

基于高效液相色谱特征图谱及含量测定的 壮腰健肾丸质量评价

廖宝源*, 方慧琼, 肖芳红, 吴应帅, 李玲, 王翠, 袁芳, 罗静

(赣州市综合检验检测院, 赣州 341000)

摘要: **目的** 建立壮腰健肾丸的高效液相色谱(HPLC)特征图谱及金丝桃苷的含量测定方法。**方法** HPLC特征图谱采用月旭 Ultimate AQ-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 磷酸溶液-乙腈, 梯度洗脱, 检测波长 215 nm; 金丝桃苷的含量测定色谱柱为 Sharpsil-T C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 磷酸溶液-乙腈 (85:15), 检测波长 360 nm。**结果** 新建的壮腰健肾丸的 HPLC 特征图谱, 确认了 12 个特征峰, 分别为没食子酸 (1 号峰)、原儿茶酸 (2 号峰)、原儿茶醛 (3 号峰)、红景天苷 (4 号峰)、刺桐碱 (5 号峰)、金丝桃苷 (6 号峰)、染料木苷 (7 号峰)、特女贞苷 (8 号峰)、槲皮素 (9 号峰)、齐墩果酸 (10 号峰)、12β-乙酰氧基黑老虎酸 (11 号峰)、开环新南五味子酸 A (12 号峰); 含量测定中金丝桃苷进样量在 0.001934~1.9341 μg 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 93.4%, 19 批样品中金丝桃苷质量分数在 20.76~102.97 μg/g。

结论 建立的 HPLC 特征图谱及含量测定方法适用于壮腰健肾丸的全面质量评价。

关键词: 壮腰健肾丸; HPLC; 含量测定; 特征图谱; 质量评价; 金丝桃苷; 12β-乙酰氧基黑老虎酸; 开环新南五味子酸 A

0 引言

壮腰健肾丸为内科类补肾壮骨类中成药, 处方由狗脊、黑老虎、牛大力、菟丝子(盐水制)等九味药组成。方中重用狗脊补肝肾、强筋骨、祛风湿, 为君药。黑老虎行气止痛、散瘀通络, 鸡血藤补血活血、舒筋活络, 桑寄生补益肝肾、养血祛风、舒筋活络, 女贞子和菟丝子(盐制)补益肝肾, 金樱子固精缩尿, 以上六味药与君药相配, 从而加强补肝肾、祛风湿、活络之力, 为方中的臣药。千斤拔祛风湿、强腰膝、舒筋活络, 牛大力润肺, 强筋活络, 协助君臣药以加强补益扶正之功, 为方中佐使药。以上诸药互相配伍, 既能补肝肾、益气血, 又能祛风湿、舒筋活络、强腰膝, 扶正祛邪并用, 故尤适用于肝肾不足, 神经衰弱, 腰膝酸痛, 膝软无力, 小便频数, 遗精梦遗, 气血失调, 风湿痹阻之症的治疗^[1], 同时可以提高机体的免疫功能^[2]。药理研究^[3-6]发现, 壮腰健肾丸具有固精补肾的作用, 有增强体质、提高适应能力和抗病能力; 对衰老过程中神经氧化损伤的发生有保护的作用; 增强成骨细胞活性, 增加骨密度; 提高小鼠血清免疫球蛋白 G 的含量, 调

整机体免疫功能。

壮腰健肾丸有多个现行标准, 其中药典业发(2001)第 578 号所附标准, 多个标准检验项目设置过于简单, 只有显微鉴别和化学反应鉴别项, 个别标准增加了狗脊中原儿茶酸的含量测定项, 但通过查找资料^[7-10]和前期实验摸索, 原儿茶酸为鸡血藤、桑寄生、金樱子、千斤拔等药材的共有成分, 而非狗脊的专属性成分。狗脊、桑寄生的有效成分分别为原儿茶酸、咖啡酸、槲皮素等, 具有抗感染、抗氧化之功效^[11-13]。黑老虎的主要生理活性成分为木脂素和三萜酸^[14], 其中木脂素结构类型较多, 立体化学复杂, 而且具有抗肝炎、抗艾滋病毒和抗肿瘤等活性^[15-16]。中药指纹/特征图谱能够较为全面地体现中药复杂的物质基础, 目前广泛被应用于中药的质量评价^[17-19]。为全面控制与评价壮腰健肾丸质量, 本研究建立了高效液相色谱(HPLC)特征图谱和含量测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters Arc 高效液相色谱仪, 沃特世公司;

