

HPLC 测定参杞强精胶囊中金丝桃苷含量

田元春^{1*}, 刘倩¹, 韦水林², 宾彬¹

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的: 建立参杞强精胶囊中金丝桃苷含量的高效液相色谱测定方法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液 (17:83), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 31 °C, 进样量 20 μL。结果: 金丝桃苷与样品中其他组分分离效果好。金丝桃苷的线性范围为 0.120 1 ~ 1.201 6 μg (r = 0.999 9), 平均加样回收率 (n = 6) 99.12% (RSD 1.90%); 供试品溶液在 24 h 内稳定。结论: 方法灵敏度高, 操作简便, 准确可靠, 可用于参杞强精胶囊中金丝桃苷的含量测定。

[关键词] 金丝桃苷; 参杞强精胶囊; 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)14-0149-03

[doi] 10.11653/syfyj2013140149

HPLC Quantitative Determination of Hyperin in Shenqiqiangjing Capsule

TIAN Yuan-chun^{1*}, LIU Qian¹, WEI Shui-lin², BIN Bin¹

(1. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;
2. Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determination of hyperin in Shenqiqiangjing Capsule. **Method:** Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted, the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphatic acid (17:83) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was set at

[收稿日期] 20121029(013)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅中医医院制剂类课题 (GZYZ-10-05); 广西中医药管理局中医药科技专项 (GZYZ1101)

[通讯作者] * 田元春, 副主任药师, 从事医院药学, 临床药学研究, Tel: 0771-5840015, E-mail: tianyc1989@163.com

[参考文献]

- [1] 卫生部药品标准. 中药成方制剂. 第 6 册 [S]. 1992:12.
- [2] 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, 2010:124, 58, 80, 22, 300, 164.
- [3] 徐国钧. 中药材粉末显微鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986:688, 168, 332, 758, 456, 125, 522, 144, 266, 748, 286, 760.
- [4] 李芸, 苗小楼, 封士兰, 等. 中药浓缩丸中 7 味药材的鉴别 [J]. 中成药, 2005, 12(27): 附 2.
- [5] 刘永生, 李晓坤, 王金菊. 新生化颗粒质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 95.
- [6] 韩慧琴, 曾春萍, 谢颖, 等. 逍遥丸 (水丸) 质量标准

- [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 116.
- [7] 李颖春, 郭念欣, 姬生国. 麻夷鼻炎喷雾剂的质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 92.
- [8] 赵荣华, 赵声兰, 文丹, 等. 何首乌不同部位二苯乙烯苷含量测定 [J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(2): 9.
- [9] 粟力杰. HPLC 法测定何首乌中二苯乙烯苷的含量 [J]. 中国当代医药, 2010, 17(18): 41.
- [10] 冯兵, 陈婷, 赵瑞芝, 等. HPLC 测定复方昆丹胶囊中药药内酯苷、芍药苷、二苯乙烯苷、五没食子酰葡萄糖 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 113.
- [11] 张莉. 高效液相色谱法测定龟甲养阴片中四羟基二苯乙烯苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(4): 13.

[责任编辑 顾雪竹]

350 nm and column temperature was set at 31 °C. The injection volume was 20 μL. **Result:** The linear range was 0.120 1-1.201 6 μg ($r=0.999 9$), the average recovery ($n=6$) was 99.12% (RSD 1.90%). The test solution was stable in 24 h. **Conclusion:** The method is sensitive, convenient and accurate, which can be applied in the determination of Shenqiqiangjing Capsule.

