

HPLC 法测定复方鹿茸酒中尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I

许浩¹, 赵鸣²

1. 首都医科大学宣武医院 药学部, 北京 100053
2. 北京中医药大学附属护国寺中医医院 药剂科, 北京 100035

摘要: 目的 建立 HPLC 梯度洗脱法测定复方鹿茸酒中尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I。方法 采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 甲醇-乙腈 (1:1)、流动相 B: 水, 梯度洗脱; 0~22 min 在 224 nm 波长下检测尿囊素, 22~45 min 时在 270 nm 波长下检测山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。结果 尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 分别在 7.98~159.60 μg/mL、4.75~95.00 μg/mL、9.18~183.60 μg/mL、4.54~90.80 μg/mL、4.92~98.40 μg/mL 与峰面积线性关系良好; 平均回收率分别为 98.67%、96.86%、99.56%、98.15%、97.90%, RSD 值分别为 1.12%、0.85%、1.07%、1.49%、0.97%。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 为进一步完善复方鹿茸酒的质量标准提供参考。

关键词: 复方鹿茸酒; 尿囊素; 山药素 I; 淫羊藿苷; 淫羊藿次苷 I; 宝藿苷 I; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)12-2321-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.12.007

Determination of allantoin, batatasin I, icariin, icarisid I, and baohuoside I in Compound Lurong Vina by HPLC

XU Hao¹, ZHAO Ming²

1. Department of Pharmacy, Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing 100053, China
2. Department of Pharmacy, Huguosi TCM Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100035, China

Abstract: Objective To develop an HPLC gradient elution method for determination of allantoin, batatasin I, icariin, icarisid I and baohuoside I in Compound Lurong Vina. **Methods** HPLC method was adopted on Agilent TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-acetonitrile (1:1) - water with gradient elution. The detection wavelengths were 224 nm in 0—22 min (determination of allantoin) and 270 nm in 22—45 min (determination of icariin, icarisid I, and baohuoside I). The flow rate was 0.9 mL/min, and the column temperature was set at 30 °C with injection volume of 10 μL. **Results** Allantoin, batatasin I, icariin, icarisid I, and baohuoside I had good linearity in the ranges of 7.98—159.60 μg/mL, 4.75—95.00 μg/mL, 9.18—183.60 μg/mL¹, 4.54—90.80 μg/mL, and 4.92—98.40 μg/mL, respectively. The average recoveries were 98.67%, 96.86%, 99.56%, 98.15%, and 97.90%, with RSD of 1.12%, 0.85%, 1.07%, 1.49%, and 0.97%, respectively. **Conclusions** The method is simple, accurate and reproducible, and can provide a reference for the further improvement of the quality standard of Compound Lurong Vina.

Key words: Compound Lurong Vina; allantoin; batatasin I; icariin; icarisid I; baohuoside I; HPLC

复方鹿茸酒收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂标准第二十册, 是由淫羊藿、山药、鹿茸、黄精 4 味中药经现代制剂工艺加工而成的中药复方制剂, 具有补肾壮阳、益气润肺的功效, 临床上用于腰膝痿软、心悸气短、肺虚咳嗽、脾虚腹泻等疾

病的治疗^[1]。方中淫羊藿补肾阳、强筋骨、祛风湿, 现代药理实验表明淫羊藿具有多种药理活性, 主要含黄酮类、木脂素类、生物碱类、挥发油等多种成分, 其中淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I、朝藿定 A 等黄酮类为其主要成分, 《中国药典》2015

收稿日期: 2017-08-14

作者简介: 许浩 (1982—), 男, 本科, 主管中药师, 主要从事药事管理、药物分析研究等医院药学研究工作。

Tel: 13581879321 E-mail: xuhao198204@163.com

年版一部以淫羊藿苷和总黄酮为其指标性成分进行测定。山药健脾补肺、益胃补肾、固肾益精、聪耳明目、助五脏、强筋骨、长志安神、延年益寿，主要含尿囊素、薯蓣皂苷元、山药素 I、II、III、IV、V 等多种化学成分，尿囊素为其主要活性成分。鹿茸壮肾阳、补精髓、强筋骨、调冲任，黄精滋肾润肺、补脾益气。《卫生部颁药品标准》中复方鹿茸酒的质量标准仅对淫羊藿进行理化鉴别和乙醇量作了规定。因此本实验采用 HPLC 梯度洗脱法对复方鹿茸酒中淫羊藿所含淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、宝藿苷 I，山药所含尿囊素、山药素 I 进行同时测定，为进一步完善复方鹿茸酒质量标准提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(在线真空脱气机、柱恒温箱、可变波长检测器)(美国安捷伦公司); Mettler Toledo 十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