基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目(2023JS19)。

* 通信作者: 廖宝源, 副主任中药师, 研究方向为中药质量标准控制。E-mail: liaobaoyuan@163.com

XSE205DU 型电子天平, 梅特勒公司; Linomat5 型半自动点样仪, 卡玛公司; Good Lock-1000 型薄层数码成像系统, 上海科哲。

1.2 对照品与对照药材

对照品批号、含量、来源见表 1, 对照药材批号、来源见表 2。

1.3 样品

样品均为浓缩水蜜丸: A 公司(批号: 240101)、B 公

司(批号: 202310001)、C 公司(批号: 220503)、D 公司(批号: 20240106)、E 公司(批号: 20230602)、F 公司(批号: 2307053、2311088)、G 公司(批号: 230530)、H 公司(批号: C08008、B08221)、I 公司(批号: A24A001)、J 公司(批号: 10723001)、K 公司(批号: 24011123)、L 公司(批号: 231204)、M 公司(批号: 231103、240304)、N 公司(批号: 202305001)、O 公司(批号: 3035004)、P 公司(批号: 20230608), 分别编号 S1~S19。

表 1 对照品名称、批号、含量和来源

名称	批号	含量	来源
没食子酸	110831-202407	90.8%	中国食品药品检定研究院
原儿茶酸	110809-202207	97.5%	中国食品药品检定研究院
原儿茶醛	110810-201909	99.6%	中国食品药品检定研究院
红景天苷	110818-202009	98.6%	中国食品药品检定研究院
刺桐碱	112058-202001	/	中国食品药品检定研究院
金丝桃苷	111521-201809	94.9%	中国食品药品检定研究院
染料木苷	111709-202303	/	中国食品药品检定研究院
特女贞苷	111926-201906	95.0%	中国食品药品检定研究院
槲皮素	100081-201610	99.1%	中国食品药品检定研究院
齐墩果酸	110709-202109	95.8%	中国食品药品检定研究院
12 β -乙酰氧基黑老虎酸	231219	98.0%	上海融禾医药科技发展有限公司
开环新南五味子酸 A	240107	98.0%	上海融禾医药科技发展有限公司

表 2 对照药材名称、批号和来源

名称	批号	来源
狗脊	121071-201706	中国食品药品检定研究院
黑老虎	121438-201503	中国食品药品检定研究院
鸡血藤	121173-201805	中国食品药品检定研究院
金樱子	121047-201204	中国食品药品检定研究院
千斤拔	121502-201803	中国食品药品检定研究院
菟丝子	121232-202104	中国食品药品检定研究院
女贞子	121041-201905	中国食品药品检定研究院
桑寄生	121075-201604	中国食品药品检定研究院
牛大力	121209-202004	中国食品药品检定研究院

1.4 试剂与试药

乙腈为色谱纯, Sigma-Aldrich; 其它试剂均为分析纯; 硅胶 G 预制薄层板、硅胶 H 预制薄层板, 青岛海洋化工; 聚酰胺薄膜, 台州市路桥四甲生化塑料厂。

1.5 特征图谱方法

1.5.1 色谱条件

色谱柱为月旭 Ultimate AQ-C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相, 按下列梯度进行洗脱: 0~15 min, 1%~5% 乙腈; 15~20 min, 5%~10% 乙腈; 20~25 min, 10% 乙腈; 25~35 min, 10%~20% 乙腈; 35~40 min, 20% 乙腈; 40~51 min, 20%~35% 乙腈; 51~71 min, 35%~72% 乙腈;

