

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.007

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.007>

高效液相色谱法测定菟丝育长合剂中淫羊藿苷的含量

曹静^{1,2}, 杨舒琪¹, 曾文彬¹, 赵昕², 何红²

(1. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410013; 2. 湖南省儿童医院药学部, 长沙 410007)

[摘要] 目的: 建立以高效液相色谱法测定菟丝育长合剂中淫羊藿苷的含量, 以控制制剂质量。方法: Agilent ZORBAX SB-C18液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(25:75)等度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为270 nm; 柱温为25 °C; 进样量为10 μL。结果: 淫羊藿苷在0.1036~2.072 μg内呈现良好的线性关系, 相关系数R²为0.9998, 平均加样回收率为100.6%, 相对标准偏差RSD为2.08%。结论: 高效液相色谱法简便、准确、重现性好, 可作为菟丝育长合剂的质量控制方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 菟丝育长合剂; 淫羊藿苷; 质量评价

Determination of Icaritin content of Tusiuzhang composition by high performance liquid chromatography

CAO Jing^{1,2}, YANG Shuqi¹, ZENG Wenbin¹, ZHAO Xin², HE Hong²

(1. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410003; 2. Department of Pharmacy, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China)

Abstract **Objective:** To establish the method for the determination of icaritin content of Tusiuzhang composition by HPLC. **Methods:** Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the chromatographic column, and acetonitrile-water (25:75) was used as the mobile phase. The flow velocity was 1.0 mL/min, and the detection wave length was 270 nm; the column temperature was 25 °C; the sample size was 10 μL. **Results:** The method showed a good linear relationship in the range of 0.1036–2.072 μg, with R² as 0.9998. The average recovery rate was 100.6% with a 2.08% RSD. **Conclusion:** The developed method is simple, accurate, reproducible, which can be applied for the quality control of Tusiuzhang composition.

Keywords HPLC; Tusiuzhang composition; icaritin; quality control

菟丝育长合剂是湖南省儿童医院自主研发的中成药合剂, 由菟丝子、枸杞子、龙骨、肉苁蓉、熟地黄、山药、乌药、桂枝、白术、淫羊藿、巴戟天、杜仲、山茱萸、甘草共14味中药组成, 其主要作用

为壮阳、补气和健脾等。菟丝育长合剂治疗小儿阴茎发育不良, 在临床上取得了良好疗效^[1]。

淫羊藿是菟丝育长合剂的主要成分之一。它是我国传统的中药, 广泛分布于贵州、云南、四

收稿日期 (Date of reception): 2019-12-10

通信作者 (Corresponding author): 曾文彬, Email: wbzeng@hotmail.com

川、湖南、湖北等地区^[2]。淫羊藿历史悠久,最早记载于《神农本草经》,其性温,味苦、辛,归肝、肾经。研究^[3]表明:淫羊藿中的淫羊藿苷具有极强的强筋骨、补肾阳及祛风湿的功效,临床上广泛应用于诊治阳痿遗精、风湿痹痛、筋骨痿软、麻木拘挛,对高血压、更年期综合征、骨质疏松等病症也有良好疗效。

控制中药合剂的有效成分含量非常重要,王晓梅等^[1]已研究了该合剂中枸杞子等的质量控制方法,但尚未建立该合剂中淫羊藿苷的质量控制方法。淫羊藿苷的测定方法很多,如紫外分光光度法^[4]、薄层扫描法^[5]、高效液相色谱法^[6]、毛细管胶束电动色谱法^[7]。其中高效液相色谱法目前应用最广泛,此法简便、准确、重复性好。因此,本研究建立HPLC法测定菟丝育长合剂中淫羊藿苷含量,以进一步完善菟丝育长合剂的质量质控,保证其临床应用的安全和疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

高效液相色谱仪, Agilent 1260 Infinity II型液相色谱仪系列,包括二极管阵列检测器、四元泵、真空脱气机,购自安捷伦科技有限公司;电子分析天平(AB135-S型)购自瑞士梅特勒-托利多公司;超声仪(KQ-500型)购自昆山市超声仪器有限公司;TDZ5-WS多架自动平衡离心机购自上海向帆仪器有限公司。

