

# HPLC 梯度洗脱法测定回春酒中淫羊藿苷、宝藿苷 I、 西红花苷-I 和西红花苷-II 的含量

冯晓川, 张蕊\*, 李红燕  
(北京积水潭医院, 北京 100035)

**[摘要]** 目的: 采用高效液相色谱法测定回春酒(HCJ)中淫羊藿苷、宝藿苷 I、西红花苷-I 和西红花苷-II 的含量。方法: Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 流动相 A 为乙腈, B 为 1% 冰醋酸溶液, 检测波长 270 nm (淫羊藿苷和宝藿苷 I); 流动相 A 为乙腈-甲醇(2:3), 流动相 B 为 0.5% 磷酸溶液, 检测波长 440 nm (西红花苷-I 和西红花苷-II)。结果: 淫羊藿苷和宝藿苷 I 分别在 0.054 6 ~ 1.092 μg ( $r=0.9997$ ), 0.076 2 ~ 1.524 μg ( $r=0.9991$ ) 进样量与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 97.56%, 99.17%, RSD 分别为 0.94%, 0.77%, 西红花苷-I 和西红花苷-II 分别在 0.102 8 ~ 2.056 μg ( $r=0.9994$ ), 0.060 4 ~ 1.208 μg ( $r=0.9998$ ) 进样量与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 97.54%, 96.91%, RSD 分别为 0.90%, 1.27%。结论: 该方法测定结果准确、灵敏、重复性好。

**[关键词]** 回春酒; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 西红花苷-I; 西红花苷-II; 高效液相色谱; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0085-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013240085

## Determination of Icariin, Baohuoside I, Crocin-I and Crocin-II in Huichunjiu by HPLC

FENG Xiao-chuan, ZHANG Rui\*, LI Hong-yan  
(Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for determination of the content of icariin, baohuoside I, crocin-I and crocin-II in Huichunjiu (HCJ). **Method:** An Hypersil C<sub>18</sub> column was used as the chromatographic column, the flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The mobile phase A consisted of acetonitrile, the mobile phase B consisted of 1% acetic acid solution, the UV detection wavelength was at 270 nm (for icariin and baohuoside I). The mobile phase A consisted of acetonitrile-methanol (2:3), the mobile phase B consisted of 0.5% phosphoric acid solution, the UV detection wavelength was at 440 nm (for crocin-I and crocin-II). **Result:** There were a good linear relationship between the concentration of icariin, baohuoside I and peak area value when the concentrations of icariin and baohuoside I were within the range of 0.054 6-1.092 μg ( $r=0.9997$ ), 0.076 2-1.524 μg ( $r=0.9991$ ). The average recovery were 97.56% (RSD 0.94%) and 99.17% (RSD 0.77%). There were a good linear relationship between the concentration of crocin-I, crocin-II and peak area value when the concentrations of crocin-I and crocin-II were within the range of 0.102 8-2.056 μg ( $r=0.9994$ ), 0.060 4-1.208 μg ( $r=0.9998$ ). The average recovery were 97.54% (RSD 0.90%) and 96.91% (RSD 1.27%). **Conclusion:** The method is accurate, sensitive and reproducible, it may be used in the determination of icariin, baohuoside I, crocin-I and crocin-II in HCJ.

**[Key words]** Huichunjiu (HCJ); icariin; baohuoside I; crocin-I; crocin-II; HPLC; determination

**[收稿日期]** 20130507(010)

**[第一作者]** 冯晓川, 中药师, 从事中药制剂和药物分析研究, Tel: 010-63728848, E-mail: fengxiaochuan2013@163.com

**[通讯作者]** \* 张蕊, 中药师, 从事中药制剂与医院药学研究, Tel: 010-63728848, E-mail: zhangrui1unwen@163.com

回春酒为中药复方制剂,源于《卫生部药品标准中药成方制剂》第 2 册,由淫羊藿、西红花、当归、五加皮、茯苓、地骨皮、苍术、熟地黄、杜仲、生地黄、天冬、牛膝、西红花、附片、甘草、花椒、丁香、木香等 18 味药物组成,具有滋阴补阳、培元固本、调养气血之功效,可用于肾阳不足,气血虚损引起的精神倦怠、阳痿精冷、腰膝酸软、食欲不振及病后体弱等症的治疗<sup>[1-2]</sup>。原质量标准仅对该品种性状及乙醇量进行了控制,未对方中的任何药味进行定性鉴别或定量的测定。为保证产品质量,确保临床疗效,本文采用高效液相色谱法对淫羊藿中淫羊藿苷、宝藿苷 I 和西红花中西红花苷-I、西红花苷-II 进行含量测定方法研究,为完善该制剂质量标准提供依据,能有效控制产品的内在质量,确保用药安全有效。