[**Key words**] hyperin; Shenqiqiangjing Capsule; HPLC; content determination

参杞强精胶囊由菟丝子、党参、枸杞子、五味子等中药组成,具有补肾健脾、活血养血、清热利湿、生精强精之功效。原方为强精煎,用于治疗男性少、弱精子症,能有效提高患者精子密度,改善精子存活率和精子活力,临床治愈率为 16.67%,总有效率为 80.0%^[1]。实验研究表明强精煎能修复小鼠睾丸病理损伤,降低睾丸生精细胞凋亡率,可抑制 Bax, Fas 和 fasl,促进 Bcl-2 蛋白在受损小鼠睾丸实质组织的表达^[2-3]。处方中菟丝子主要有效成分为金丝桃苷,为了控制参杞强精胶囊的质量,完善质量标准,本文建立了 HPLC 测定参杞强精胶囊中金丝桃苷的含量测定方法^[4-10],为本品提供了定量分析方法。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-20A 紫外检测器,LCsolution 色谱工作站,HCT-360 柱温箱(南京科捷分析仪器有限公司),GH-252 型分析天平(广州市艾安得仪器有限公司),Simplicity™ 型超纯水系统(Millipore 公司),KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

金丝桃苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号 111521-200303)。参杞强精胶囊及阴性样品(批号 20111008,20111028,20111101,20111115)由广西中医药大学第一附属医院制剂室提供。重蒸馏水自制,乙腈为色谱纯,均经 0.45 μm 滤膜过滤。其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

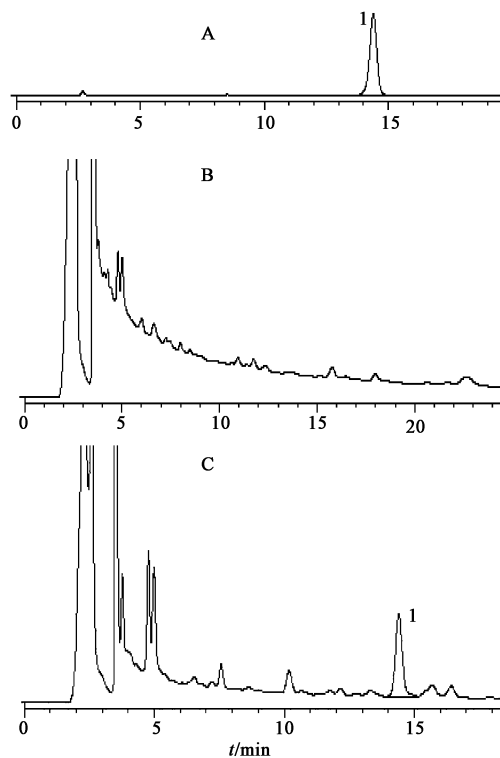
2.1 对照品溶液 精密称取金丝桃苷对照品 7.51 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得每 1 mL 含金丝桃苷 0.300 4 mg 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得 30.04 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.2 供试品溶液 取装量差异项下的参杞强精胶囊内容物,研细,取约 3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 25 kHz) 60 min,取出,放

冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 阴性样品溶液 按处方取除菟丝子外其余药味以相同制法制得参杞强精胶囊阴性样品。依供试品溶液制备方法,制成阴性样品溶液。

2.4 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(17:83),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 350 nm,柱温 31 °C。分别精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,依上述色谱条件测定,在对照品溶液和供试品溶液色谱图相应位置上,有相同保留时间的色谱峰,而阴性样品溶液色谱图相应位置无色谱峰(图 1)。



A. 对照品; B 阴性样品; C 样品; 1 金丝桃苷

图 1 参杞强精胶囊色谱

2.5 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 0.2, 0.4, 1.0, 1.5, 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配成含金丝桃苷质量浓度为 6.008,

12.016,30.04,45.06,60.08 mg·L⁻¹的系列对照品溶液,分别精密吸取对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定。以对照品溶液质量浓度 $X(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 为横坐标,色谱峰峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,计算金丝桃苷回归方程为 $Y = 4.2887 \times 10^4 X + 3.0232 \times 10^4$ ($r = 0.9999$),金丝桃苷进样量在 0.1201~1.2016 μg 线性关系良好。