1.1.2 试剂

淫羊藿苷(批号:110737-201516)购自中国药品生物制品鉴定所;色谱纯乙腈、甲醇购自德国Merck公司;自制超纯水;分析纯甲醇(批号:20170915,规格:500 mL/瓶)购自上海强盛化工有限公司;菟丝育长合剂(批号:20170104,20170109,20170111,20170727)、缺淫羊藿的菟丝育长合剂阴性样品(批号:S20170723)为湖南省儿童医院自制。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18液相色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈水(25:75)等度洗脱;流速:1.0 mL/min;检测波长:

270 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μL,理论塔板数,按淫羊藿苷计 ≥ 1500 。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密量取对照品淫羊藿苷2.590 mg于25 mL容量瓶,加甲醇溶解,定容至刻度,配制成浓度为0.1036 mg/mL的对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

精密量取菟丝育长合剂适量,置于10 mL离心管中,用4 000 r/min的转速离心20 min,取上清液,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,量取续滤液,即得所需供试品溶液。

1.2.4 线性范围

分别精密吸取上述对照品溶液1.0, 2.0, 5.0, 8.0, 10.0, 20.0 μL依照“1.2.1”项下的色谱条件,分别注入高效液相色谱仪中,以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),制作标准曲线,线性回归,其回归方程为: $Y=1507.6X+2.239$, $R^2=0.9998(n=6)$ 。结果表明对照品在0.1036~2.072 μg范围内呈良好的线性关系。

1.2.5 系统适应性试验

分别精密吸取“1.2.2”和“1.2.3”项下的对照品和供试品溶液、缺淫羊藿的菟丝育长合剂阴性样品,按“1.2.1”项下的色谱条件进样,结果见图1。缺淫羊藿的菟丝育长合剂在淫羊藿苷出峰位置无色谱峰,方法专属性良好。

1.2.6 精密度考察

将低、中、高浓度分别为0.0518, 0.1036, 0.2085 mg/mL的标准品溶液,依照“1.2.1”项下的色谱条件,连续进样,测定6次,淫羊藿苷峰面积的RSD分别为0.49%, 0.73%, 0.81%。由此结果可得出,进样精密度结果符合规定,仪器的精密度良好。

1.2.7 重复性考察

取5.0 mL菟丝育长合剂(批号:20170727),平行操作6份,按“1.2.3”项下的方法制备供试品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件进样,记录好对应的峰面积,外标法计算淫羊藿苷含量,结果表明6份淫羊藿苷含量RSD为1.45%($n=6$),证明此方法的重复性良好。

1.2.8 稳定性考察

在室温,正常光照条件下,取重复性实验中一份供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h按“1.2.1”项下的色谱条件进样测定,记录峰面积,结果显示峰面积RSD为1.30%,表明样品在24 h内稳定。

