

HPLC 同时测定五子衍宗丸中 5 种活性成分的含量

刘伟¹, 周建良², 陈碧莲², 祝明^{2*}

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

[摘要] **目的:** 建立五子衍宗丸中 5 种成分金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的含量测定方法。**方法:** Angilent Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-甲醇(10:1)和 0.4% 磷酸, 梯度洗脱柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 250 nm(五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素), 360 nm(金丝桃苷、山柰素)。**结果:** 在该色谱条件下, 金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素分离良好, 分别在 4.824 ~ 482.4, 4.358 ~ 87.16, 1.854 ~ 185.4, 5.610 ~ 112.2, 3.850 ~ 77.00 ng 呈良好的线性关系, 加样回收率($n=9$)依次为 101.2%, 98.9%, 101.6%, 101.3%, 97.6%。**结论:** 所建立的方法简便、准确、重复性好, 可用于五子衍宗丸的质量控制。

[关键词] 金丝桃苷; 山柰素; 五味子醇甲; 五味子甲素; 五味子乙素; 高效液相色谱法; 五子衍宗丸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0074-05

[doi] 10.11653/syjf2014030074

Simultaneous Determination of Five Ingredients in Wuzi Yanzong Pill by HPLC

LIU Wei¹, ZHOU Jian-liang², CHEN Bi-lian², ZHU Ming^{2*}

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

[Abstract] **Objective:** A method for simultaneous determination of five ingredients in Wuzi Yanzong pill was developed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). **Method:** HPLC was performed on Angilent Extend C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient elution system using methanol: ethylactate (10:1) -0.4% phosphoric acid at 30 °C and at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The eluate was detected by wavelength of 250 nm for schisandrin, deoxyschizandrin, γ-schizandrin and 360 nm for hyperoside and kaempferide. **Result:** Hyperoside, kaempferide, schisandrin, deoxyschizandrin and γ-schizandrin were baseline separated and their linear ranges were 4.824-482.4, 4.358-87.16, 1.854-185.4, 5.610-112.2, 3.850-77.00 ng, respectively. The recovery of the five compounds ($n=9$) were 101.2%, 98.9%, 101.6%, 101.3%, 97.6%, respectively. **Conclusion:** The developed method is simple, accurate, and shows good precision and reproducibility. It is could be used for the quality control of Wuzi Yanzong pill.

[Key words] hyperoside; kaempferide; schisandrin; deoxyschizandrin; γ-schizandrin; HPLC; Wuzi Yanzong pill

[收稿日期] 20130726(009)

[基金项目] 国家科技部“十二五”资助项目(2012ZX09304-005)

[第一作者] 刘伟, 硕士研究生, 从事中药质量评价及新药开发研究, E-mail: liuw1989@yeah.net

[通讯作者] * 祝明, 主任中药师、硕士生导师, 从事中药有效成分及质量控制研究, Tel: 0571-86734991, E-mail: zhumingd@hotmail.com

五子衍宗丸是由枸杞子、菟丝子(炒)、覆盆子、五味子(蒸)和车前子(盐炒)加工制成的丸剂, 具有补肾益精的功效^[1]。另有文献报道^[2-8], 五子衍宗丸还具有抗阿尔茨海默病、抗衰老、抗 Leber 遗传性视神经病变、增强免疫力、降血糖血脂等作用。2010 年版《中国药典》一部收录的五子衍宗丸的质量标准中只规定了枸杞子、五味子甲素的 TLC 化学鉴别

方法,无含量测定。目前文献报道的五子衍宗丸含量测定主要是针对五味子甲素、五味子乙素^[9-10]及金丝桃苷^[11]等单一成分的HPLC测定方法。由于五子衍宗丸由5味药组成,化学成分复杂,单一成分的定量测定无法完整地反映该制剂的化学组分特征和控制其质量,因此本文建立了五子衍宗丸中金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素5种成分的HPLC含量测定方法,为该中成药有效成分的测定以及质量控制提供了评价方法。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-20AD_{XR}型高效液相色谱仪(配备在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱和PDA检测器),KODO JAC 4020P型超声波清洗器,METTLER TOLEDO AG285型1/10万电子天平。

金丝桃苷(批号1521-200202)、山柰素(批号110861-200405)、五味子醇甲(批号110857-200406)、五味子甲素(批号0764-200107)和五味子乙素(批号110765-200407)对照品均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇均为色谱纯(Merck),水为重蒸水,磷酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。19批五子衍宗丸样品为市场抽样,收集于不同的生产厂家。

