

HPLC 同步测定丽安康片中阿魏酸和淫羊藿苷含量

苏冀彦¹, 刘玮锦¹, 蔡大可¹, 刘亮锋¹, 赖平², 梁海春², 苏子仁^{1*}

(1. 广州中医药大学中药学院新药开发研究中心, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法同步测定丽安康片中阿魏酸和淫羊藿苷含量的方法。方法: 采用 Phenomenex Luna C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 醋酸溶液作为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 316 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果: 阿魏酸在 0.052 8 ~ 0.184 8 μg 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率为 99.8% ~ 101.1% ($n=6$); 淫羊藿苷在 5.68 ~ 19.88 μg 范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率为 99.9% ~ 101.5% ($n=6$)。结论: 所建立的方法准确、快速、灵敏、重复性好, 可用于丽安康片质量控制。

[关键词] 丽安康片; 阿魏酸; 淫羊藿苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0046-04

A Simultaneous Determination of Ferulic Acid and Icariin in the Li ankang Tablet by HPLC

SU Ji-yan¹, LIU Wei-jin¹, CAI Da-ke¹, LIU Liang-feng¹, LAI Ping², LIANG Hai-chun², SU Zi-ren^{1*}

(1. New Drug R&D Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine of Guangzhou University
of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of ferulic acid and icariin in the Li ankang Tablets by HPLC. **Method:** The separation was performed on a Phenomenex Luna C₁₈ column with acetonitrile-0.1% acetic acid on 316 nm at 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The good linear correlation of ferulic acid was observed from 0.052 8 μg to 0.184 8 μg ($r=0.999\ 9$) and that of icariin was observed from 5.68 μg to 19.88 μg ($r=0.999\ 9$). The average recoveries of ferulic acid and icariin were 99.8% to 101.1% and 99.9% to 101.5% respectively. **Conclusion:** The established method can be used as a quality controlling method for Li ankang Tablet.

[Key words] Li ankang Tablet; Ferulic Acid; Icariin; HPLC

丽安康片是在金元四大家之一李东垣所创立的气血双补名方“当归补血汤”基础上, 加味淫羊藿衍生而来。黄芪补气, 当归生血, 淫羊藿旺阳, 三药相伍, 能够使阴生阳长, 气旺血生, 有效防治更年期综合征和骨质疏松症。其中, 阿魏酸具有很好的抗氧

化、清除自由基以及细胞保护作用^[1]; 淫羊藿苷则是发挥其补肾壮阳、强健筋骨的主要物质基础成分^[2]。作者查阅文献发现, 对阿魏酸和淫羊藿苷进行含量测定的资料相当丰富, 但针对 2 种成分的同时测定鲜有报道。本实验应用高效液相色谱法对丽安康片中阿魏酸和淫羊藿苷 2 种成分的含量进行同步测定, 为本制剂质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Dionex Summit 高效液相色谱仪 (P680 HPLC Pump, ASI-100 Automated Sampled Injector,

[收稿日期] 2009-10-13

[基金项目] 广东省 2009 年度国际合作项目
(2009B050200004)

[通讯作者] * 苏子仁, Tel: (020) 39358517; E-mail: suziren@gzhtcm.edu.cn

UVD 170U, STH585 Column Oven), Chromleon 6. 70 数据处理系统。

HWS24 型电热恒温水浴锅; SartoriusBP110S 分析天平; AB204-N 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ5200A 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 阿魏酸对照品(含量测定用,批号 110773-200611),淫羊藿苷对照品(含量测定用,批号 110737-200414),均由中国药品生物制品检定所提供;乙腈、甲醇为色谱纯试剂(购自 Merck 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。丽安康片(批号 20071201、20071202、20071203,规格为 0.46 g/片);淫羊藿阴性样品(实验室自制,取当归药材及黄芪药材,模拟丽安康片制备工艺制得不含淫羊藿的阴性样品);当归阴性样品(实验室自制,取黄芪药材、淫羊藿药材,模拟丽安康片制备工艺制得不含当归的阴性样品);当归-黄芪双阴性样品(实验室自制,取淫羊藿药材,模拟丽安康片制备工艺制得不含当归、黄芪的双阴性样品)。

淫羊藿购自广州市荔湾区清平中药材市场,为 *Epimedium brevicomum* Maxim.; 当归购自甘肃岷县,为 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; 黄芪购自山西浑源万生黄芪开发有限公司,为 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao。上述药材均经广州中医药大学新药开发研究中心陈建南研究员鉴定为正品。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相: 乙腈-0.1% 醋酸溶液梯度洗脱,洗脱比例如下,0~60 min,乙腈由 10% 升至 60%; 60~65 min,乙腈由 60% 降至 10%; 65~70 min,乙腈 10%。检测波长: 316 nm。柱温: 20。进样量: 10 μL。流速: 1.0 mL·min⁻¹。理论板数按阿魏酸峰计算应不低于 5 000; 理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 205 000。见图 1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取对照品阿魏酸 2.64 mg,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,备用;精密称取对照品淫羊藿苷 28.40 mg 和上述阿魏酸对照品储备液 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至 10 mL 得含 0.0264 mg·mL⁻¹阿魏酸、2.84 mg·mL⁻¹淫羊藿苷的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液制备 取本品 4 片,除去包衣,研

