

• 质量标准 •

高效液相色谱法测定五子衍宗丸中金丝桃苷的含量

李敏芳¹, 李 慧², 王学美^{1*}, 王国华²

(1. 北京大学第一医院 中西医结合研究室, 北京 100034; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定五子衍宗丸中金丝桃苷的含量。方法: 采用 Lichrospher C₁₈ 色谱柱, 乙腈-1% 冰醋酸(14: 86)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温为 33 ℃。结果: 金丝桃苷在 0.22~ 1.63 μg 时与峰面积呈良好线性关系($r = 0.999\ 9$), 平均回收率 101.40%, RSD 为 1.56% ($n = 6$)。结论: 该方法简便, 准确, 重复性好, 可用于五子衍宗丸的质量控制。

[关键词] 五子衍宗丸; 金丝桃苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0001-03

Determination of Hyperoside in the Wuzi Yanzong Pill by HPLC

LI Minfang¹, LI Hui², WANG Xue-mei^{1*}, WANG Guo-hua²

(1. Department of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine of Peking University First Hospital, Beijing 100034, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Determine the content of hyperoside in the Wuzi Yanzong Pill. **Method:** The HPLC method was used to determine the content of hyperoside from Wuzi Yanzong Pill. The analysis was carried out on Lichrospher C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-1% glacial acetic acid (14: 86) as mobile phase, flow-rate of 1.0 mL·min⁻¹ and wave-length at 350 nm at 33 ℃. **Results:** The liner range of hyperoside was 0.22~ 1.63 μg with a correlation(r) of 0.999 9. The recovery was 101.4% with RSD of 1.56%. **Conclusion:** The method had good reproducibility and sensitivity to determine the content of hyperoside from Wuzi Yanzong pill.

[Key words] Wuzi Yanzong Pill; hyperoside; HPLC

五子衍宗丸由枸杞子, 菟丝子(炒), 覆盆子, 五味子(蒸), 车前子(盐炒)加工制成的水蜜丸^[1], 具有填精补髓 疏补肾气的功效。2005 年版《中华人民共和国药典》仅有五子衍宗丸五味子甲素的 TLC 鉴别方法, 五味子甲素、五味子乙素的 HPLC 含量测定方法已有文献报道^[2-3]。该方中菟丝子为君药, 已有

关于菟丝子中黄酮类化合物金丝桃苷含量测定的报道^[4], 而五子衍宗丸中金丝桃苷的定量分析未见报道。本文旨在探讨五子衍宗丸的主要成分, 以金丝桃苷为指标成分, 建立了五子衍宗丸中金丝桃苷 HPLC 测定方法, 为该中成药有效成分的测定以及质量控制提供评价方法。

1 仪器 药品与试剂

Waters 717 自动进样器, 1515 泵, 2487 检测器, Empower 色谱工作站, 0.45 μm 微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司), KQ-100B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。金丝桃苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 1521-2000202), 五子衍

[收稿日期] 2007-08-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672760)

[通讯作者] * 王学美, Tel: (010) 66551122-3053, Fax: (010) 66551328, E-mail: wangxueimei64@sohu.com

宗丸由北京同仁堂提供(批号为 703504502, 703504011, 5030108)。乙腈为色谱纯(北京化工厂),冰醋酸为分析纯(北京化工厂),水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-1% 冰醋酸(14: 86), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 33 °C, 进样量 20 μL, 分析时间 20 min。在该色谱条件下金丝桃苷的保留时间为 15.7 min, 对照品、样品、阴性色谱图见图 1。

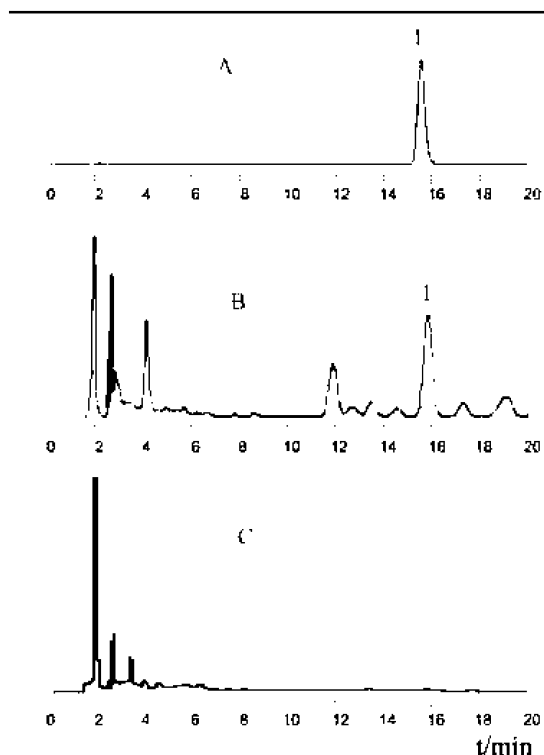


图 1 五子衍宗丸 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; C. 阴性; 1. 金丝桃苷

2.2 对照品溶液的制备 精密称取金丝桃苷对照品适量, 置于 10 mL 的量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备液(1.088 mg·mL⁻¹), 备用。精确量取上述对照品储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(0.1088 mg·mL⁻¹)。