## 1 材料

LC-10ATVP 型高效液相色谱仪(包括 SIL-10ADVP 型自动进样器,ANASTAR 型色谱数据工作站,SPD-10AVP 型紫外-可见检测器,日本岛津);淫羊藿苷对照品(批号 110737-200415)、宝藿苷 I 对照品(批号 111852-201102)、西红花苷-I 对照品(批号 111588-200501)和西红花苷-II 对照品(批号 111589-201103)均购于中国食品药品检定研究院,回春酒(每瓶装 250 mL,批号 130312,130318,130325)购于广东一禾药业有限公司,冰醋酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),甲醇、乙腈(色谱纯,安徽时联特种溶剂股份有限公司),磷酸(分析纯,广州化学试剂二厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 淫羊藿苷和宝藿苷 I 的含量测定<sup>[3-7]</sup>

**2.1.1 色谱条件及系统适应性** Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 1% 冰醋酸溶液,梯度洗脱(0 ~ 25 min, 21.5% A; 25 ~ 46 min, 21.5% ~ 38.5% A; 46 ~ 65 min, 38.5% A),检测波长 270 nm,流速 0.8 mL · min<sup>-1</sup>。在此条件下淫羊藿苷和宝藿苷 I 与其他组分分离效果良好,以淫羊藿苷计理论塔板数不低于 2 000。

**2.1.2 检测波长的选择** 分别取淫羊藿苷对照品和宝藿苷 I 对照品适量,加 50% 甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.05 mg 的溶液,在 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描,结果淫羊藿苷对照品和宝藿苷 I 对照品均在 270 nm 处有最大吸收,同时参考 2010 年版《中国药典》淫羊藿药材含量测定项下检测波长 270 nm,故将检测波长定用 270 nm。

**2.1.3 对照品混合溶液的制备** 精密称取淫羊藿苷对照品和宝藿苷 I 对照品各适量,加 50% 甲醇制成对照品混合溶液(淫羊藿苷为 0.054 6 g · L<sup>-1</sup>,宝藿苷 I 为 0.076 2 g · L<sup>-1</sup>)。

**2.1.4 供试品溶液的配制** 取本品适量,精密量取 2 mL,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

**2.1.5 阴性对照溶液的配制** 按回春酒处方比例称取适量除淫羊藿的其余药味,按回春酒的前处理和制剂生产工艺制成缺淫羊藿的阴性样品,按照上述供试品溶液的配制方法制成缺淫羊藿的阴性对照溶液。

**2.1.6 线性关系考察** 精密吸取对照品混合溶液 1, 5, 10, 15, 20 μL,按上述色谱条件进行测定,以峰面积分值为纵坐标,淫羊藿苷、宝藿苷 I 量为横坐标分别绘制标准曲线,得回归方程,  $Y_{\text{淫羊藿苷}} = 5.3559 \times 10^6 X + 130.3 (r = 0.9997)$ ,  $Y_{\text{宝藿苷 I}} = 6.0291 \times 10^6 X + 1050.4 (r = 0.9991)$ 。结果表明淫羊藿苷在 0.054 6 ~ 1.092 μg 进样量与峰面积线性关系良好,宝藿苷 I 在 0.076 2 ~ 1.524 μg 进样量与峰面积线性关系良好。

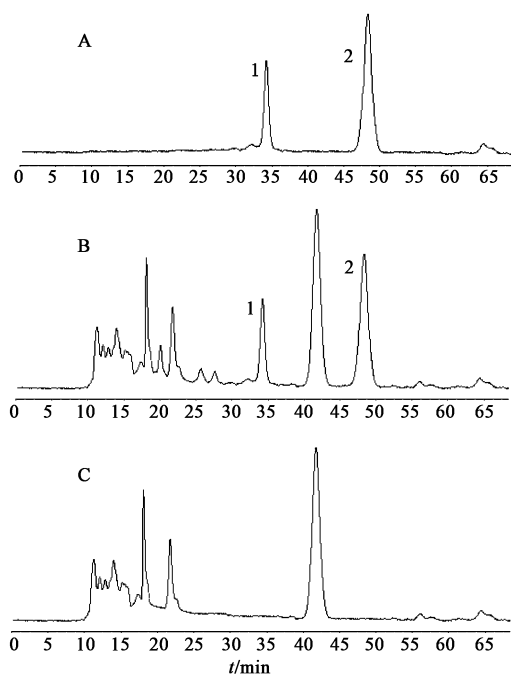
**2.1.7 阴性对照试验** 分别精密吸取 10 μL 的供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液,按 2.1.1 项的色谱条件进行色谱分析,结果供试品溶液色谱中,在与淫羊藿苷对照品和宝藿苷 I 对照品相同保留时间处有吸收峰,而阴性对照溶液在相同保留时间处未显吸收峰,见图 1。