71~85 min, 72% 乙腈; 85~100 min, 72%~85% 乙腈; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长 215 nm; 色谱柱温度 35 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

1.5.2 对照品溶液制备

精密称取原儿茶醛、红景天苷、没食子酸、刺桐碱、金丝桃苷、原儿茶酸、染料木苷、特女贞苷、槲皮素、齐墩果酸、12 β -乙酰氧基黑老虎酸、开环新南五味子酸 A 对照品各适量, 分别加甲醇制成每 1 mL 含 40 μ g 的溶液, 摇匀, 即得对照品溶液。

1.5.3 供试品溶液制备

取本品浓缩水蜜丸适量, 研细, 取 3.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 45 min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液^[20-21]。

1.6 含量测定方法

1.6.1 色谱条件

以 Phenomenex SynergiTMHydro-RP 80 \AA (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 为色谱柱; 流动相为 0.4% 磷酸溶液-乙腈(82:18); 流速为 1.0 mL/min; 色谱柱温度 35 $^{\circ}$ C; 检测波长为 360 nm; 理论板数按金丝桃苷峰计算应不低于 5000^[22]。

1.6.2 对照品溶液制备

精密称取金丝桃苷对照品 10.19 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品母液。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(每 1 mL 含金丝桃苷 9.6703 μg)^[22]。

1.6.3 供试品溶液制备

取本品浓缩水蜜丸, 研细, 取 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理(功率 480 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 80% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液^[20]。

1.6.4 阴性对照样品溶液制备

取按本品工艺制备的缺菟丝子阴性对照样品, 同供试品溶液制备方法制成阴性对照样品溶液。

2 结果与分析

2.1 特征图谱研究

2.1.1 精密度试验

取 S5 号样品, 照 1.6.3 项下方法和 1.6.1 项下色谱条件, 制成供试品溶液并重复进样 6 次, 结果刺桐碱峰(5 号峰)峰面积较大且分离度较好, 以该峰为参照峰, 得到 12 个主要色谱峰, 计算相对保留时间的相对标准偏差(RSD)为 0%~0.07%, 相对峰面积 RSD 为 0%~2.60%, 显示仪器精密度良好。

2.1.2 稳定性试验

取 S5 号样品, 照 1.6.3 项下方法制成供试品溶液, 照 1.6.1 项下色谱条件于 0、3.5、9、14.5、24 h 分别进样, 在得到的色谱图中, 以刺桐碱峰(5 号峰)为参照峰, 计算 12 个主要色谱峰的相对保留时间 RSD 为 0%~0.12%, 相对峰面积 RSD 为 0%~2.70%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.1.3 重复性试验

照 1.6.3 项下方法和 1.6.1 项下色谱条件, 将 S5 号样品制成平行供试品溶液共 6 份并进样测定, 以刺桐碱峰(5 号峰)为参照峰, 计算 12 个主要色谱峰的相对保留时间 RSD 为 0%~0.13%, 相对峰面积 RSD 为 0%~2.95%, 显示该方法具有良好的重复性。

2.1.4 特征图谱的建立

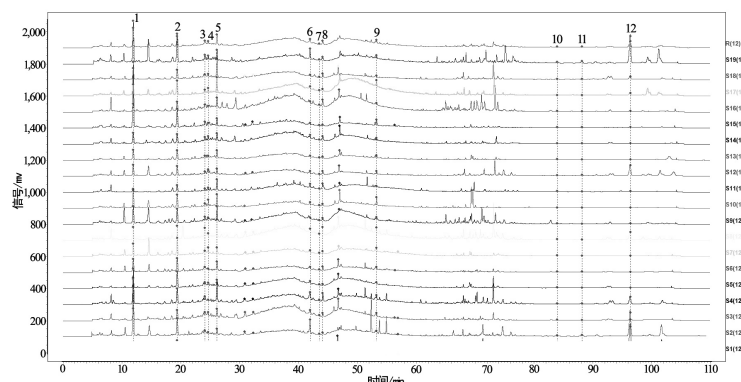
照 1.6.3 项下方法和 1.6.1 项下色谱条件, 将样品制成供试品溶液并进样, 记录色谱图, 用 Empower 软件导出特征图谱 CDF 格式, 并导入 2012 年版中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行处理, 以刺桐碱峰(5 号峰)为参照峰, 时间窗为 0.10, Mark 峰匹配方式, 对照图谱生成以平均数计算, 生成对照特征图谱。19 批样品的叠加特征图谱和对照特征图谱见图 1。