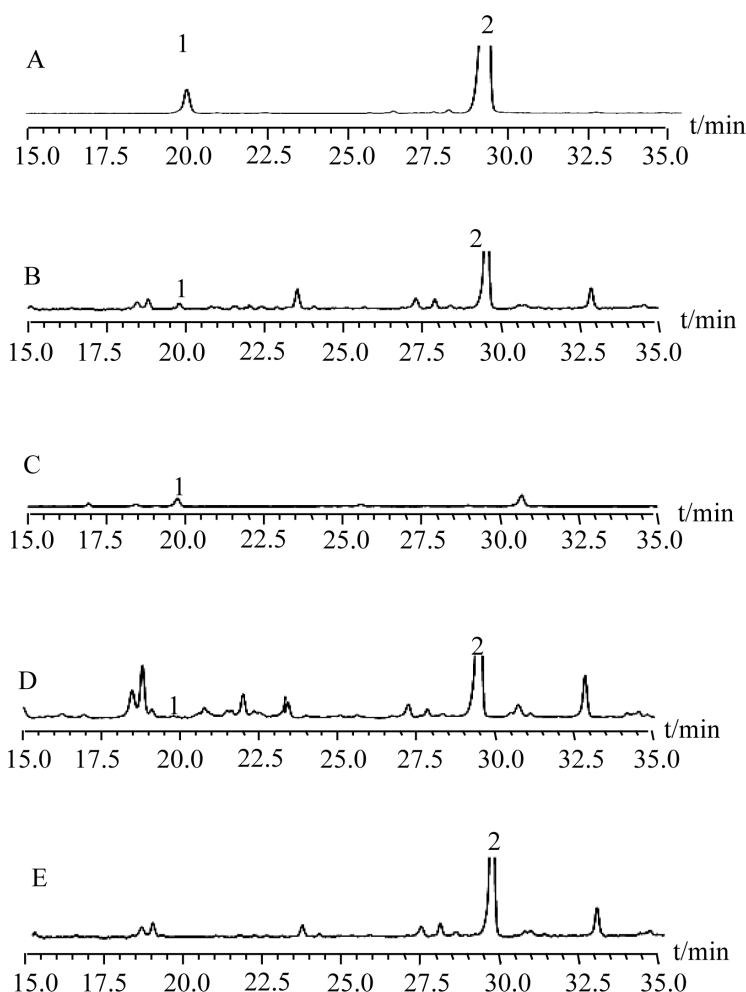


图 1 样品 HPLC 图

1. 阿魏酸; 2. 淫羊藿苷; A. 阿魏酸与淫羊藿苷混合对照品; B. 丽安康片样品; C. 淫羊藿阴性样品; D. 当归阴性样品; E. 当归-黄芪双阴性样品

细,取约 1.5 g,精密称定,置锥形瓶中,加入 40 mL 稀乙醇,回流提取 120 min,过滤,用少量稀乙醇多次洗涤滤渣至滤液无色,合并滤液,蒸至无醇味,加入 20 mL 水,过滤,用乙酸乙酯萃取 5 次,每次 30 mL,合并乙酸乙酯层,蒸干,用乙醇溶解,并定容至 5 mL,即得阿魏酸、淫羊藿苷供试品溶液。

2.4 阴性对照品溶液制备 分别取淫羊藿阴性样品、当归阴性样品、当归-黄芪双阴性样品 4 片,除去包衣,研细,取约 1.5 g 精密称定,按 2.3 项下制备方法处理,得淫羊藿阴性对照品溶液、当归阴性对照品溶液、当归-黄芪双阴性对照品溶液。

2.5 线性范围的考察 精密量取 2.2 项下对照品储备液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 分别用甲醇稀释并定容至 2 mL。精密吸取各浓度的对照品溶液各 10 μL 进样,以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,得阿魏酸的标准曲线方程为 $Y = 3.72 \times 10^3 X - 9.68$, $r = 0.9999$ ($n = 6$), 线性范围为 0.0528 ~ 0.1848 μg; 淫羊藿苷的标准曲线方程为 $Y = 9.26 \times 10^2 X + 1.85 \times 10^2$, $r = 0.9999$ ($n = 6$), 线性范围为 5.68 ~ 19.88 μg。阿魏酸、淫羊藿苷线性关系均良好。

2.6 精密度试验 精密量取含 $0.0264 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿魏酸、 $2.84 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿苷的混合对照品储备液 1 mL, 用甲醇稀释并定容至 2 mL。精密吸取上述溶液 10 μL , 注入 HPLC, 连续进样 7 次, 测定对照品峰面积。结果阿魏酸峰面积 RSD 为 2.2%, 淫羊藿苷峰面积 RSD 为 0.45%。结果显示, 本法测定精密度良好。