**2.1.8 精密度试验** 取对照品混合溶液重复进样 6 次,按 2.1.1 项的色谱条件测定淫羊藿苷和宝藿苷 I 的峰面积,表明仪器具有良好的精密度,淫羊藿苷和宝藿苷 I 的 RSD 分别为 0.91%, 0.73%。

**2.1.9 重复性试验** 取同一批样品,按上述方法制备 6 份供试品溶液,分别测定其含量,淫羊藿苷和宝藿苷 I 的 RSD 分别为 0.66%, 0.57%,表明本方法具有良好的重复性。

**2.1.10 稳定性试验** 取同一供试品溶液,在放置 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 后精密吸取 10 μL 进样,测定其峰面积值,淫羊藿苷和宝藿苷 I 的 RSD 分别为 0.46%, 0.73%,供试品溶液 8 h 内基本稳定。

**2.1.11 加样回收率试验** 取已知含量(淫羊藿苷含量 2.65 g · L<sup>-1</sup>、宝藿苷 I 含量 3.86 g · L<sup>-1</sup>)的同一批样品适量,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,分别精密加入对照品混合溶液 50 mL,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为加样供试液。精密吸取加样供试液 10 μL,按上述含量测定方法



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性对照品;1. 淫羊藿苷;2. 宝藿苷 I

图1 淫羊藿苷和宝藿苷 I 的 HPLC

测定其峰面积,计算回收率,表明本方法回收率良好,见表1。

## 2.2 西红花苷-I 和西红花苷-II 的含量测定<sup>[8-13]</sup>

### 2.2.1 色谱条件及系统适应性

Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈-甲醇(体积分数 2:3),流动相 B 为 0.5% 磷酸溶液,梯度洗脱(0 ~ 20 min, 45.0% A; 20 ~ 35 min, 45.0% ~ 56.5% A; 35 ~ 50 min, 56.5% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 440 nm。在此条件下西红花

苷-I 和西红花苷-II 与其他组分基线分离良好,以西红花苷-I 计理论塔板数不低于 3 000。

### 2.2.2 检测波长的选择

分别取西红花苷-I 和西红花苷-II 对照品适量,加流动相溶解制成每 1 mL 含 0.10 mg 的溶液,按紫外-可见分光光度法在 300 ~ 500 nm 进行紫外扫描,结果西红花苷-I 和西红花苷-II 对照品均在 440 nm 处有最大吸收,故检测波长定为 440 nm。

### 2.2.3 对照品混合溶液的制备

精密称取西红花苷-I 和西红花苷-II 对照品适量,置 100 mL 量瓶中,加 70% 甲醇溶解后稀释至刻度,摇匀,即得对照品混合溶液(西红花苷-I 为 0.102 8 g·L<sup>-1</sup> 和西红花苷-II 0.060 4 g·L<sup>-1</sup>)。

### 2.2.4 供试品溶液的制备

取本品适量,精密量取 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加 70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

### 2.2.5 阴性对照溶液的制备

按回春酒处方比例称取适量除西红花的其余药味,按回春酒的前处理和制剂生产工艺制成缺西红花的阴性样品,按照上述供试品溶液的配制方法制成缺西红花的阴性对照溶液。

### 2.2.6 线性关系考察

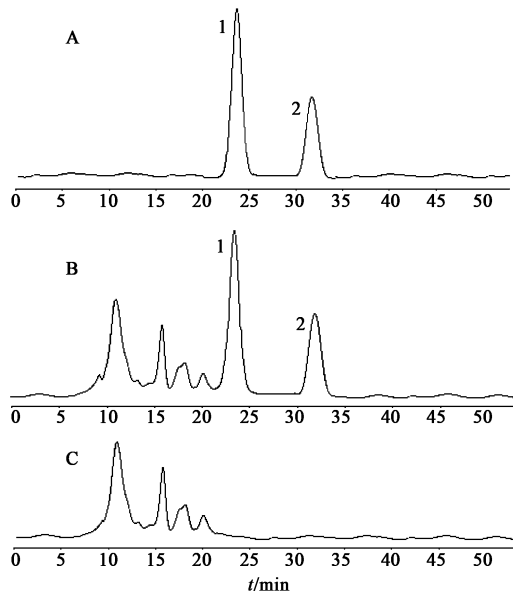
分别精密吸取对照品混合溶液 1, 5, 10, 15, 20 μL,按 2.2.1 项下的色谱条件进行梯度洗脱,以峰面积积分为纵坐标,西红花苷-I、西红花苷-II 量为横坐标分别绘制标准曲线,回归方程为, $Y_{\text{西红花苷-I}} = 1.639 9 \times 10^6 X + 814.1 (r = 0.999 4)$ , $Y_{\text{西红花苷-II}} = 1.797 8 \times 10^6 X - 662.6 (r = 0.999 8)$ ,表明西红花苷-I 在 0.102 8 ~ 2.056 μg 进样量与峰面积线性关系良好,西红花苷-II 在