2.1.5 色谱峰指认

取方中九味药相应的对照药材, 照 1.6.3 项下方法和 1.6.1 项下色谱条件, 分别制成对照药材溶液并进样测定, 记录色谱图, 确定了 12 个共有峰的药味归属。结果见表 3。

表 3 特征图谱共有峰归属

峰号	成分	药材归属
1	没食子酸	鸡血藤、桑寄生、金樱子、千斤拔
2	原儿茶酸	鸡血藤、桑寄生、金樱子、千斤拔、狗脊
3	原儿茶醛	狗脊
4	红景天苷	女贞子
5	刺桐碱	牛大力
6	金丝桃苷	菟丝子
7	染料木苷	千斤拔
8	特女贞苷	女贞子
9	槲皮素	桑寄生
10	齐墩果酸	女贞子
11	12 β -乙酰氧基黑老虎酸	黑老虎
12	开环新南五味子酸 A	黑老虎



注: 1- 没食子酸 2- 原儿茶酸 3- 原儿茶醛 4- 红景天苷 5- 刺桐碱 6- 金丝桃苷 7- 染料木苷 8- 特女贞苷 9- 槲皮素 10- 齐墩果酸 11- β -乙酰氧基黑老虎酸 12- 开环新南五味子酸 A

图 1 19 批壮腰健肾丸样品(S1~S19)的 HPLC 特征图谱及对照特征图谱(R)

2.2 含量测定研究

2.2.1 专属性试验

取 1.6.2~1.6.4 项下的三种溶液, 分别照 1.6.1 项色谱条件进样测定, 结果表明阴性对照样品无干扰, 见图 2。

2.2.2 线性关系考察

取金丝桃苷对照品适量, 加 80% 甲醇制成质量浓度分别为 1.9341、9.6703、96.7031 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液①、②、③。分别精密吸取系列对照品溶液① 1 μL 、系列对照品溶液② 1、5、10 μL 及系列对照品溶液③ 2、10、20 μL , 照 1.6.1 项下色谱条件进样测定, 以对照品进样量(μg)为横坐标 X , 以峰面积为纵坐标 Y , 计算得到标准曲线并进行线性回归, 得回归方程 $Y=2202559.4368X+5932.4396$, $r=0.9999$, 线性范围 0.001934~1.9341 μg 。

2.2.3 精密度试验

取 1.6.2 项下的对照品溶液, 重复进样测定 6 次, 计算所得峰面积的 RSD 为 0.56%, 显示仪器具有良好的精密度。

2.2.4 重复性试验

取 S9 号样品, 照 1.6.3 项下方法制得平行 6 份供试品溶液, 并照 1.6.1 项下色谱条件进样测定, 测得金丝桃苷平均质量分数为 34.50 $\mu\text{g/g}$, RSD 为 1.50%。

2.2.5 稳定性试验

取 S9 号样品, 照 1.7.3 项下方法制得供试品溶液, 并照 1.6.1 项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定, 测得峰面积的 RSD 为 0.78%, 显示供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.6 加样回收率试验

取 S9 号样品(金丝桃苷质量分数为 34.50 $\mu\text{g/g}$)

约 2.5 g, 精密加入金丝桃苷对照品溶液(质量浓度 96.7031 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL 与 80% 甲醇溶液 50 mL, 照 1.6.3 项方法制得供试品溶液 6 份, 进样测定并计算加样回收率, 结果金丝桃苷平均加样回收率为 93.4%, RSD 为 0.84%。