2.3 供试品溶液制备 取五子衍宗丸细粉(过 40 目筛)约 1 g, 精密称定置 25 mL 容量瓶中, 加入甲醇 20 mL, 超声处理 40 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 取上述金丝桃苷对照品溶液, 以 2, 4, 6, 10, 15 μL 分别进样, 按上述色谱条件测定金丝桃苷峰面积, 以对照品进样(μg)为横坐标 X, 峰面积为纵坐标 Y, 进行线性回归, 得回归方程 Y=

$2.28 \times 10^4 X - 6.87 \times 10^4$, $r = 0.9999$, 在 0.22~1.63 μg 时与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 取对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 测定其峰面积, RSD 为 1.80%, 实验结果表明, 该方法有良好的精密度。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液(批号 5030108), 在 0, 2, 4, 12, 20, 24 h 分别进样 20 μL, 记录峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 0.57%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 分别称取 1 g 同一批药材(批号 5030108), 按供试品溶液制备方法制备 6 份, 按上述色谱条件, 分别各进样 20 μL, 测定金丝桃苷峰面积, 结果金丝桃苷平均含量为 0.0677%, RSD 为 0.61%, 该分析方法有良好的重复性。

2.8 回收率试验 精密称取已知含量的五子衍宗丸粉末 1 g, 6 份, 分别精密加入金丝桃苷对照品储备液(1.088 mg·mL⁻¹) 500 μL, 按供试品溶液制备方法制备, 按上述色谱条件, 进行测定, 计算回收率, 见表 1, 结果金丝桃苷平均回收率为 101.4%, RSD 为 1.56%。

表 1 金丝桃苷加样回收率

药品量 (g)	样品中含 量(mg)	加入量 (mg)	测定量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1.000 4	0.677 3	0.544 0	1.221 2	99.99		
1.000 8	0.677 6	0.544 0	1.246 3	104.54		
1.000 6	0.677 4	0.544 0	1.235 0	102.50		
1.000 7	0.677 5	0.544 0	1.231 3	101.80	101.4	1.56
1.000 6	0.677 4	0.544 0	1.220 0	99.74		
1.000 4	0.677 3	0.544 0	1.221 2	99.99		

2.9 样品测定 精密称取本品 3 批样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 进行测定, 并计算含量, 结果 3 批样品中金丝桃苷含量分别为 0.0605%, 0.0615%, 0.0671%。

3 讨论

根据文献报道, 用 HPLC 测定金丝桃苷的方法中, 流动相可为甲醇-水(40:60)^[5], 以及乙腈-1% 冰醋酸(16:84)^[6], 本实验以甲醇-水(45:55)、甲醇-0.1% 磷酸(45:55)为流动相进行试验, 结果金丝桃苷的分离较差, 以乙腈-1% 冰醋酸(14:86)为流动相, 配合 33 °C 柱温, 金丝桃苷与其他组分色谱峰达到较好分离, 保留时间约为 15.7 min。

金丝桃苷可溶于甲醇、乙醇等溶剂, 采用甲醇和乙醇超声提取 40 min 进行比较, 结果表明甲醇超声

提取效果较好。样品用甲醇溶解,分别考察索氏提取及超声提取的效果。结果表明,样品用甲醇超声提取 40 min 效果较好,方法简便,金丝桃苷提取完全。

本实验建立了 HPLC 测定五子衍宗丸中金丝桃苷含量的方法,该测定方法简单、稳定,重复性好,杂质干扰小,为一种较理想的含量测定方法,可用于五子衍宗丸质量控制。

[参考文献]

[1] 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. 364.

- [2] 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): 317-318.
- [3] 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): 9-10.
- [4] 聂新华. 高效液相色谱法测定菟丝子中金丝桃苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志. 2006(12): 13-14.
- [5] 石娟, 刘瑞, 宋晓涛, 等. HPLC 测定不同种鹿衔草中金丝桃苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 618-619.
- [6] 肖晶, 王钢力, 林瑞超. HPLC 法测定野马追药材及其制剂中金丝桃苷的含量[J]. 中草药, 2005, 36(1): 60-61.