表1 淫羊藿苷和宝藿苷 I 回收率试验

成分	量取量 /mL	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
淫羊藿苷	1	2.65	2.73	5.34	98.53	97.56	0.94
	1	2.65	2.73	5.29	96.70		
	1	2.65	2.73	5.34	98.53		
	1	2.65	2.73	5.32	97.80		
	1	2.65	2.73	5.31	97.44		
	1	2.65	2.73	5.28	96.34		
宝藿苷 I	1	3.86	3.81	7.63	98.95	99.17	0.77
	1	3.86	3.81	7.61	98.43		
	1	3.86	3.81	7.60	98.16		
	1	3.86	3.81	7.66	99.74		
	1	3.86	3.81	7.66	99.74		
	1	3.86	3.81	7.67	100.00		

0.060 4 ~ 1.208  $\mu\text{g}$  进样量与峰面积线性关系良好。

**2.2.7 阴性对照试验** 分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$  的供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液,按 2.2.1 项的色谱条件进行色谱分析,结果供试品溶液色谱中,在与西红花苷-I 和西红花苷-II 对照品相同保留时间处有吸收峰,而阴性对照溶液在相同保留时间处未显吸收峰,见图 2。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照品;  
1. 西红花苷-I; 2. 西红花苷-II

图 2 西红花苷-I 和西红花苷-II 的 HPLC

**2.2.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液,在放置 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 后精密吸取 10  $\mu\text{L}$  进样,测定其峰面积值,西红花苷-I 和西红花苷-II RSD 分别为 0.91%, 0.85%, 表明供试品溶液 8 h 内基本稳定。

**2.2.9 精密度试验** 取对照品混合溶液重复进样 6 次,按 2.2.1 项的色谱条件测定西红花苷-I 和西红花苷-II 的峰面积,结果西红花苷-I 和西红花苷-II 的 RSD 分别为 0.79%, 0.55%, 表明仪器具有良好的精密度。

**2.2.10 重复性试验** 取同一批样品,按上述方法制备 6 份供试品溶液,分别测定其含量,西红花苷-I 和西红花苷-II 的 RSD 分别为 0.89%, 0.46%, 表明本方法具有良好的重复性。

**2.2.11 加样回收率试验** 取已知含量(西红花苷-I 为 5.36  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、西红花苷-II 为 3.14  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 的同一批样品适量,精密量取 0.5 mL,置 50 mL 量瓶中,分别精密加入对照品混合溶液 25 mL,加 70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为加样供试液。精密吸取加样供试液 10  $\mu\text{L}$ ,按上述含量测定方法测定其峰面积,计算回收率,表明本方法回收率良好,见表 2。

**2.3 样品测定** 取 3 批样品按 2.1 项下淫羊藿苷和宝藿苷 I 测定方法和 2.2 项下西红花苷-I 和西红花苷-II 测定方法测定本品含量,结果见表 3。

表 2 西红花苷-I 和西红花苷-II 回收率试验

成分	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
西红花苷 I	2.68	2.57	5.20	98.05	97.54	0.90
	2.68	2.57	5.17	96.89		
	2.68	2.57	5.21	98.44		
	2.68	2.57	5.19	97.67		
	2.68	2.57	5.15	96.11		
	2.68	2.57	5.20	98.05		
西红花苷 II	1.57	1.51	2.97	95.36	96.91	1.27
	1.57	1.51	2.99	98.01		
	1.57	1.51	3.02	96.03		
	1.57	1.51	2.99	96.69		
	1.57	1.51	3.03	96.69		
	1.57	1.51	2.96	98.68		

### 3 讨论

西红花苷-I 和西红花苷-II 测定时分别以乙腈-水(梯度洗脱)、甲醇-水(梯度洗脱)和乙腈-甲醇(体积分数 2:3)与 0.5% 磷酸溶液(梯度洗脱)为流动相,结果乙腈-水(梯度洗脱)分离效果不好,未达到基线分离,甲醇-水(梯度洗脱)西红花苷-I 峰形

