

双波长HPLC法同时测定益肾衍嗣丸中4种成分的含量

肖保国*(驻马店市第二中医院药剂科,河南 驻马店 463000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4735-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.35

摘要 目的:建立同时测定益肾衍嗣丸中阿魏酸、梓醇、大黄素和大黄素甲醚含量的方法。方法:采用双波长高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil-C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(78:22, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为280 nm(阿魏酸、大黄素和大黄素甲醚)、210 nm(梓醇),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:阿魏酸、梓醇、大黄素和大黄素甲醚检测质量浓度线性范围分别为0.090 8~2.270 0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.199 0~4.975 0 μg/mL($r=0.999\ 3$)、0.354 0~8.850 0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.336 0~8.400 0 μg/mL($r=0.999\ 7$);定量限分别为14.66、8.75、10.26、13.68 ng,检测限分别为5.66、2.67、3.78、4.25 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为101.15%~102.73%(RSD=0.58%, $n=6$)、99.20%~101.69%(RSD=1.20%, $n=6$)、100.90%~101.36%(RSD=0.16%, $n=6$)、95.64%~98.96%(RSD=1.49%, $n=6$)。结论:该方法准确可靠,操作简单,适用于益肾衍嗣丸中4种成分含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱法;双波长;益肾衍嗣丸;阿魏酸;梓醇;大黄素;大黄素甲醚;含量

Simultaneous Determination of 4 Kinds of Components in Yishen Yansi Pills by Double Wavelength HPLC

XIAO Baoguo(Dept. of Pharmacy, Zhumadian Second Hospital of TCM, Henan Zhumadian 463000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of ferulic acid, catalpol, emodin and emodin methylether in Yishen yansi pills. METHODS: Double wavelength HPLC method was adopted. The separation was performed on Kromasil-C₁₈ column with mobile phase methanol-0.1% phosphate solution (78:22, V/V) at flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 210 nm for catalpol, 280 nm for ferulic acid, emodin and emodin methylether. The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges were 0.090 8-2.270 0 μg/mL for ferulic acid ($r=0.999\ 9$), 0.199 0-4.975 0 μg/mL for catalpol ($r=0.999\ 3$), 0.354 0-8.850 0 μg/mL for emodin ($r=0.999\ 9$), 0.336 0-8.400 0 μg/mL for emodin methylether ($r=0.999\ 7$), respectively. The limits of quantitation were 14.66, 8.75, 10.26, 13.68 ng, and the limits of detection were 5.66, 2.67, 3.78, 4.25 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%. The recoveries were 101.15% -102.73% (RSD=0.58%, $n=6$), 99.20%-101.69% (RSD=1.20%, $n=6$), 100.90%-101.36% (RSD=0.16%, $n=6$), 95.64%-98.96% (RSD=1.49%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable, simple and suitable for simultaneous determination of 4 kinds of components in Yishen yansi pills.

KEYWORDS HPLC; Double wavelength; Yishen yansi pills; Ferulic acid; Catalpol; Emodin; Emodin methylether; Content

益肾衍嗣丸为河南省驻马店市第二中医院的院内制剂,由当归、熟地黄、制何首乌、黄芪、枸杞子、菟丝子、沙苑子、五味子、女贞子、山茱萸等中药组成,具有补肾、助阳、生精的功效^[1-5]。当归、地黄和何首乌为方中君药,但目前尚未有同时测定该制剂中上述3种药材中相关主要活性成分含量的报道。鉴于此,笔者采用双波长高效液相色谱法(HPLC),建立了同时测定该制剂中当归的主要活性成分阿魏酸^[6-7]、地黄的主要活性成分梓醇^[8-9]、何首乌的主要活性成分大黄素和大黄素甲醚^[10-11]的含量,以期完善该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G1311C四元梯度泵带真空脱气机、G1329B标准自动进样器、G4212B二极管阵列检测器、M8500AA色谱工作站(美国Agilent公司);

* 主管药师。研究方向:药剂学。电话:0523-86201292。
E-mail:403509636@qq.com

AG135型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Synergy 185型超纯水仪(美国Millipore公司);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

益肾衍嗣丸(河南省驻马店市第二中医院自制,批号:20161201、20161202、20161203,规格:1 g/丸);阿魏酸对照品(批号:110773-201611,纯度:>99.0%)、梓醇对照品(批号:110808-201601,纯度:>99.0%)、大黄素对照品(批号:110756-201110,纯度:>98.7%)、大黄素甲醚对照品(批号:110789-201611,纯度:>99.0%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯化水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(78:22, V/V);流速:1.0