复方鹿茸酒由山西天生制药有限责任公司，规格 250 mL/瓶; 尿囊素(批号 111501-200202)、淫羊藿苷(批号 110737-201516)和宝藿苷 I(批号 111852-201603)对照品购自中国食品药品检定研究院; 山药素 I 对照品(批号 51415-00-0，质量分数 98.0%) 购自南京科朗医药化工有限公司; 淫羊藿次苷 I 对照品(批号 56725-99-6，质量分数 98.0%) 购自上海纯优生物科技有限公司; 甲醇、乙腈(色谱纯)，其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 甲醇-乙腈(1:1)、流动相 B: 水, 梯度洗脱, 见表 1; 0~22 min 在 224 nm^[2] 波长下检测尿囊素, 22~45 min 时在 270 nm^[3-5] 波长下

检测山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient eluted program

t/min	A/%	B/%
0~16	20.0%	80.0%
16~25	20.0%→28.0%	80.0%→72.0%
25~31	28.0%→41.0%	72.0%→59.0%
31~39	41.0%→55.0%	59.0%→45.0%
39~45	55.0%→20.0%	45.0→80.0%

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 对照品各适量, 用 70%乙醇分别制成质量分数分别为 0.798、0.475、0.918、0.454、0.492 mg/mL 的对照品母液。依次量取上述对照品母液 2.5、1.0、2.5、2.5、2.5 mL, 置同一 50 mL 量瓶中, 用 70%乙醇稀释并制成质量浓度分别为 39.9、9.5、45.9、22.7、24.6 ng/mL 混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取复方鹿茸酒 5.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用 70%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按复方鹿茸酒的处方和生产工艺制备不含山药、淫羊藿的阴性样品, 按供试品溶液的制备项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各适量, 依法进样测定, 记录色谱峰, 见图 1。结果尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 与其他组分峰分离度均大于 1.5, 理论塔板数均不低于 3 500, 阴性样品无干扰。

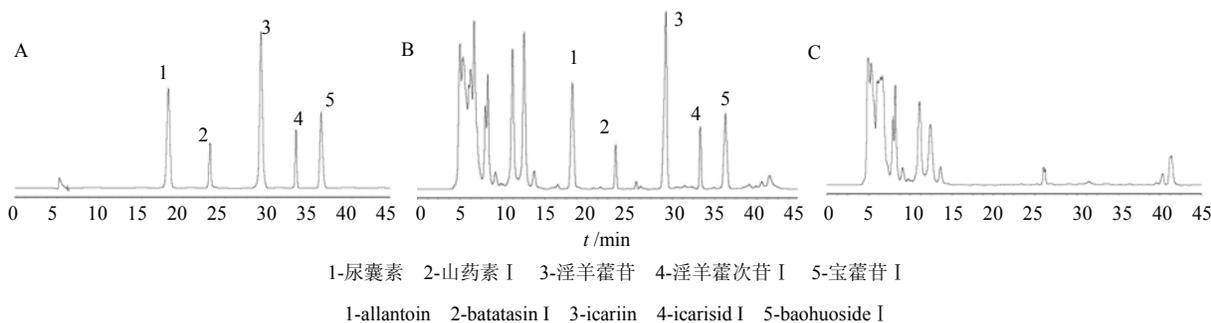


图 1 混合对照品(A)、复方鹿茸酒(B)和阴性样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Compound Lurong Vina (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品储备溶液各 5.0 mL，置于同一 25 mL 量瓶中，摇匀，作为线性考察混合对照品母液，再分别取线性考察混合对照品母液各适量，用 70%乙醇分别稀释 20、15、10、5、2 倍，制成线性考察混合对照品溶液 1、2、3、4、5。依

次精密吸取线性考察混合对照品溶液 1、2、3、4、5 和线性考察混合对照品母液各适量，依法进样测定尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 峰面积。采用所测各成分质量浓度作为横坐标，测得的峰面积作为纵坐标，进行线性回归，结果见表 2。

表 2 线性方程、相关系数及线性范围

Table 2 Linear equation, correlation coefficient, and linear range

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
尿囊素	$Y=9.5261 \times 10^5 X+254.1$	0.999 2	7.98~159.60
山药素 I	$Y=1.1756 \times 10^6 X-326.6$	0.999 5	4.75~95.00
淫羊藿苷	$Y=1.7904 \times 10^6 X+410.9$	0.999 9	9.18~183.60
淫羊藿次苷 I	$Y=7.6983 \times 10^5 X-118.7$	0.999 7	4.54~90.80
宝藿苷 I	$Y=8.3307 \times 10^5 X-397.4$	0.999 4	4.92~98.40

