

HPLC法测定壮阳填精口服液中淫羊藿苷的含量

王承华, 贺建华*, 巩曼

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的: 建立壮阳填精口服液中淫羊藿苷的含量测定方法。方法: 采用TLC法对淫羊藿、黄芪、蛇床子进行定性鉴别; 采用HPLC法测定本制剂中淫羊藿苷的含量。以乙腈-水(31: 69)为流动相, 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为270 nm, 柱温为室温, 进样量为 $15 \mu\text{L}$ 。结果: 在选定的薄层色谱条件下, 层析斑点清晰, 分离效果较好。HPLC法测定淫羊藿苷的线性范围为 $0.469 \sim 2.814 \mu\text{g}$, $r=0.9995$ 。平均回收率为100.4% ($n=6$), RSD为1.7%。结论: 该方法简便可行、专属性强、重复性好, 可用于控制该制剂的质量。

[关键词] 壮阳填精口服液; 薄层鉴别; 含量测定; 淫羊藿苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0037-03

壮阳填精口服液是我院研制的纯中药口服制剂, 由淫羊藿、黄芪、蛇床子等组成, 具有温补肾阳、填精止遗的作用^[1]。临床上用于肾阳不足命门火衰所致的性功能减退、阳痿遗精、男子不育症、以及腰膝酸软、消渴等疾病; 淫羊藿为口服液中的主药, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效; 主要活性成分为黄酮类成分淫羊藿苷。为了控制该制剂的质量, 确保临床疗效, 我们用薄层色谱法及高效液相色谱法, 初步进行了壮阳填精口服液质量标准的研究。

1 仪器与试剂

仪器: Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国); 淫羊藿苷对照品批号: 0737-200111、黄芪甲苷对照品批号: 0871-200305、蛇床子对照药材批号: 110822-200305 均由中国药品生物制品检定所提供; 壮阳填精口服液(本院中药制剂研究室研制); 硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂); 试剂: 乙腈为色谱纯; 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。

2 薄层色谱鉴别

2.1 淫羊藿 取壮阳填精口服液25 mL, 置分液漏斗中, 用乙醚20 mL振摇提取1次, 弃去乙醚, 水层于水浴锅上挥尽乙醚, 水层用乙酸乙酯20 mL提取1次, 乙酸乙酯液蒸干, 残渣用1 mL甲醇使溶解与

聚酰胺粉3 g拌样, 加入已处理好的聚酰胺柱(内径约0.9 cm, 聚酰胺粉3 g, 干法上柱)上, 用乙酸乙酯20 mL洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加乙醇1 mL使溶解, 作为供试品溶液。另取淫羊藿苷对照品, 加乙醇制成每1 mL含1 mg的溶液, 作为对照品溶液。按不含淫羊藿的处方, 采用制剂工艺及上述供试品制备方法, 制成缺淫羊藿样品溶液。吸取供试品与对照品溶液及阴性样品溶液各 $4 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上, 以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(6: 1: 0.1: 0.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性无干扰, 结果见图1。

2.2 蛇床子 取壮阳填精口服液25 mL, 置分液漏斗中, 用乙醚振摇提取2次, 每次20 mL, 合并乙醚液, 用无水硫酸钠脱水, 过滤, 滤液挥干, 残渣加甲醇1 mL使溶解, 作为供试品溶液。另取蛇床子对照药材1 g, 加水40 mL煎煮2次, 每次0.5 h, 合并煎煮液, 滤过, 浓缩至10 mL, 同法制备对照药材溶液。按不含蛇床子的处方, 采用制剂工艺及上述供试品制备方法, 制成缺蛇床子阴性样品溶液。吸取供试品溶液与蛇床子对照药材溶液及阴性样品溶液各 $5 \mu\text{L}$, 分别点于同一硅胶G薄层板上, 以正己烷-甲苯-醋酸乙酯(5: 5: 2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 热风吹干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性无干扰。结果见图2。

[收稿日期] 2009-07-30

[通讯作者] *贺建华, Tel: 13521978633; E-mail: Hejianhua@sina.com

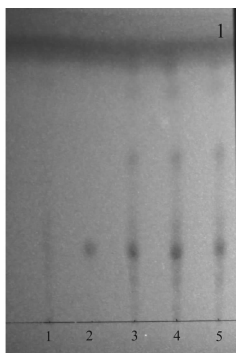


图 1 淫羊藿的 TLC 图谱

1. 淫羊藿阴性样; 2. 淫羊藿苷对照品; 3~5. 3 批样品

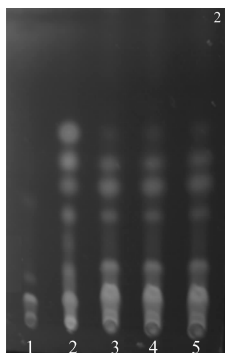


图 2 蛇床子 TLC 图谱

1. 蛇床子阴性样; 2. 蛇床子对照药材; 3~5. 3 批供试样品

2.3 黄芪 取壮阳填精口服液 10 mL, 置分液漏斗中, 加乙醚 15 mL 提取(弃去), 水层用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次(20 mL × 2), 合并正丁醇提取液, 用 0.1% 氢氧化钠 15 mL 洗涤 1 次, 用水饱和的正丁醇水洗至中性, 每次 10 mL(弃去水液), 正丁醇层置水浴上蒸干, 残渣加水 5 mL 使溶解, 通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 0.9 cm, 柱高 12 cm)上, 以水 50 mL 洗脱(弃去), 40% 乙醇 30 mL 洗脱(弃去), 70% 乙醇洗脱收集, 蒸干。残渣加 1 mL 乙醇使溶解, 作为供试品溶液。另取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

