

HPLC 法和 UV 法测定复方五子颗粒剂中淫羊藿甙和总黄酮含量

湖南中医学院药剂教研室(长沙 410007) 黄桂芳* 罗杰英

摘 要 应用HPLC法测定复方五子颗粒剂有效成分淫羊藿甙含量,其结果为0.050%,RSD 0.72%,应用UV法(三波长)测定该颗粒剂有效部位淫羊藿总黄酮含量,结果为0.120%,RSD3.8%。HPLC法分离效果好,可用于复方单一成分含量测定,而UV法宜用于复方中有效部位含量测定。

关键词 HPLC UV 淫羊藿甙 淫羊藿总黄酮 含量

复方五子颗粒剂主药为淫羊藿。淫羊藿为历次版本的《中华人民共和国药典》收载的常用中药,具有温肾壮阳,祛风除湿之功效。为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim, 箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* Maxim, 柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim, 巫山淫羊藿 *E. wushanense* T. S. Ying, 朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥地上部分^[1]。其有效成分主要为淫羊藿甙,其有效部位为总黄酮类。作者建立了HPLC法测定该颗粒剂中淫羊藿甙含量和UV法测定其总黄酮含量的方法,进行了方法学考察,并对其结果进行了分析比较。为该颗粒剂质量标准中的定量研究提供方法。

1 HPLC 法测定淫羊藿甙含量

1.1 仪器与试剂:日本岛津 LC-4A 高效液相色谱仪;C-RZAX 数据处理机;SPD-2A 紫外检测器;CTO-2A 恒温柱箱;微量进样器 10 μ l;超声波清洗器 LX-100(北京医疗设备二厂)。试剂:甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,乙酸乙酯分析纯。药材:淫羊藿药材购自省药材公司,经省药检所检定,符合药典标准,但不是单一品种;淫羊藿对照品(中国药品生物制品检定所);复方五子颗粒剂(自制)。

1.2 色谱条件:色谱柱: Spherisorb C₁₈,

5 μ m, $\varnothing$ 4.6 $\times$ 150mm;流动相:甲醇-水(50:50);流速:1.0ml/min;柱温 28 $^{\circ}$ C;检测波长:270nm;灵敏度:0.02AUFS;进样量:10 μ l。上述色谱条件下,淫羊藿甙峰保留时间约为 16.3min。

1.3 对照品、待测液、空白液的制备

1.3.1 对照品液的制备:精密称取经五氧化二磷干燥至恒重的淫羊藿甙对照品 1.68mg,置 25ml 容量瓶中,加甲醇 13ml 使溶解后,加水稀释至刻度,即得(67.2 μ g/ml)。

1.3.2 待测液的制备:精密称取样品约 0.5g 加水溶解后,用乙酸乙酯 20ml 超声波提取,除去脂不溶性杂质,乙酸乙酯蒸干,残渣用 13ml 甲醇溶解,移至 25ml 量瓶中,用 10%的 NaCl 稀释至刻度,再冷藏(0 $^{\circ}$ C 以下) 30min 使蛋白质沉淀,微孔滤膜滤去蛋白质沉淀,即得供试品溶液。

1.3.3 空白液的制备:取缺淫羊藿的阴性样品适量,制法同待测液。

1.4 样品测定:取对照品液、样品待测液、样品加对照品液、空白液分别进样测试,其结果见图 1。

* Address: Huang Guifang, Department of Pharmaceutics, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha

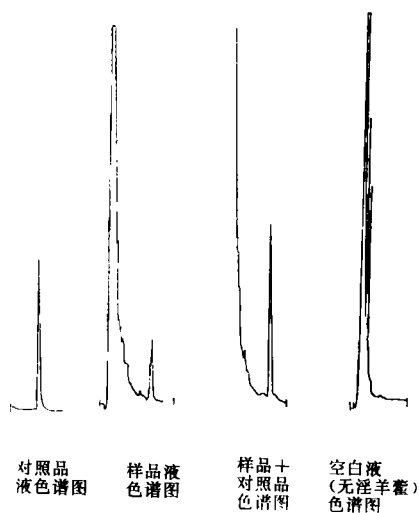


图1 HPLC图谱

从以上结果可知,前三者色谱图中淫羊藿甙保留时间相同处有相同色谱峰,而空白液则无。证明该颗粒剂处方中其它成分对淫羊藿甙的测定无干扰。

取不同量对照品液进样,测得淫羊藿甙 0.13~0.81 μ g 范围内峰面积与进样量(μ g)的回归方程为 $A = 1.885 \times 10^5 C - 1.154 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。据此对样品进行含量测定,以外标法计算,即得。计算公式为:

$$\text{含量} = \frac{\text{样品峰面积} \times \text{对照品溶液浓度} \times \text{稀释倍数}}{\text{对照品溶液峰面积} \times W(\text{取样量})}$$

结果见表1。

表1 六批复方五子颗粒剂淫羊藿甙含量测定结果(n=3)

样品	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$
淫羊藿甙含量(g/g)%	0.059	0.056	0.057	0.046	0.042	0.042	0.050 ± 0.072

1.5 精密度:精密吸取同一对照品液,重复进样5次,每次10 μ l,淫羊藿甙峰面积RSD为1.23%。

1.6 重复性:同一批样品取5份分别按拟定的含量测定方法测定,其含量测定结果的RSD为3.5%。

1.7 稳定性:同一批样品制成待测液当天进行含量测定,3d后再测定一次,两次结果的RSD为0.69%。

1.8 回收率:取已知含量的同一批样品5份(含量为0.0591%),各加水10ml,超声波振荡使溶解后,各精密加入一定浓度的对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、12.0ml,于80 $^{\circ}$ C水浴上将甲醇挥干,照样品测定方法进行测定,计算回收率,其平均回收率为97.84%,RSD为1.67%。