2.7 重复性试验 按 2.3 项下拟定的方法, 对同一批样品(批号 20071201) 制备供试品溶液, 平行做 6 份, 测定峰面积并计算含量。结果阿魏酸和淫羊藿苷的平均含量分别为 $0.019 \text{ mg}/\text{片}$, $2.24 \text{ mg}/\text{片}$, RSD 分别为 2.4% 和 2.6%, 提示本方法重复性好。

2.8 稳定性试验 按 2.3 项下拟定的方法制备供试品溶液(批号 20071201), 分别在 0, 3.5, 7, 14, 17.5, 21, 24.5 h, 精密吸取该溶液 10 μL , 注入 HPLC, 测定峰面积, 计算。结果显示, 阿魏酸、淫羊藿苷在 24.5 h 内测定值 RSD 分别为 2.0% 和 2.8%, 本研究样品可在 24.5 h 内测定。

2.9 准确度试验 精密称取阿魏酸对照品、淫羊藿苷对照品适量, 按 2.2 项制备得含 $0.01810 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿魏酸、 $2.166 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿苷的混合对照品储备液。取已知含量的同一批样品(批号 20071201), 称取 9 份样品, 每份约 0.46 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 分别精密加入上述对照品储备液适量(约为样品有效成分量的 0.8、1.0、1.2 倍量), 按 2.3 项下操作, HPLC 法测定, 计算加样回收率。结果显示, 该方法阿魏酸平均加样回收率为 99.8% ~ 101.1%, RSD 为 0.20% ~ 0.81%; 淫羊藿苷平均加样回收率为 99.9% ~ 101.5%, RSD 为 0.17% ~ 0.40%, 见表 1、表 2。

表 1 阿魏酸加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	对照品加入量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.8 倍	0.463 2	0.018 31	0.014 48	0.032 85	100.4		
	0.465 7	0.018 41	0.014 48	0.032 79	99.3	99.8	0.57
	0.461 7	0.018 25	0.014 48	0.032 69	99.7		
1.0 倍	0.461 1	0.018 23	0.018 10	0.036 35	100.1		
	0.461 7	0.018 25	0.018 10	0.036 63	101.5	101.1	0.81
	0.460 8	0.018 22	0.018 10	0.036 59	101.5		
1.2 倍	0.467 8	0.018 49	0.021 72	0.040 39	100.8		
	0.468 7	0.018 53	0.021 72	0.040 37	100.6	100.8	0.20
	0.465 5	0.018 40	0.021 72	0.040 33	101.0		

表 2 淫羊藿苷加样回收

No.	称样量 /g	样品中含量 /mg	对照品加入量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.8 倍	0.463 2	2.176	1.741	3.925	100.2		
	0.465 7	2.188	1.741	3.916	99.7	100.0	0.31
	0.461 7	2.169	1.741	3.919	100.2		
1.0 倍	0.461 1	2.166	2.166	4.321	99.7		
	0.461 7	2.169	2.166	4.338	100.1	99.9	0.17
	0.460 8	2.165	2.166	4.331	100.0		
1.2 倍	0.467 8	2.198	2.599	4.833	101.4		
	0.468 7	2.202	2.599	4.829	101.1	101.5	0.40
	0.465 5	2.187	2.599	4.835	101.9		

2.10 样品中阿魏酸、淫羊藿苷含量测定 分别取 3 个批次的丽安康片(批号分别为 20071201, 20071202, 20071203), 按 2.3 项下供试品溶液的制备方法处理样品, 精密吸取供试品溶液 10 μL , 按 2.1 项下色谱条件测定, 并按标准曲线计算含量。见表 3。

表 3 样品中阿魏酸、淫羊藿苷含量 ($n=2$) mg/片

No.	阿魏酸	淫羊藿苷
20071201	0.017	2.02
20071202	0.017	2.02
20071203	0.017	2.13

3 讨论

本实验的当归阴性色谱图(图 1D) 中, 出现与阿魏酸有相同保留时间的色谱峰; 而当归-黄芪双阴性色谱图(图 1E) 则无该色谱峰出现。对此, 本小组成员查阅文献^[3], 同时通过薄层色谱法、高效液相色谱法等方法验证, 证实本制剂中阿魏酸同时来源于当归和黄芪药材。据文献报道, 当归补血汤的阿魏酸含量显著高于方中当归单煎液中的含量^[4]。由此提示我们, 当归补血汤有较高的阿魏酸溶出率是由于简单的加和效应, 还是由于共煎的特殊环境(如皂苷类成分) 促进阿魏酸的溶出, 尚需进一步探讨。

考虑到阿魏酸和淫羊藿苷的极性特点以及纯化操作的方便可行, 同时参照《中国药典》^[5], 本实验以稀乙醇为提取溶剂, 并系统考察了提取方法和提取时间, 最后确定以稀乙醇回流提取 120 min 为最佳方案。为减少杂质的干扰, 保护仪器以及节约资源, 本实验选择对两目标成分都有较大溶解度的乙酸乙酯进行萃取纯化, 并考察萃取次数, 结果表明萃取 5 次能够提取较完全且杂质少。