2.6 精密度考察 将 2.1 项下 30.04 mg·L⁻¹的对照品溶液进样 20 μL,每小时进样 1 次,连续 6 次,日内精密度 RSD 1.81% ($n = 6$)。连续 3 d 每天进样 3 次,其日间精密度 RSD 1.67% ($n = 9$)。日内、日间精密度 RSD 均 ≤ 2.0%,表明该方法的日内和日间精密度均良好。

2.7 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液(样品批号 20111101)分别于 0,3,6,12,24 h 各进样 20 μL,测定金丝桃苷峰面积,计算得 RSD ($n = 5$) 1.42%。结果表明,供试品溶液在配制后的 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性考察 取同一批号(批号 20111101)样品,按 2.2 项下方法平行制备 6 份溶液,依法测定。结果金丝桃苷的平均含量为 0.2662 mg·g⁻¹,RSD 1.78%,结果表明方法重复性较好。

2.9 回收率试验 取已测定含量的同一批号(批号 20111101)样品约 1.5 g(6 份),精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 1 mL 2.1 项下对照品储备液,按 2.2 项下方法制备供试溶液,进样测定,平均回收率 99.12% (RSD 1.90%),表明本方法回收率较好。见表 1。

2.10 样品含量测定 精密称取 3 批参杞强精胶囊内容物各 3 g,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液并测定,结果 3 批样品金丝桃苷含量分别为 0.268,0.239,0.273 mg·g⁻¹。

表 1 金丝桃苷加样回收率测定($n = 6$)

称样量 /g	样品中 含量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.5055	0.4008	0.7038	100.88		
1.5003	0.3994	0.6916	97.27		
1.5036	0.4003	0.6946	97.99		
1.5088	0.4016	0.7080	101.98	99.12	1.90
1.5006	0.3995	0.6961	98.75		
1.5012	0.3996	0.6936	97.86		

注:加入量均为 0.3004mg。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 对金丝桃苷对照品溶液在 200~600 nm 进行紫外扫描,发现金丝桃苷最大吸收波长在 232,350~370 nm 有较大吸收。但供试品在 232 nm 干扰多,参考文献方法比较了 256^[5],320^[6],350^[7],360^[8-9],370^[10] nm 的色谱峰,发现 350 nm 处峰形良好,且杂质干扰少,故选择 350 nm。

3.2 色谱条件的优化 曾试验了 26,29,31,33 °C 柱温,结果供试品在 31 °C 柱温下干扰小,金丝桃苷色谱峰分离度好。

3.3 提取方法的选择 考察了超声处理 30,45,60,90 min,结果 60 min 超声处理得率较 30,45 min 超声得率明显高,60,90 min 超声处理得率相近,故选择超声处理 60 min。比较了超声处理溶剂甲醇^[7-8]、80% 甲醇^[4]和 70% 甲醇^[8],发现 80% 甲醇处理的供试品得率明显高于甲醇处理的供试品,并使金丝桃苷色谱峰达到很好的基线分离。

[参考文献]

- [1] 宾彬,王杰,陈定雄,等.强精煎治疗少弱精子症临床疗效及安全性研究[J].西部中医药,2012,25(4):5.
- [2] 姚重华,宾彬,赵霞,等.强精煎对模型小鼠睾丸病理损伤的影响[J].时珍国医国药,2007,18(6):1369.
- [3] 宾彬,王杰,陈定雄,等.强精煎对小鼠睾丸生精细胞凋亡相关基因表达影响的研究[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(6):10.
- [4] 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,2010:290.
- [5] 杨华生,张坤,尹小英,等.多指标正交试验优选罗布麻定时脉冲片提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):14.
- [6] 贾媛,恽菲,常星洁,等.多指标优选芪葵颗粒提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):27.
- [7] 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.
- [8] 林慧彬,路宁,林建强.不同寄主植物对菟丝子药材质量的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(3):625.
- [9] 刁保忠,靳维荣.柿子叶黄酮的提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):55.
- [10] 王刚,田应彪,杨松松.金菟亮光胶囊质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):53.

[责任编辑 顾雪竹]