

HPLC法测定肾王膏中淫羊藿苷的含量

涂 禾^{1*}, 马家骅^{2,3}, 郭宏彦¹, 冯光富¹ (1.四川省骨科医院, 成都 610041; 2.西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010; 3.成都中医药大学药学院, 成都 610031)

中图分类号 R283.621; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2945-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.24

摘要 目的: 建立测定肾王膏中淫羊藿苷含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Chromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5% 磷酸溶液 (27:73, V/V), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 270 nm。结果: 淫羊藿苷的进样量在 0.090 5~0.362 0 μg 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 8$); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD < 3%; 平均加样回收率为 101.24%, RSD=1.25% ($n=9$)。结论: 该方法简便、快速、重复性好, 可用于肾王膏的质量控制。

关键词 肾王膏; 高效液相色谱法; 淫羊藿苷; 含量测定

Content Determination of Icarin in Shenwang Cream by HPLC

TU He¹, MA Jia-hua^{2,3}, GUO Hong-yan¹, FENG Guang-fu¹ (1.Sichuan Orthopedics Hospital, Chengdu 610041, China; 2.College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Sichuan Mianyang 621010, China; 3.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for content determination of icaritin in Shenwang cream. METHODS: HPLC method was used. The determination was performed on Chromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-5% phosphoric acid (27:73, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was set at 270 nm. RESULTS: The liner range of icaritin was 0.090 5-0.362 0 μg ($r=0.999\ 8$). RSD of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3% with an average recovery of 101.24% (RSD=1.25%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and repeatable. It can be used for quality control of Shenwang cream.

KEYWORDS Shenwang cream; HPLC; Icaritin; Content determination

肾王膏来源于著名中医运动医学专家张世明教授的处方, 由淫羊藿、生晒人参、麦冬、龟板、淮山药、山茱萸、鹿茸等 12 味中药组成, 具有滋阴补肾、益精填髓、培元固本的功效, 用于治疗运动员连续大运动量训练后引起的肾阴不足的运动性疲劳证^[1]。淫羊藿在组方中为君药, 其功效可部分反映整个处方制剂的作用, 且用量较大, 能反映药品的内在质量。因此, 笔者采用高效液相色谱 (HPLC) 法对淫羊藿中指标成分淫羊藿苷进行了含量测定^[2-8]。

1 材料

1.1 仪器

LC-10 A 型 HPLC 仪, 含 SPD-10 Avp UV-VIS 检测器、二元 LC-10 ATvp 液相色谱泵、CTO-10 ASvp 柱温箱 (日本 Shimadzu 公司); N2000 型色谱工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司); FA-1104 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); KQ-400DB 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

肾王膏 (四川省骨科医院制剂室提供, 批号: 110601、110801、110802、110803); 淫羊藿苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 110737-201012); 乙腈、磷酸 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

* 副主任中药师。研究方向: 医院制剂质量管理、临床药学。电话: 028-87050716。E-mail: 297983480@qq.com

2.1 色谱条件

色谱柱: Chromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸溶液 (27:73, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 270 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取本品约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 20 ml, 称定质量, 超声 (频率: 40 kHz, 功率: 400 W) 提取 20 min, 再次称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

2.2.2 阴性对照溶液 按处方工艺制备去除淫羊藿的阴性样品, 再按“2.2.1”项下方法制成阴性对照溶液, 即得。

2.2.3 对照品溶液 取淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 ml 含 10 μg 的溶液, 即得。

2.3 专属性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液适量, 注入 HPLC 仪, 按上述色谱条件测定。结果显示, 阴性对照在淫羊藿苷出峰处未见相应色谱峰, 表明本方法具有较好的专属性, 阴性对照对淫羊藿苷的含量测定无干扰。色谱见图 1。

2.4 线性关系考察

精密称取淫羊藿苷对照品 9.05 mg, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 ml, 分别置 10 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 10 μl 注入 HPLC 仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积

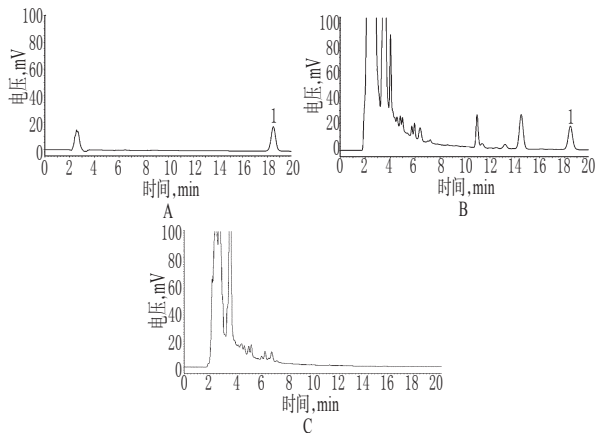


图1 高效液相色谱图

A. 淫羊藿苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

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

积分值(A)为纵坐标, 进样量(c)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $A = 3 \times 10^5 c - 6330.7 (r = 0.9998, n = 5)$ 。结果表明, 淫羊藿苷进样量在 $0.0905 \sim 0.3620 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 (0.176 mg/ml) $10 \mu\text{l}$, 按上述色谱条件连续进样6次, 测定峰面积。结果, $\text{RSD} = 0.72\% (n = 6)$, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号: 110801), 分别于 $0, 2, 4, 6, 8 \text{ h}$ 进样 $10 \mu\text{l}$, 按上述色谱条件测定峰面积。结果, $\text{RSD} = 1.75\% (n = 5)$, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品 (批号: 110801) 适量, 共6份, 分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果, 样品中淫羊藿苷的平均含量为 0.39 mg/g , $\text{RSD} = 2.21\% (n = 6)$, 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的同一批样品 (批号: 110601, 淫羊藿苷含量: 0.631 mg/g) 适量, 共9份, 精密称定, 每3份为一组, 分别精密加入淫羊藿苷对照品溶液 (0.176 mg/ml) $0.7, 0.9, 1.1 \text{ ml}$, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件分别进样测定, 计算加样回收率, 结果见表1。