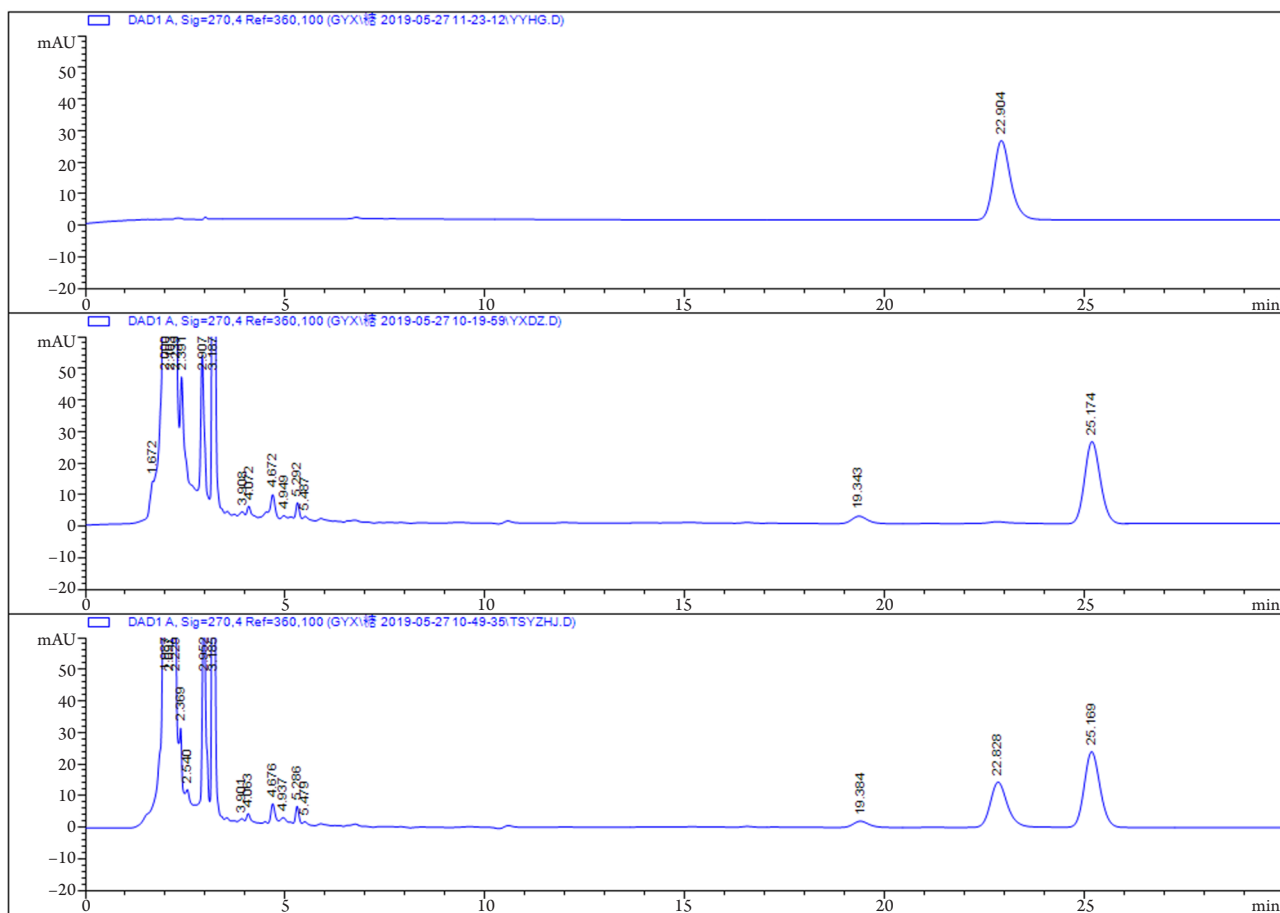


图1 菟丝育长合剂高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of Tusi yuzhang composition

(A) 淫羊藿苷对照品; (B) 缺淫羊藿的菟丝育长合剂; (C) 菟丝育长合剂。

(A) Icariin reference; (B) Negative sample without Epimedii Folium; (C) Tusi yuzhang composition.

1.2.9 加样回收率试验

取9份已知含量的菟丝育长合剂(批号: 20170727)各5.0 mL, 置于10 mL的棕色量瓶中, 分别精密加入相当于制剂含量50%, 100%, 150%的淫羊藿苷对照品溶液, 按“1.2.3”方法制备成高、中、低各5份加样回收供试品溶液, 按“1.2.1”色谱条件进样分析, 测定淫羊藿苷的含量, 计算加样回收率。3个浓度的平均加样回收率分别为99.30%, 102.04%, 100.59%, RSD为2.08%, 方法准确度良好(表1)。

2 结果

取批号分别为20170104, 20170109, 20170111的菟丝育长合剂, 按“1.2.3”项下的方法制备供试品溶液, 平行操作2份, 在“1.2.1”色谱条件下进样, 测定两次, 记录各自的色谱峰面积。用外标法来计算此3个批次的样品中的淫羊藿苷含量, 结果显示3批菟丝育长合剂平均含量为2.1009 mg/100 mL, 标准差为8.71% (表2)。

表1 淫羊藿苷回收率试验结果(n=3)

Table 1 Recovery of Icaritin (n=3)

取样量/mL	样品含有量/mg	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
5.0	0.09648	0.0518	0.1487	100.03	99.30	
5.0	0.09648	0.0518	0.1479	99.74		
5.0	0.09648	0.0518	0.1455	98.12		
5.0	0.09648	0.1036	0.1984	99.13	102.04	
5.0	0.09648	0.1036	0.2050	102.44		2.08
5.0	0.09648	0.1036	0.2092	104.57		
5.0	0.09648	0.1554	0.2571	102.07	100.59	
5.0	0.09648	0.1554	0.2484	98.62		
5.0	0.09648	0.1554	0.2546	101.08		

表2 菟丝育长合剂中淫羊藿苷含量测定结果(n=3)

Table 2 Content of Icaritin in Tusiyuzhang composition(n=3)

批号	峰面积	药液体积/mL	浓度/(mg·mL ⁻¹)	每瓶含量/(mg·100 mL ⁻¹)	平均每瓶含量/(mg·100 mL ⁻¹)
20170104	296.3	100	0.0195	1.9505	1.9300
20170104	290.1	100	0.0191	1.9094	
20170109	311.2	100	0.0205	2.0494	2.0789
20170109	320.1	100	0.0211	2.1084	
20170111	345.7	100	0.0228	2.2782	2.2938
20170111	350.4	100	0.0231	2.3094	

