不同寄主植物对两种菟丝子中金丝桃苷含量的影响[J].中华中医药杂志,2008,23(1):12.
- [5] 熊爱珍,杨莉,杨雪晶,等.RP-HPLC法测定千里光药材中金丝桃苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(5):936.
- [6] 李卓恒,孟德胜,卢来春,等.RP-HPLC法测定不同产地不同部位贯叶金丝桃中金丝桃苷的含量[J].中国药房,2012,23(43):4 082.
- [7] 周春华,白冰,马莉,等.HPLC法测定脉安颗粒中金丝桃苷的含量[J].中国医药指南,2012,10(36):420.
- [8] 中国医学科学院药物所.中药志:Ⅲ[M].北京:人民卫生出版社,1982:583.
- [9] 吴春,陈林林.菟丝子黄酮体外清除自由基活性的研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(5):553.
- [10] 伍晓春.超声波提取菟丝子总黄酮的工艺研究[J].食品研究与开发,2009,30(3):34.
- [11] 林慧彬,林建群,路宁,等.菟丝子及南方菟丝子的质量控制研究[J].中药材,2007,30(11):1 446.
- [12] 聂新华.高效液相色谱法测定菟丝子中金丝桃苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(9):12.
- [13] 管群,吕圭源,俞静静,等.不同产地菟丝子总黄酮及金丝桃苷的含量测定[J].浙江中医药大学学报,2012,36(2):184.

(收稿日期:2014-07-28 修回日期:2014-11-14)

(编辑:孙冰)