2 UV法测定淫羊藿总黄酮的含量

2.1 仪器与试药:日本岛津UV-265FW型紫外分光光度仪;层析柱(30 $\times$ 2cm);TG328B光子读数分析天平。试剂:无水乙醇为分析纯;聚酰胺为层析用。药材、对照品、样品同HPLC法。

2.2 对照品、待测液、空白液的制备

2.2.1 对照品液的制备:精密称取6.9mg淫羊藿甙对照品,用70%乙醇溶解,定容于100ml容量瓶,其浓度为69 μ g/ml。

2.2.2 待测液的制备:精密称取样品约4g,加70%乙醇150ml回流1.5h,滤渣再用70%乙醇75ml回流0.5h,过滤,合并两次滤液,回收乙醇,定容于50ml容量瓶中。称取过100目筛的聚酰胺细粉4g,湿法上柱(30 $\times$ 2cm柱),取上述10ml提取液与约0.5g聚酰胺细粉混匀,水浴上蒸干,挥至无乙醇味,上柱。先用50ml蒸馏水洗脱,弃去,再用150ml无水乙醇洗脱,收集醇洗脱液,在水浴上挥尽乙醇,再以70%乙醇为溶媒,使之溶解,定容于100ml容量瓶中,取10ml上述液稀释为100ml,即为样液。定量药材同法处理。

2.2.3 空白液的制备:称取适量不含淫羊藿的样品,处理同上即得。

2.3 三波长选择^[2]:以上各种试液,均以70%的乙醇为对照,在日本岛津UV-265FW紫外分光光度仪上扫描。波长范围为200~400nm,吸收度为0~1,得如下曲线。

选择空白液的最高吸收峰278.5nm为 λ_1 ,淫羊藿甙的特征吸收峰269.6nm为 λ_2 ,在空白液曲线上通过 λ_1 、 λ_2 两点作直线交于曲线一点243nm,故在243~244之间变动

λ_3 ,在 UV-265FW 型紫外仪上测定空白液 λ_1 ~ λ_3 的吸收度,从紫外仪上读出 ΔA ,见表 2。

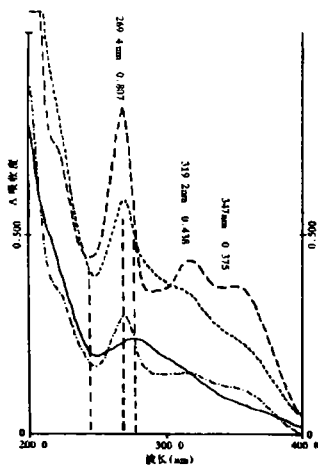


图 2 各试液紫外吸收曲线
——空白 ····淫羊藿药材
·····待测液 -·-·对照

表 2 不同组合波长与 ΔA 的关系

λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	λ_3 (nm)	ΔA
278.5	269.6	243.0	0.0016
278.5	269.6	243.5	0.0000
278.5	269.6	243.6	0.0005
278.5	269.6	243.7	0.0007
278.5	269.6	243.8	0.0008

由上可知,使 $\Delta A=0$ 的三个组合波长应为 278.5nm,269.6nm,243.5nm。在这三个波长测得样品的 ΔA 值已消除干扰。通过不同浓度的空白液检验, ΔA 均趋于 0,三波长选择正确。

Detemination of Icarin and Flavonoids in Co-Wuzi Granule by HPLC and UV

Huang Guifang,Luo Jieying

An HPLC method for the quantitative determination of icarlin and an UV method for the determination of flavonoids in Co-Wuzi granule Preparation were developed. Results showed that the amount of icarlin was 0.050%,RSD=0.72%,and the amount of flavonoids was 0.120%,RSD=3.8%. The HPLC method was very effective in the separation of active principles,suitable for the quantitative determination of single component in compounded TCM preparations,while the UV method may be used for the identification of active parts of TCM preparations.

2.4 样品测定:取不同量淫羊藿甙对照液制成 10 μ l 70% EtOH 液,在选定三波长测 ΔA ,在 3~40 μ g 范围内,测得 C- ΔA 回归方程:C=75.764 ΔA -0.3623,r=0.9995。据此对样品进行含量测定,测得 ΔA ,由公式 $\frac{C \times 5000}{W_{\#} \times 10^6} \times 100\%$,求得淫羊藿总黄酮百分含量(g/g)。结果为平均含量 0.120%,RSD 3.8%。

2.5 回收率测定:取 8ml 对照液加入精密称定的样品中(约 4g),按前述样品处理法处理并测定含量,测得平均回收率为 89%,RSD 4.8%。

3 讨论

两法比较,HPLC 法简便、分离效果好,方法可靠,适宜单一化学成分含量测定,可作为质量标准定量指标。而 UV 法属计算法,分离效果差,待测液处理繁杂,回收率低,但对于样品中有效部位检测有一定意义。中药为复方给药,体现的是整体效应、综合作用,单一化学成分作为定量指标难以完全代表药物疗效,如结合有效部位含量测定则较为全面反映该制剂质量。

参考文献

1 中华人民共和国药典.1990 年版,291 页
2 孟宪纾,等.中成药分析.北京:人民卫生出版社,1990.54,56

(1996-03-05 收稿)

《 中 草 药 》 杂 志 欢 迎 刊 登 广 告