2 方法与结果

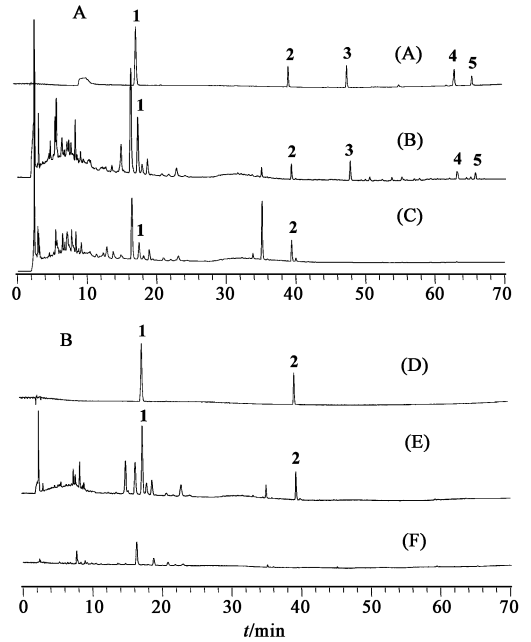
2.1 色谱条件 Angilent Extend C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温30℃,流动相A乙腈-甲醇(10:1),B 0.4%磷酸,梯度洗脱(0~5 min,5%~15% A;5~15 min,15%~19% A;15~25 min,19%~21% A;25~70 min,21%~90% A),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长250 nm(五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素),360 nm(金丝桃苷、山柰素),进样量5 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取金丝桃苷18.09 mg,山柰素16.34 mg,五味子醇甲17.38 mg,五味子甲素16.83 mg,五味子乙素7.22 mg,用70%甲醇配成分别为361.8,326.8,695.2,841.5,288.8 mg·L⁻¹的对照品储备液,并于4℃保存。分别吸取上述对照品储备液适量,用70%甲醇配成24.12,4.357,9.269,5.610,3.851 μg·L⁻¹的混合对照品工作液,供含量测定用。

2.3 供试品溶液的制备 取本品2 g,研细,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,称定质量,超声处理60 min,取出,放冷,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按本品的处方、制法制备缺少菟丝子及五味子的模拟样品,按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.5 专属性实验 将金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液分别注入液相色谱仪,进行测定。结果供试品溶液中均检出5个待测成分,而阴性对照液在金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素出峰处不干扰,见图1。



1. 金丝桃苷;2. 山柰素;3. 五味子醇甲;4. 五味子甲素;
5. 五味子乙素;A, D. 混合对照品;B, E. 供试品;
C. 缺五味子阴性;F. 缺菟丝子阴性

图1 250 nm(A~C),360 nm(D~F)下五子衍宗丸HPLC

2.6 线性关系考察 取2.2项下制备的对照品溶液,用70%的甲醇配制成系列质量浓度,按上述色谱条件进行测定,记录色谱图。以进样量(ng)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),制备标准曲线。计算金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的回归方程分别为 $Y_{\text{金丝桃苷}} = 1\ 271.6X - 5\ 154$ ($R^2 = 1$),线性范围4.824~482.4 ng, $Y_{\text{山柰素}} = 2\ 133.5X - 1\ 685.9$ ($R^2 = 1$),线性范围4.358~87.16 ng, $Y_{\text{五味子醇甲}} = 1\ 067.1X - 2\ 177.9$ ($R^2 = 0.999\ 9$),线性范围1.854~185.4 ng, $Y_{\text{五味子甲素}} = 1\ 167.4X + 16\ 216$ ($R^2 = 0.998\ 8$),线性范围5.610~112.2 ng, $Y_{\text{五味子乙素}} = 988.84X - 633.09$ ($R^2 = 0.999\ 8$),线性范围3.850~77.00 ng。

2.7 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液(批号2035337),在上述色谱条件下连续进样测定6

次,以各色谱峰的峰面积计算得金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的 RSD 依次为 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.9%, 2.9%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液(批号 2035337),分别在制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h 按上述色谱条件进样测定,各色谱峰的峰面积 RSD 依次为 0.6%, 0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.2%, 表明供试品在 36 h 内稳定。

2.9 重复性试验 精密称取同一批次的五子衍宗丸样品(批号 2035337)6 份,按 2.3 项下方法制备供

试品溶液,按上述色谱条件测定,金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素含量的 RSD 依次为 1.4%, 0.7%, 1.2%, 2.7%, 2.6%, 表明方法重复性良好。

2.10 回收率试验 取同批次的五子衍宗丸样品(批号 2035337)粉末 9 份,每份约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素对照品溶液适量(3 种水平,各 3 份),按 2.3 项方法操作、测定,计算得金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的平均回收率,结果见表 1。

表 1 五子衍宗丸中 5 种成分的加样回收率试验(n=9)