3 讨论

本研究建立了菟丝育长合剂中淫羊藿苷的含量测定方法, 结果显示供试品淫羊藿苷在0.1036~2.072 μg内线性关系良好, 加样回收率为99.13%~105.13%, 供试品溶液24 h内稳定性良好。

采用高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器, 在200~400 nm波长范围内进行全波长扫描, 最大吸收波长出现在270 nm处, 故将270 nm确定为检测波长。

流动相参考2015版药典中淫羊藿药材含量测定所用流动相并通过调整最后确定流动相的比例为乙腈-水(25:75), 此时淫羊藿苷分离度及分析时间最佳; 在色谱柱选择上, 比较Waters SymmetryShield™ RP18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C18液相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Sharpsil-T C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)三种色谱柱, 结果表明Agilent ZORBAX SB-

C18液相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱各峰分离度更好, 柱效更高。

通常情况下, 高效液相色谱法进行含量测定线性关系考察时可以采取配制不同浓度的标准品溶液进样量相同, 也可以配制一个浓度的标准品溶液改变进样量的方法。通过长时间的试验表明配制一个浓度的标准品溶液改变进样量线性关系更高。

菟丝育长合剂在临床使用过程中为常温、没有避光操作等特殊处理, 因此本研究过程也没有采用特殊手段, 仅在常温正常光照条件下进行。

参考文献

1. 王晓梅, 李国强. 菟丝育长合剂的质量控制方法研究[J]. 中医药导报, 2007, 13(10): 71-72.
WANG Xiaomei, LI Guoqiang. Quality control for Tusiyuzhang

- composition[J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2007, 13(10): 71-72.
- 朱燕, 黄义纯, 严晓明. HPLC法同时测定抗骨增生丸中毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷的含量[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(5): 917-921.
ZHU Yan, HUANG Yichun, YAN Xiaoming. Simultaneous determination of verbascoside, naringin and icariin in Kangguzengsheng pills by HPLC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(5): 917-921.
 - 汪涛, 赵雁平, 胡卫东. 复方太子参片中淫羊藿苷含量测定研究[J]. *中国药物应用与监测*, 2016, 13(5): 271-273.
WANG Tao, ZHAO Yanping, HU Weidong. Study on content determination of icariin in Fufang Taizishen tablets[J]. *Chinese Journal of Drug Application and Monitoring*, 2016, 13(5): 271-273.
 - 代龙, 何慧. 薄层-紫外分光光度法测定降压颗粒中淫羊藿苷的含量[J]. *中药新药与临床药理*, 1997, 8(1): 41.
DAI Long, HE Hui. Determination of icariin in depressurized particles by TLC-UV spectrophotometry[J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 1997, 8(1): 41.
 - 王梅, 宋红湘, 边爱萍. 助孕胶囊中淫羊藿苷的含量测定[J]. *中成药*, 2001, 23(5): 331.
WANG Mei, SONG Hongxiang, BIAN Aiping. Determination of Icariin in Zhuyun capsules[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2001, 23(5): 331.
 - 罗曼, 陈万里. HPLC法测定复方杜仲口服液淫羊藿苷的含量[J]. *中国药品标准*, 2004, 5(3): 42-44.
LUO Man, CHEN Wanli. Determination of the icariin in Compound eucommia bark oral Solution by HPLC[J]. *Drug Stanooaros of China*, 2004, 5(3): 42-44.
 - 梁统, 周尧元, 凌光鑫. 毛细管胶束电色谱法测定淫羊藿及其中药制剂中淫羊藿苷的含量[J]. *广东药学院学报*, 2000, 16(2): 97.
LIANG Tong, ZHOU Yaoyuan, LING Guangxin. Determination of Icariin in epimedium and its preparation by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. *Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy*, 2000, 16(2): 97.

本文引用: 曹静, 杨舒琪, 曾文彬, 赵昕, 何红. 高效液相色谱法测定菟丝育长合剂中淫羊藿苷的含量[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(7): 1676-1680. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.007

Cite this article as: CAO Jing, YANG Shuqi, ZENG Wenbin, ZHAO Xin, HE Hong. Determination of Icariin content of Tusi yuzhang composition by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(7): 1676-1680. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.007