按不含黄芪的处方, 采用制剂工艺及上述供试品制备方法, 制成缺黄芪阴性样品溶液。照薄层色谱法试验^[1], 吸取供试品与黄芪甲苷对照品溶液及阴性样品溶液各 4 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 置以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-水(4: 6: 4.8: 2)下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 热风加热至斑点显色清晰。结果见图 3。

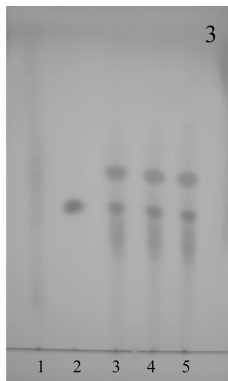


图 3 黄芪 TLC 图谱

1. 黄芪阴性样; 2. 黄芪甲苷对照品; 3~5. 3 批供试样品。

3 淫羊藿苷含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 水(31: 69); 检测波长 270 nm; 进样量 15 μL; 流速: 0.80 mL · min⁻¹; 柱温: 室温。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照

品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.093 8 mg 淫羊藿苷的对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备 精密吸取壮阳填精口服液 5 mL 置烧瓶中, 加入甲醇 15 mL, 超声处理 20 min, 放冷, 过滤, 取滤液于 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。空白对照溶液制备取不含淫羊藿药材制剂, 按供试品制法制备。

3.4 方法专属性 分别吸取淫羊藿苷对照品溶液, 供试品溶液, 空白对照溶液各 15 μL 进样, 检测。结果: 对照品、供试品色谱中淫羊藿苷峰均达到基线分离(见图中 a、b), 空白对照溶液中无相应色谱峰(见图中 c), 见图 4。

3.5 线性关系考察 精密称取淫羊藿苷 4.69 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解至刻度, 摇匀, 制成对照品溶液。精密吸取淫羊藿苷对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程: $Y = 421.62X + 43.457$, $r = 0.9995$ 表明淫羊藿苷在 0.469 ~ 2.814 μg 范围内, 线性关系良好。

3.6 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液 15 μL 连续进样 6 次, 测得淫羊藿苷峰面积积分值平均为 1 326, RSD = 0.07%。

3.7 稳定性试验 精密吸取同一浓度供试品溶液 15 μL, 分别于 0, 1, 2, 3, 6, 12 h 进行测定, 结果测得峰面积平均值为 1 357, RSD 为 0.96%。

3.8 重复性试验 取同一批样品(090401)平行制备 6 份供试品溶液, 测得样品中淫羊藿苷平均含量为 0.44 mg · mL⁻¹, RSD 为 1.78% (n = 6)。

3.9 加样回收率试验 精密量取已知含量的壮阳填精口服液样品溶液 2.5 mL 置 25 mL 容量瓶中, 共 6 份, 分别精密加入对照品溶液(浓度为 0.093 8 mg · mL⁻¹) 12.5 mL, 加甲醇溶液至刻度, 超声处理 20 min, 放冷, 过滤, 再加甲醇至刻度, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 进样 15 μL, 测定样品并计算淫羊藿苷回收率, 即得。结果见表 1。

3.10 样品测定 取 3 批样品, 按 3.3 项下方法制备, 进样 15 μL 测定, 分别测定 3 个批号的样品, 淫羊藿苷含量, 分别为 0.46, 0.45, 0.44 mg · mL⁻¹。

4 讨论

本文采用 TLC 法对淫羊藿、黄芪、蛇床子进行

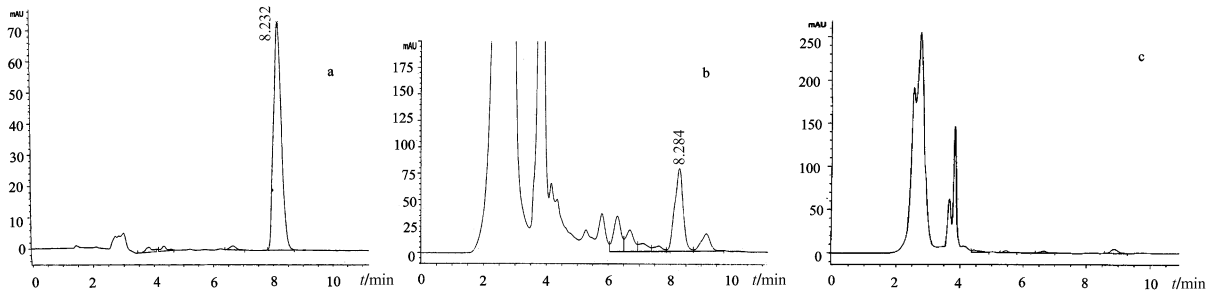


图4 HPLC图

a. 对照品; b. 样品; c. 阴性对照

表1 壮阳填精口服液淫羊藿苷回收率试验($n=6$)

淫羊藿苷含量(mg)	淫羊藿苷加入量(mg)	测得淫羊藿苷量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
		2.29	99.53		
		2.31	101.54		
1.12	1.17	2.27	98.12	100.23	1.73
		2.33	102.99		
		2.29	99.39		
		2.29	99.81		

了定性鉴别;处方中黄芪样品提取条件比较复杂,经反复摸索比较,在日光及紫外光灯下观察,薄层分离得到较好的效果。采用HPLC法测定本制剂中淫羊

藿苷的含量。色谱条件参考淫羊藿项下淫羊藿苷测定条件^[2~3],其中流动相采用乙腈-水(31:69)分离效果较理想。该方法简便可行、专属性强、重复性好,可用于控制该制剂的质量。

[参考文献]

- [1] 乔娜丽,王承华. 壮阳填精口服液对肾阳虚小鼠模型免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(8):47.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005:212,574.
- [3] 苗明三,李振国. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:966,890.