成分	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
金丝桃苷	1.026 3	0.642 2	0.336 5	0.985 7	102.1	101.2	1.0
	1.009 1	0.631 4	0.336 5	0.997 6	102.4		
	1.015 0	0.635 1	0.336 5	0.974 3	100.8		
	1.011 5	0.632 9	0.673 0	1.309 4	100.5		
	1.003 9	0.628 2	0.673 0	1.298 8	99.64		
	1.013 3	0.634 1	0.673 0	1.305 7	99.79		
	1.015 8	0.635 6	1.009 5	1.661 3	101.6		
	1.011 7	0.633 1	1.009 5	1.659 3	101.7		
	1.022 8	0.640 0	1.009 5	1.673 4	102.4		
山柰素	1.026 3	0.168 0	0.081 7	0.251 5	102.3	98.9	1.8
	1.009 1	0.165 2	0.081 7	0.247 7	101.1		
	1.015 0	0.166 1	0.081 7	0.245 7	97.43		
	1.011 5	0.165 6	0.163 4	0.324 3	97.12		
	1.003 9	0.164 3	0.163 4	0.323 2	97.25		
	1.013 3	0.165 9	0.163 4	0.326 7	98.41		
	1.015 8	0.166 3	0.245 1	0.409 2	99.10		
	1.011 7	0.165 6	0.245 1	0.406 1	98.12		
	1.022 8	0.167 4	0.245 1	0.410 7	99.27		
五味子醇甲	1.026 3	0.225 8	0.115 9	0.347 5	105.0	101.6	2.1
	1.009 1	0.222 0	0.115 9	0.344 1	97.82		
	1.015 0	0.223 3	0.115 9	0.340 1	100.8		
	1.011 5	0.222 5	0.231 7	0.458 4	101.8		
	1.003 9	0.220 8	0.231 7	0.452 5	100.0		
	1.013 3	0.222 9	0.231 7	0.455 8	100.5		
	1.015 8	0.223 5	0.347 6	0.579 7	102.5		
	1.011 7	0.222 6	0.347 6	0.579 0	102.5		
	1.022 8	0.225 0	0.347 6	0.583 9	103.2		
五味子甲素	1.026 3	0.088 0	0.052 6	0.142 6	103.8	101.3	2.5
	1.009 1	0.086 6	0.052 6	0.140 8	103.1		
	1.015 0	0.087 1	0.052 6	0.141 1	102.6		

续表 1

成分	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
五味子乙素	1.011 5	0.086 8	0.105 2	0.195 5	103.3	97.6	2.2
	1.003 9	0.086 1	0.105 2	0.194 1	102.7		
	1.013 3	0.086 9	0.105 2	0.193 8	101.6		
	1.015 8	0.087 1	0.157 8	0.241 4	97.78		
	1.011 7	0.086 8	0.157 8	0.239 9	97.02		
	1.022 8	0.087 7	0.157 8	0.244 7	99.49		
	1.026 3	0.088 0	0.052 6	0.142 6	103.8		
	1.026 3	0.090 2	0.042 2	0.130 9	96.49		
	1.009 1	0.088 7	0.042 2	0.129 2	95.98		
	1.015 0	0.089 2	0.042 2	0.131 7	100.7		
	1.011 5	0.088 9	0.084 4	0.170 2	96.30		
	1.003 9	0.088 2	0.084 4	0.168 8	95.44		
	1.013 3	0.089 1	0.084 4	0.170 1	96.00		
	1.015 8	0.089 3	0.126 6	0.212 4	97.27		
	1.011 7	0.088 9	0.126 6	0.215 0	99.62		
	1.022 8	0.089 9	0.126 6	0.217 6	100.9		