mL/min;检测波长:280 nm(阿魏酸、大黄素和大黄素甲醚)、210 nm(梓醇);柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取阿魏酸、梓醇、大黄素、大黄素甲醚对照品分别为 9.08、9.95、8.85、8.40 mg，各置于 10、10、5、5 mL 量瓶中，加甲醇定容，摇匀，即得单一对照品贮备液。取上述阿魏酸、梓醇、大黄素、大黄素甲醚单一对照品贮备液各 0.5、1、1、1 mL，置于同一 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，摇匀，即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末约 1.0 g，精密称定，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加 75% 甲醇溶液 50 mL，于 50 ℃ 温浸 2 h，超声(功率:500 W，频率:40 kHz，下同)处理 30 min，滤过，重复提取 2 次，合并提取液，减压回收溶剂至干，加甲醇溶解并转移至 100 mL 量瓶中，定容，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例，制备不含当归、地黄和何首乌的阴性样品，再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱，详见图 1。由图 1 可知，在该色谱条件下，各成分峰与其他相邻峰均能达到基线分离，分离度>1.5;理论板数以阿魏酸峰计为 10 000，保留时间为 35.1 min。结果表明，其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容，摇匀，作为系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液适量，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性范围见表 1。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

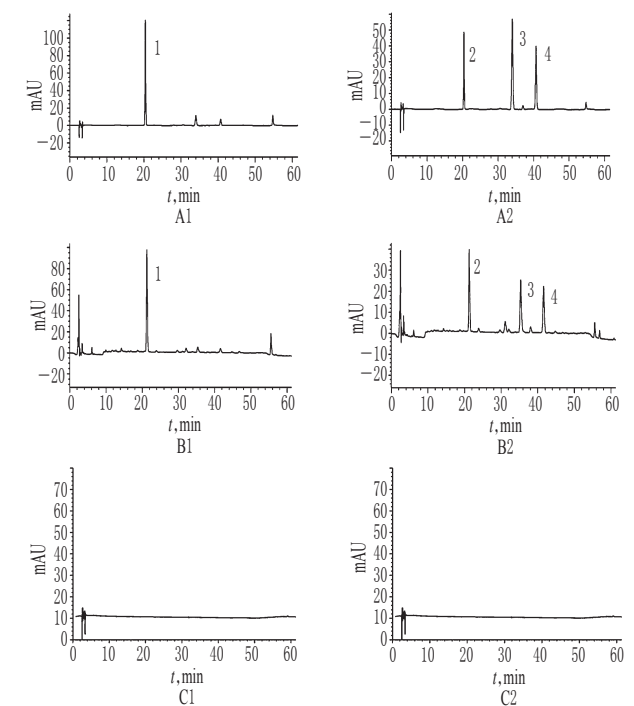
取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，倍比稀释，按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。当信噪比为 10:1 时，得 LOQ;当信噪比为 3:1 时，得 LOD。结果，阿魏酸、梓醇、大黄素和大黄素甲醚的 LOQ 分别为 14.66、8.75、10.26、13.68 ng，LOD 分别为 5.66、2.67、3.78、4.25 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10 μL，按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果，阿魏酸、梓醇、大黄素和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.26%、1.17%、0.36%、1.43%(n=6)，表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20161201)适量，分别于室温下避光放置 0、2、4、6、8、12、24、36、48、72 h



A1.混合对照品(210 nm);A2.混合对照品(280 nm);B1.供试品(210 nm);B2.供试品(280 nm);C1.阴性对照(210 nm);C2.阴性对照(280 nm);1.梓醇;2.大黄素;3.阿魏酸;4.大黄素甲醚

图 1 高效液相色谱图

A1.mixed control (210 nm); A2. mixed control (280 nm); B1. test sample (210 nm); B2. test sample (280 nm); C1. negative control (210 nm); C2. negative control (280 nm); 1. catalpol; 2. emodin; 3. ferulic acid; 4. emodin methylether

Fig 1 HPLC chromatograms

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/mL
阿魏酸	y=1.524 1x-0.243 2	0.999 9	0.090 8~2.270 0
梓醇	y=1.636 0x+0.220 6	0.999 3	0.199 0~4.975 0
大黄素	y=1.433 5x-0.148 1	0.999 9	0.354 0~8.850 0
大黄素甲醚	y=1.813 4x-0.176 7	0.999 7	0.336 0~8.400 0

时按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，阿魏酸、梓醇、大黄素和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.20%、0.39%、1.27%、1.17%(n=10)，表明供试品溶液在室温下放置 72 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品粉末(批号:20161201)6 份，精密称定，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，记录峰面积并计算样品含量。结果，阿魏酸、梓醇、大黄素和大黄素甲醚含量的平均值分别为 0.111 8、0.266 9、0.428 2、0.424 3 mg/g，RSD 分别为 1.89%、0.82%、1.81%、1.53%(n=6)，表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品粉末(批号:20161201)适量，共 6 份，每份约 1.0 g，精密称定，分别置于 100 mL 量瓶中，各加入一定