2.2.7 样品测定

照 1.6.3 项下方法和 1.6.1 项下色谱条件, 取 S1~S19 号样品制成供试品溶液并进样测定。测定结果见表 4。

表 4 样品测定结果

批号	金丝桃苷 / ($\mu\text{g/g}$)
S1	48.14
S2	20.76
S3	29.2
S4	36.45
S5	23.64
S6	102.97
S7	77.1
S8	41.44
S9	37.31
S10	77.62
S11	36.67
S12	20.79
S13	61.98
S14	27.1
S15	29.99
S16	83.86
S17	41.47
S18	48.8
S19	35.18

结果显示 16 家企业生产的共 19 批壮腰健肾丸样品(S1~S19)中金丝桃苷质量分数在 20.76~102.97 $\mu\text{g/g}$, 表明各企业制剂工艺差异较大。

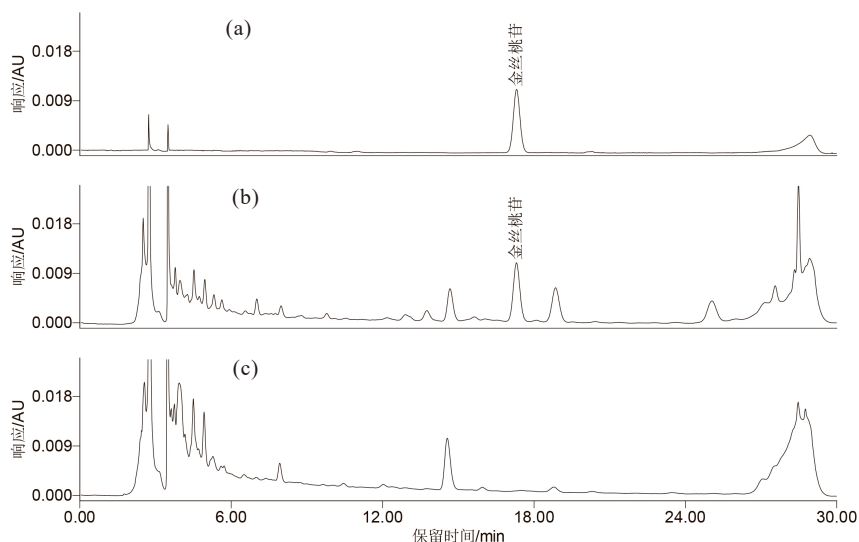


图 2 金丝桃苷(a)、样品(b)、阴性对照样品(c)的 HPLC 图

3 讨论与结论

特征图谱研究中, 通过前期试验研究和相关文献, 对甲醇-磷酸溶液和乙腈-磷酸溶液等流动相系统进行了考察, 并筛选了多种梯度洗脱组合, 结果发现乙腈-0.1%磷酸溶液流动相洗脱出的色谱峰更多, 响应值更高, 且各色谱峰分离度符合药典要求。测定供试品溶液时设定在采集时间内扫描 190~400 nm 的光谱, 得到 3D 图, 结果显示大部分峰在末端吸收更大, 同时考虑到乙腈-磷酸流动相体系的末端吸收, 故采集波长定为 215 nm。供试品制备方法使用 70% 甲醇 50 mL 作为溶剂, 采取超声处理和加热回流两种提取方式, 结果显示两种提取方式所提供试品色谱峰效果一致, 区别不大, 为节能增效, 采用超声提取。

含量测定以金丝桃苷的质量分数为考察指标, 对样品提取方法进行了优化。试验分别考察了超声提取 30、45、60 min 和回流提取 30、60 min 等提取方法, 根据考察结果, 超声提取 30 min 与回流提取 30、60 min 结果相近, 为节能增效, 最终采用超声处理 30 min 提取样品。本文还进一步考察比较了多个流动相系统(乙腈-磷酸溶液、乙腈-冰醋酸溶液、甲醇-磷酸溶液、甲醇-冰醋酸溶液)得到的色谱图, 结果显示乙腈-磷酸溶液系统所得色谱峰形态更好, 且分离度满足试验要求, 故确定为金丝桃苷含量测定流动相系统。