表1 加样回收率试验结果 ($n = 9$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n = 9$)

编号	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	$\bar{x}, \%$	RSD, %
1	0.2728	0.1721	0.1232	0.2938	98.78		
2	0.2642	0.1667	0.1232	0.2921	101.79		
3	0.2515	0.1587	0.1232	0.2835	101.30		
4	0.2546	0.1606	0.1584	0.3231	102.59		
5	0.2455	0.1549	0.1584	0.3172	102.46	101.24	1.25
6	0.2617	0.1651	0.1584	0.3269	102.15		
7	0.2639	0.1665	0.1936	0.3599	99.90		
8	0.2340	0.1514	0.1936	0.3478	101.45		
9	0.2557	0.1613	0.1936	0.3564	100.77		

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量, 分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶

液。精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 $10 \mu\text{l}$, 按上述色谱条件分别进样测定, 记录峰面积, 以峰面积计算样品含量。结果, 3批样品 (批号: 110801、110802、110803) 中淫羊藿苷的含量分别为 $0.39, 0.41, 0.38 \text{ mg/g}$ 。

3 讨论

笔者曾参照2010年版《中国药典》(一部)淫羊藿项下的含量测定方法, 采用乙腈-水 ($30:70, V/V$) 作为流动相, 结果发现淫羊藿苷色谱峰的峰形不理想, 与其他组分不能达到基线分离^[9]。后经过试验摸索, 将流动相调整为乙腈- 0.5% 磷酸溶液 ($27:73, V/V$), 所得分离度 >1.5 , 以淫羊藿苷色谱峰计算理论板数 >1500 , 且阴性对照在淫羊藿苷色谱峰的位置上无干扰, 故选其作为流动相。

在图1淫羊藿苷对照品的色谱图中, 2.5 min 处的峰为溶剂峰, 因为制备对照品溶液所用溶剂为甲醇, 而流动相为乙腈和磷酸, 所以会出现较大的溶剂峰。

笔者对样品提取条件进行了考察。根据淫羊藿苷的理化性质, 提取溶剂考察了乙醇与稀乙醇, 结果以稀乙醇为好; 提取方法考察了超声与加热回流法, 发现两法所测含量基本一致, 故选择操作更为简单的超声法; 提取时间考察了 $10, 20, 30 \text{ min}$, 发现超声处理 20 min 即可将淫羊藿苷提取完全, 故确定提取时间为 20 min ; 提取溶剂的用量考察了 $15, 20, 25 \text{ ml}$, 发现在超声处理 20 min 的情况下, 采用 $20, 25 \text{ ml}$ 稀乙醇提取的淫羊藿苷含量基本相同, 比 15 ml 稀乙醇提取量更高, 故确定提取溶剂用量为 20 ml 。

在试验过程中发现, 不同批次样品中淫羊藿苷含量差异很大, 这主要是受淫羊藿药材来源、产地、采收季节、采收时间、贮藏和炮制等因素的影响所造成的。提示应加强对肾王膏原料药材的质量控制, 确保制剂质量。

综上所述, 本方法简便、快速、重复性好, 可用于肾王膏的质量控制。

参考文献

- [1] 刘波, 张世明, 马建, 等. 中药消除运动性疲劳临床研究之二: 内服中药“肾王膏”消除男子摔跤运动员运动性肾阴不足临床疗效观察[J]. 中国运动医学杂志, 2010, 29(3): 321.
- [2] 陈毅平, 陈双英, 陈文财, 等. 淫羊藿苷的稳定性及其影响因素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 76.
- [3] 王芳, 石悦, 曹健. 高效液相色谱法测定延背胶囊中淫羊藿苷含量[J]. 中国药业, 2014, 23(4): 37.
- [4] 秦郁文, 唐富丽. HPLC法测定补肾防喘薄膜衣片中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(24): 2290.
- [5] 王安斌, 李群芳, 牟方涛, 等. 淫羊藿苷 CaCO_3 纳米微球在大鼠体内的血药浓度监测[J]. 遵义医学院学报, 2013, 36(6): 525.
- [6] 王蕾, 谈瑄忠, 毛春芹, 等. RP-HPLC法同时测定淫桂通便颗粒中6种成分[J]. 中成药, 2013, 35(2): 459.
- [7] 马纪伟, 闫冬良. RP-HPLC法测定仙灵脾颗粒中淫羊藿苷的含量[J]. 中国医药指南, 2013, 11(21): 544.
- [8] 郭杰, 黄伟. HPLC法测定调经促孕微丸中淫羊藿苷的含量[J]. 光明中医, 2011, 26(9): 1794.
- [9] 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: 306-307.

(收稿日期: 2014-04-21 修回日期: 2014-05-25)