质量的待测成分对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
阿魏酸	1.099 9	0.108 9	0.113 5	0.224 3	101.67	101.58	0.58
	1.001 8	0.100 6	0.113 5	0.215 4	101.15		
	1.001 7	0.099 9	0.113 5	0.216 5	102.73		
	1.003 4	0.103 8	0.113 5	0.218 9	101.41		
	1.002 6	0.102 6	0.113 5	0.217 6	101.32		
梓醇	1.003 2	0.103 2	0.113 5	0.218 1	101.23	100.50	1.20
	1.099 9	0.253 2	0.248 8	0.500 9	99.56		
	1.001 8	0.245 8	0.248 8	0.492 6	99.20		
	1.001 7	0.245 1	0.248 8	0.492 1	99.28		
	1.003 4	0.241 1	0.248 8	0.494 1	101.69		
大黄素	1.002 6	0.240 3	0.248 8	0.493 1	101.61	101.18	0.16
	1.003 2	0.240 8	0.248 8	0.493 8	101.69		
	1.099 9	0.435 6	0.442 5	0.883 8	101.29		
	1.001 8	0.427 6	0.442 5	0.875 2	101.15		
	1.001 7	0.428 1	0.442 5	0.874 6	100.90		
大黄素甲醚	1.003 4	0.431 1	0.442 5	0.879 6	101.36	97.13	1.49
	1.002 6	0.430 2	0.442 5	0.878 3	101.27		
	1.003 2	0.431 6	0.442 5	0.878 9	101.08		
	1.099 9	0.428 7	0.442 5	0.846 3	98.84		
	1.001 8	0.418 7	0.442 5	0.846 8	96.75		
	1.001 7	0.418 2	0.442 5	0.846 1	96.70		
	1.003 4	0.422 1	0.442 5	0.845 3	95.64		
	1.002 6	0.410 7	0.442 5	0.848 6	98.96		
	1.003 2	0.421 5	0.442 5	0.845 7	95.86		

2.10 样品含量测定

取 3 批样品粉末各适量,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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 3 Results of contents determination of samples (n=3,mg/g)

样品批号	阿魏酸	梓醇	大黄素	大黄素甲醚
20161201	0.111 3	0.267 7	0.428 9	0.424 8
20161202	0.109 6	0.261 8	0.437 8	0.436 7
20161203	0.110 8	0.258 9	0.445 7	0.431 4

3 讨论

3.1 检测波长的选择

笔者采用二极管阵列检测器进行全波长扫描发现,梓醇在 210 nm 波长处有最大吸收,阿魏酸、大黄素和大黄素甲醚在 280 nm 波长处有最大吸收,故本试验采用上述两种波长进行试验。

3.2 流动相的考察

笔者考察了不同比例的甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙

腈-0.4%磷酸、乙腈-0.2%醋酸铵、甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相时的色谱情况。综合考虑保留时间、峰形、分离度等,最终确定本试验的流动相为定甲醇-0.1%磷酸溶液(78:22,V/V)。

3.3 提取溶剂及提取时间的考察

本试验比较了水、50%甲醇溶液、75%甲醇溶液、甲醇为提取溶剂时的提取效果,结果75%甲醇溶液提取效果最佳。因此,选择75%甲醇溶液为提取溶剂。同时,还考察了超声提取时间(15、30、60 min),结果表明,30 min 与 60 min 时样品提取效果基本相似,为节约试验时间,最终选择超声时间为 30 min。

综上所述,本方法准确可靠,操作简单,适用于益肾衍嗣丸中 4 种成分含量的同时测定。

参考文献

[1] 张文,沈创鹏.加味当归补血汤联合左卡尼汀治疗少弱精子症临床观察[J].新中医,2011,43(8):89-90.

[2] 梁培育,李浩勇,肖劲逐,等.添加黄芪注射液对人精子线粒体功能的影响[J].中国男科学杂志,2004,18(3):11-13.

[3] 王战红,谭玉彬,李淑芳,等.高效液相色谱法测定双黄连口服液有效部位中连翘苷含量[J].中国中医药信息杂志,2012,19(3):52-53.

[4] 许国彬,许仙.中草药治疗少弱精子症的研究进展[J].宁夏医学杂志,2011,33(3):276-278.

[5] 赵文静,王历,王芝兰,等.淫羊藿的药理作用及临床应用研究进展[J].中医药信息,2016,33(2):105-108.

[6] 潘莹.HPLC法同时测定通脉颗粒中丹参素、阿魏酸和葛根素的含量[J].中国药房,2011,22(4):376-378.

[7] 申安.高效液相色谱法测定不同产地当归中阿魏酸的含量[J].中医学报,2015,30(3):421-422.

[8] 陈天朝,翟来超.HPLC同时测定地黄中梓醇与毛蕊花糖苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):105-107.

[9] 许继承,高明波,王婷,等.HPLC测定地黄叶与生地、熟地中梓醇含量[J].广州化工,2015,43(12):104-105、155.

[10] 童妍,金钊.大黄素甲醚的药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2015,33(4):938-940.

[11] 颜永刚,尹立敏,王红艳,等.HPLC法同时测定大黄炮制品中 10 种化学成分的含量[J].中国药房,2016,27(27):3839-3842.

(收稿日期:2017-04-26 修回日期:2017-06-23)

(编辑:刘 柳)