本研究建立了 HPLC 特征图谱和金丝桃苷含量测定方法, 特征图谱方法同时标定和指认了 19 批样品中的 12 个共有峰, 并明确了其药味归属。结果显示, 不同批次壮腰健肾丸样品间特征图谱化学成分基本一致, 但色谱峰高或峰面积存在一定差异。本研究以 HPLC 特征图谱和含量测定相结合, 通过对多批次壮腰健肾丸的定性鉴别和含量测定, 表明本法可较好控制其整体质量, 也为壮腰健肾丸的质量标准研究提供了新思路。

参考文献

[1] 蒋秋桃, 孙辉, 文庆. 健肾壮腰丸质量标准的研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(9): 59-61.
[2] 陶向辉, 薛丽霞, 刘纯. 壮腰健肾丸联合针刺治疗劳损性腰痛的临床观察及对外周血 Th1、Th2 细胞含量的影响[J]. 中国民间疗法, 2020, 28(14): 54-56.
[3] 吕银英. 壮腰健肾丸的药理研究[J]. 中药材, 1993, 16(9): 36-38.

[4] 李国驹, 许招懂, 刘袁芳, 等. 壮腰健肾丸抗氧化、抗衰老作用的基因芯片研究[J]. 中药材, 2009, 29(4): 365-367.
[5] 赵为民. 壮腰健肾丸对老年骨质疏松性腰椎压缩性骨折愈合的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2811-2812.
[6] 林培英, 潘竞锵, 何振宁. 壮腰健肾丸对免疫功能影响的实验研究[J]. 中成药研究, 1984, (4): 25-26.
[7] 刘学贵, 李佳骆, 高品一, 等. 药食两用金樱子的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 392-398.
[8] 舒永志, 成亮, 杨培明. 黑老虎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(4): 805-813.
[9] 滕婧, 梁敬钰, 陈莉. 鸡血藤的研究进展[J]. 海峡药学, 2015, 27(3): 1-6.
[10] 李开祥, 梁晓静, 覃平, 等. 桑寄生研究进展[J]. 广西林业科学, 2011, 40(4): 311-314.
[11] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 120, 200, 426, 751.
[12] 刘菊香, 范广璞, 刘长春, 等. 咖啡酸维生素 C 酯的合成、抑菌活性和抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 218-221.
[13] 苏俊锋, 郭长江, 韦京豫, 等. 槲皮素体内外抗氧化作用的比较研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2002, 18(4): 382-385.
[14] 石焱芳, 王瑞娜, 刘丹, 等. 福建黑老虎中总木脂素含量的测定[J]. 福建分析测试[J]. 2016, 25(4): 35-38.
[15] 朱树凡. 中药冷饭团对四氯化碳致大鼠试验性肝损伤的保护作用观察[J]. 中国现代医生, 2007, 45(10): 7-9.
[16] 杨毅, 张成路. 木脂素抗艾滋病病毒研究[J]. 化学进展, 2003, 15(4): 329.
[17] 倪术仁, 连去岚, 赵思俊, 等. 强力脑清素片 HPLC 指纹图谱的建立及质量标志物预测[J]. 中草药, 2021, 52(4): 1011-1019.
[18] 刘鹤, 贺丹彤, 邢春来, 等. 甘姜苓术汤 HPLC 指纹图谱及含量测定方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(1): 42-50.
[19] 江华娟, 李敏敏, 何瑶, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和化学模式识别的经典名方桃红四物汤制备过程质量评价研究[J]. 中草药, 2021, 52(4): 1000-1010.
[20] 王秀芹, 吕渭升, 林彤, 等. 壮腰健肾丸质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 11(6): 858-859.
[21] 胡伟杰, 符健, 汤小燕, 等. 壮腰健肾丸的质量标准研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(3): 332-334.
[22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 322.