2.11 样品测定 取五子衍宗丸样品 19 批,一式两份,按 2.3 项方法制备样品溶液,分别进样 5 μL ,注入液相色谱仪,计算含量,结果见表 2。

表 2 19 批五子衍宗丸含量测定

 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品批号	剂型	生产厂家	金丝桃苷	山柰素	五味子醇甲	五味子甲素	五味子乙素
121207	水蜜丸	杭州胡庆余堂	0.51	0.12	0.23	0.08	0.09
1300502	水蜜丸		0.23	0.10	0.29	0.09	0.10
1200505	水蜜丸		0.46	0.11	0.30	0.10	0.10
111101	水蜜丸	药都制药	0.59	0.08	0.22	0.07	0.07
13010001	水蜜丸	太极集团	0.18	0.03	0.30	0.09	0.11
110901	小蜜丸	江苏七 0 七	0.43	0.14	0.17	0.09	0.06
120501	小蜜丸	江苏七 0 七	0.38	0.09	0.21	0.08	0.08
120502	小蜜丸	江苏七 0 七	0.48	0.13	0.18	0.07	0.06
20101101	水蜜丸	洛阳顺势药业	0.02	0.04	0.01	0.15	0.27
20110501	水蜜丸	洛阳顺势药业	0.11	0.05	0.01	0.14	0.25
1035286	水蜜丸	北京同仁堂	0.61	0.18	0.20	0.07	0.08
2035079	水蜜丸	北京同仁堂	0.77	0.12	0.24	0.08	0.09
2035337	水蜜丸	北京同仁堂	0.63	0.16	0.22	0.09	0.09
120705	水蜜丸	福州海王金象	0.09	0.04	0.01	0.11	0.19
120827	水蜜丸	福州海王金象	0.07	0.11	0.04	0.10	0.02
120828	水蜜丸	福州海王金象	0.06	0.15	0.04	0.10	0.02
121102	水蜜丸	通化制药集团	0.37	0.07	0.24	0.08	0.10
121103	水蜜丸	通化制药集团	0.51	0.16	0.23	0.08	0.09
121104	水蜜丸	通化制药集团	0.57	0.14	0.25	0.08	0.10

3 讨论

3.1 检测波长的确定 采用 PDA 检测器检测对照品和供试品,发现五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素在 250 nm 处均有最大吸收且干扰峰均较少;金丝桃苷在 255,360 nm 均有最大吸收,山柰素在 360 nm 处有最大吸收,因此,采用双波长测定,在 250 nm 处检测五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素,在 360 nm 处检测金丝桃苷和山柰素。

3.2 提取溶剂的选择 考察了乙醇、甲醇、70% 甲醇 3 种提取溶剂,经 HPLC 含量测定验证,70% 的甲醇提取效率最高。

3.3 流动相的选择 曾选用甲醇-0.4% 磷酸水溶液、乙腈-0.4% 水溶液进行梯度洗脱,结果色谱峰达不到分离要求,选择乙腈-甲醇(10:1)-0.4% 磷酸水溶液进行梯度洗脱,未见其他成分的干扰,且金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素分离度良好。

3.4 耐用性考察 选取 3 种不同品牌的色谱柱 Angilent Extend C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Kromasil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Ecosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 对样品进行测定,结果均得到满意的分离度,表明本法对 C₁₈ 柱品牌无特殊要求。

比较了 0.3% ,0.4% ,0.5% 磷酸溶液(水相)对样品测定的影响,结果在各条件下待测成分均能基线分离,表明不同浓度的磷酸溶液(水相)对本方法几乎不影响。

3.5 含量测定结果分析 金丝桃苷、山柰素、五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素在 19 批样品中的含量差异较大,如金丝桃苷的含量为 0.02 ~ 0.77 mg·g⁻¹,五味子醇甲的含量为 0.01 ~ 0.30 mg·g⁻¹,这说明了该制剂、原药材及工艺参数进行质量控制的必要性。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:532.
- [2] 王斌,王学美. 加味五子衍宗方及其有效部位对 H₂O₂ 损伤 PC₁₂ 细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 18(8):57.
- [3] 李婵,蔡浩然,李琳,等. 加味五子衍宗方总黄酮对大鼠海马锥体细胞 VGCC 通道的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15):1975.
- [4] 王学美,富宏,刘庚信. 五子衍宗丸及其拆方对老年大鼠线粒体 DNA 缺失、线粒体呼吸链酶复合体及 ATP 合成的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(6):437.
- [5] 李成武,庄曾渊,张守康,等. 五子衍宗汤治疗 Leber 遗传性视神经病变的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(12):1078.
- [6] 李育浩,吴清和,韩坚,等. 五子衍宗丸对小鼠免疫功能的影响[J]. 广州中医学院学报, 1993, 10(4):220.
- [7] 李育浩,吴清和,赵文昌,等. 五子衍宗丸药理研究对正常小鼠血糖和四氧嘧啶糖尿病小鼠的影响[J]. 中药药理与临床, 1994, 8(5):52.
- [8] 陈淑英,李育浩,吴清和,等. 五子衍宗丸对链脉佐菌素所致糖尿病大鼠的影响[J]. 新中医, 1992(11):10.
- [9] 郭怡飏,胡晓炜,倪美文. RP-HPLC 法测定五子衍宗丸中五味子甲素、五味子乙素含量[J]. 中草药, 2002, 33(4):317.
- [10] 蒋平,文永盛,吴艳辉. 五子衍宗丸中五味子乙素的含量测定[J]. 中国药师, 2006, 9(1):9.
- [11] 李敏芳,李慧,王学美,等. 高效液相色谱法测定五子衍宗丸中金丝桃苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2):1.

[责任编辑 顾雪竹]