良好,但西红花苷-II 达不到基线分离;乙腈-甲醇(体积分数 2:3)与 0.5% 磷酸溶液(梯度洗脱)均能达到基线分离,峰形较好。故选用乙腈-甲醇(体积分数 2:3)与 0.5% 磷酸溶液(梯度洗脱)为流动相。

淫羊藿和西红花为方中主要药物,淫羊藿具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效,可用于肾阳虚衰、阳

表3 回春酒中4种成分含量测定

批号	淫羊藿苷			宝藿苷 I			西红花苷-I			西红花苷-II		
	含量 /g·L <sup>-1</sup>	平均含量 /g·L <sup>-1</sup>	RSD /%	含量 /g·L <sup>-1</sup>	平均含量 /g·L <sup>-1</sup>	RSD /%	含量 /g·L <sup>-1</sup>	平均含量 /g·L <sup>-1</sup>	RSD /%	含量 /g·L <sup>-1</sup>	平均含量 /g·L <sup>-1</sup>	RSD /%
130312	2.65	2.65	0.75	3.85	3.86	0.69	5.32	5.36	0.71	3.11	3.14	0.97
	2.63			3.84			5.38			3.17		
	2.67			3.89			5.39			3.15		
130318	2.81	2.79	0.90	4.01	3.98	0.77	5.01	5.01	0.50	3.34	3.32	0.76
	2.79			3.97			5.04			3.29		
	2.76			3.95			4.99			3.32		
130325	2.58	2.60	0.59	3.98	3.96	0.51	5.41	5.40	0.19	3.15	3.14	0.97
	2.61			3.94			5.39			3.17		
	2.60			3.96			5.40			3.11		

痿遗精、筋骨萎软、风湿痹痛、麻木拘挛等症的治疗；西红花具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神的功效，可用于经闭癥瘕、产后瘀阻、温毒发斑、忧郁痞闷、惊悸发狂等症的治疗。同时淫羊藿苷和宝藿苷 I 为淫羊藿主要成分，西红花苷-I 和西红花苷-II 为西红花主要成分，本文采用高效液相色谱法对淫羊藿中淫羊藿苷、宝藿苷 I 和西红花中西红花苷-I、西红花苷-II 进行含量测定方法研究，对完善本品的质量标准具有十分重要的作用，能有效控制产品的内在质量。

#### [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,2010:306,120,附录 30,附录 36.
- [2] 国家药典委员会. 国家药品标准中药成方制剂. 第2册[S]. 北京:人民卫生出版社,1998:96.
- [3] 徐文芬,何顺志,王悦云,等. 不同产地加工与贮藏方法对淫羊藿药材中淫羊藿苷及总黄酮的影响[J]. 中成药,2012,34(8):1556.
- [4] 杨成俊,朱粉霞,贾晓斌,等. HPLC 法测定淫羊藿苷元脂质体中药物含量及包封率[J]. 中成药,2012,34(3):574.
- [5] 万婷,熊富良,高文天,等. 骨康胶囊的质量控制研究[J]. 中成药,2012,34(6):1096.

- [6] 张伏军,尹小玲,李卿,等. 高效液相色谱法测定穿龙骨刺片中薯蓣皂苷和淫羊藿苷[J]. 中成药,2011,33(7):1182.
- [7] 程维明,程夏倩,刘智俊,等. 毛细管区带电泳法测定益肾壮骨颗粒淫羊藿苷与柚皮苷含量[J]. 医药导报,2012,31(8):1079.
- [8] 刘瑛,张浩. RP-HPLC 法测定栀子中西红花苷-I 和西红花总苷含量[J]. 中国民族民间医药,2007(6):337.
- [9] 胡馨,张聪,张英华. 西红花中西红花苷 II 及总苷的近红外光谱研究[J]. 中国现代中药,2012,14(5):1.
- [10] 李玲莉,王兰霞,倪琳,等. HPLC 法测定雪山金罗汉止痛涂膜剂中西红花苷-I 和龙胆苦苷[J]. 中成药,2012,34(3):499.
- [11] 尼珍,阿萍,格桑索朗. HPLC 法测定藏药二十五味珍珠丸中西红花苷 I 的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(1):151.
- [12] 赵淑娟,张金家,裴卫忠,等. 西红花有效成分含量与球茎大小相关性分析[J]. 上海中医药大学学报,2011,25(3):95.
- [13] 李顺旭,杨大坚,李荣东,等. 高效液相色谱梯度洗脱法测定不同中国产西红花药材中西红花苷 I、II 的含量[J]. 中南药学,2010,12(8):886.

[责任编辑 顾雪竹]