

高效液相色谱法测定降脂强身片中何首乌含量

郝旭*

(萍乡市中医院制剂室, 萍乡 330777)

摘要:目的 建立准确测定降脂强身片中何首乌有效成分 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷含量的方法, 以提升药品质量控制水平。**方法** 采用高效液相色谱法(HPLC), 以Amethyst C₁₈柱为色谱柱, 乙腈-水(19:81)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 320 nm, 柱温 25°C。对使用的仪器进行了精确校准, 饮片和试剂均符合分析纯度要求, 并精心制备了对照品与供试品溶液。通过系统适用性试验、线性范围考察、精密度试验、重现性试验、稳定性试验和加样回收率试验等全面方法学考察。**结果** 该成分在 9.96~159.36 μ g/mL 范围内线性关系良好($r=0.99992$), 平均加样回收率为 94.64% (RSD%=1.16), RSD=0.71%。**结论** 本方法稳定、快速、简便、准确且具可重复性, 适用于降脂强身片中何首乌的含量测定, 为其质量控制提供可靠依据, 有助于保证药品质量和临床疗效。

关键词: 降脂强身片; 何首乌; 高效液相色谱法

0 引言

降脂强身片作为一种复方制剂, 在临床应用中用于降血脂、助消化, 对高脂血症、脂肪肝和单纯性肥胖症具有一定疗效^[1-3]。然而, 其现行质量标准缺乏含量测定项目, 难以全面把控药品质量^[4-5]。现行的质量标准主要存在的问题在于缺乏对何首乌有效成分含量的定量测定, 这限制了对药品质量的全面评估。例如, 中华人民共和国药典中对何首乌的描述主要集中在其性状、鉴别、检查和浸出物等方面^[6], 而对于其有效成分的具体含量测定则未作详细规定。这导致了在实际生产和质量控制中, 无法准确评估何首乌及其制剂中有效成分的含量, 从而影响了药品疗效的稳定性和可靠性。何首乌作为降脂强身片的重要组成部分, 其有效成分含量的测定对于保证药品质量和疗效至关重要^[7]。高效液相色谱法(HPLC)是一种高效率、高灵敏度的分析技术, 广泛应用于生物化学、临床医学、食品检验等领域。HPLC的分离原理基于样品中各组分在固定相和流动相之间的相互作用差异, 通过高效固定相及较高灵敏度检测器, 实现对复杂样品中分析物的高效分离和精确定量^[8]。在本研究中, HPLC法被用于测定降脂强身片中何首乌的含量, 其依据在于HPLC能够提供高分辨率的色谱图谱, 准确测定目标成分的浓度, 从而为药品质量控制提供科学依据。本研究旨在通过高效液相色谱法实现对降脂强身片中何首乌含量的精确测定, 为该制剂的质量控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

1.1.1 仪器

(1)高效液相色谱仪: 采用 Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包含 Agilent 1200 柱温箱、VWD 检测器以及 Agilent 1200 色谱工作站, 确保对样品中各成分的高效分离与准确检测。(2)天平: 上海天平仪器厂 FA-2004 型万分之一天平, 用于精确称量样品及对照品; 赛多利斯 CP225D 型十万分之一天平, 保证称量的高精度, 减少误差对实验结果的影响。(3)酸度计: 赛多利斯酸度计, 用于准确测量溶液的酸碱度, 为实验提供适宜的酸碱环境。(4)色谱柱: Amethyst C₁₈ 色谱柱(规格为 250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 其填料特性和尺寸有助于实现目标成分的良好分离。(5)超声仪: 用于样品处理过程中的超声提取操作, 促进有效成分的溶出(若实验中有该步骤)。

1.1.2 试剂

(1)对照品: 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品(含量 99.48%, 批号 PF160522-10), 购于进口公司, 作为含量测定的标准物质。(2)甲醇、乙腈: 均为 HPLC 级, 购于北京百灵威科技有限公司, 用于配制流动相和溶解样品等。(3)其他试剂: 本实验大部分用的试剂均为分析纯, 水为超纯水, 确保实验试剂的纯度符合要求, 减少杂质对实验的干扰。(4)饮片: 降脂强身片中的饮片如山楂(批号: 20042203)、决明

基金项目: 萍乡市科技计划项目: 降脂强身片中何首乌含量的分析(2022PY131)