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 峰面积，结果所测成分尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 峰面积的 RSD 值分别为 0.96%、1.37%、0.77%、1.14%、1.03%。

苷 I 和宝藿苷 I 峰面积的 RSD 值分别为 0.84%、1.33%、0.81%、1.26%、1.07%。

2.6 重复性试验

取批号 161107 复方鹿茸酒样品 6 份，制备供试品溶液，依法进样测定，计算尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 的质量浓度，结果所测成分尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 质量浓度的 RSD 值分别为 1.47%、0.79%、1.31%、1.60%、1.54%。

2.8 加样回收率试验

取批号 161107 的复方鹿茸酒样品 9 份，每份精密量取 2.5 mL，分别置于 9 个 25 mL 量瓶中，依次精密加入混合对照品溶液（尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 质量浓度分别为 0.542、0.116、0.573、0.275、0.359 mg/mL）0.5、0.5、0.5、1.0、1.0、1.0、1.5、1.5、1.5 mL，制备供试品溶液，依法进样测定，结果尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 的平均回收率分别为 98.67%、96.86%、99.56%、98.15%、97.90%，RSD 值分别为 1.12%、0.85%、1.07%、1.49%、0.97%。

2.7 稳定性试验

取批号 161107 复方鹿茸酒样品，制备供试品溶液，于室温下 0、2、4、8、16 h 进样测定尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 峰面积，结果复方鹿茸酒供试品溶液室温下 16 h 稳定，所测成分尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次

2.9 样品测定

取 3 批复方鹿茸酒各适量，制备供试品溶液，依法进样测定，采用外标法计算尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 的质量浓度，结果见表 3。

表 3 复方鹿茸酒中尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 的测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination of allantoin, batatasin I, icariin, icarisid I, and baohuoside I in Compound Lurong Vina ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	尿囊素	山药素 I	淫羊藿苷	淫羊藿次苷 I	宝藿苷 I
161107	0.216	0.047	0.231	0.109	0.142
161203	0.187	0.039	0.250	0.123	0.161
170211	0.245	0.052	0.209	0.094	0.130

3 讨论

3.1 流动相的选择

流动相的选择在高效液相色谱分析中非常重要。实验中首先考察了甲醇-水流动相体系^[2,4,6]、乙腈-水流动相体系^[3,5,7-8]梯度洗脱,结果以甲醇-水为流动相梯度洗脱时,尿囊素和山药素 I 能达到有效分离,但淫羊藿苷分离效果不佳;以乙腈-水为流动相梯度洗脱时,淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 分离效果较好、峰形对称,但尿囊素分离效果较差。在此基础上,实验采用甲醇-乙腈(1:1)与水为流动相,同时对流动相比例进行摸索,最终确定采用甲醇-乙腈(1:1)与水为流动相,按照实验中梯度洗脱程序对复方鹿茸酒中尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 5 个成分进行同时测定。

3.2 色谱柱的选择

实验过程中分别考察了 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)^[2]、Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)^[4]、WelchromTM C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)^[5],以所测 5 个成分尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I 的峰形、分离度和色谱图基线平稳情况为指标,最终优选最佳的色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

本实验所建立的 HPLC 梯度洗脱法同时测定复

方鹿茸酒中 5 个成分尿囊素、山药素 I、淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I,该方法简便、准确,重复性好,为进一步完善复方鹿茸酒的质量标准提供参考。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第二十册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 217.
- [2] 明鹤, 杨太新, 杜艳华, 等. HPLC 分析不同施肥山药中尿囊素及薯蓣皂苷元含量 [J]. 中药材, 2014, 37(4): 558-560.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 28-29, 327-328.
- [4] 朱金花, 东莹莹, 胡卫平, 等. 高效液相色谱法同时测定怀山药中 4 个山药素化合物 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 396-400.
- [5] 蒋华军, 李银花, 刘仲华, 等. 高效液相色谱法快速测定淫羊藿中 6 种主要黄酮成分 [J]. 农产品加工学刊, 2011, (1): 11-13.
- [6] 张彭湃, 王松廷, 杨生玉, 等. 高效液相色谱法研究怀山药啤酒中的山药素类成分 [J]. 化学研究, 2016, 27(5): 603-608.
- [7] 彭静, 马益华, 陈彦, 等. 固定化蜗牛酶同时生物转化淫羊藿中 4 种黄酮苷 [J]. 中成药, 2016, 38(9): 1984-1990.
- [8] 孙娥, 贾晓斌, 金晓勇, 等. 淫羊藿饮片中 5 种主要黄酮类成分的比较 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(6): 449-452.