* 通信作者: 郝旭, 工程师, 研究方向为药学研究。E-mail: 13006299367@163.com

子(批号: 20061105)、绞股蓝(批号: 19123010)、荷叶(批号: 20051801)、黄芪(批号: 20032310)、谷芽(批号: 20090306)、大黄(批号: 20060408)、何首乌(批号: 20061108)、麦芽(批号: 20061602)、鸡血藤(批号: 20070309), 均购自于河北华都药业有限公司; 南酸枣 100 g(地产收购), 保证实验材料的来源可靠且质量稳定。(5)空白溶剂: 如甲醇(用于制备空白溶剂对照溶液, 检查溶剂是否存在干扰)。

1.1.3 材料

(1)降脂强身片: 萍乡市中医院自制制剂降脂强身片若干批次, 作为实验研究对象, 用于含量测定及方法学验证。(2)其他耗材: 如具塞锥形瓶、微孔滤膜(用于过滤溶液, 去除杂质)、量瓶(精确配制不同浓度溶液)等, 均需符合实验要求的规格和质量标准, 确保实验操作的准确性和溶液配制的精度。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的制备

(1)精密称取适量的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品, 并将其置于棕色玻璃瓶或 HDPE 瓶中, 确保容器干燥、清洁且无反应性。容器外应标记对照品信息以便追溯^[9]。(2)使用甲醇作为溶剂, 通过逐步稀释和定容操作, 将对照品配制一系列浓度梯度的对照品溶液。例如, 配制 40 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液时, 需称取 40.2 μg (基于对照品纯度 99.48%)的对照品, 并用甲醇定容至 1 mL。配制后, 充分混合以确保对照品完全溶解, 浓度均匀。(3)充分摇匀溶液, 确保对照品完全溶解且浓度均匀, 转移至适宜的储存容器中, 如容量瓶, 并密封保存, 标注好溶液名称、浓度和配制日期等信息, 备用。(4)配制过程中需注意操作的准确性, 如使用精密天平称取对照品, 准确量取溶剂体积, 避免溶液浓度出现偏差, 影响后续实验结果的准确性。(5)在储存过程中, 需将对照品溶液放置在适宜的环境条件下, 如避光、低温等, 防止对照品分解或浓度发生变化。

1.2.2 供试品溶液的制备

(1)取 20 片降脂强身片作为起始材料, 这个数量可以根据实际样品的重量和所需的提取效率进行调整。(2)称取相当于 5 片降脂强身片重量的细粉。如果单片重量已知, 可以直接计算出需要称取的粉末量^[10]。例如, 如果一片降脂强身片的重量是 0.5 g, 那么 5 片的重量就是 2.5 g。(3)向锥形瓶中加入 25 mL 甲醇作为提取溶剂。这个体积可以根据样品的重量和预期的提取效率进行调整, 以确保有效成分可以充分溶解。(4)将样品置于加热回流装置上, 加热回流 1 小时。这个时间可以根据实验目的和样品特性进行调整, 以确保有效成分的充分提取。(5)回流结束后, 让锥形瓶自然冷却至室温。如果由于蒸发导致溶剂损失, 需要用甲醇补足至原始体积(25 mL), 以确保溶液的浓度不会因溶剂损失而发生变化。使用微孔滤膜过滤溶液, 以去除可能存在的不溶性颗粒。滤膜的孔径应根据实验

要求选择合适的规格, 常见的孔径有 0.22 μm 或 0.45 μm 。将滤液转移至干净的容器中, 密封并标记, 以备后续的 HPLC 分析使用。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: 选用 Amethyst C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 安装在高效液相色谱仪上, 确保色谱柱安装正确且紧密连接, 避免出现漏液等情况。(2)流动相: 以乙腈-水(19:81)为流动相, 使用前需对流动相进行超声脱气处理, 去除其中的气泡, 防止气泡进入色谱系统影响检测结果。分别准确量取乙腈和水, 按照比例混合均匀, 通过 0.22 μm 滤膜过滤后, 装入流动相储液瓶中, 备用。

1.2.4 样品测定

(1)根据对照品溶液的浓度、峰面积以及供试品溶液的峰面积, 通过外标法计算供试品中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量。例如, 当对照品溶液浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 其峰面积为 800, 供试品溶液峰面积为 600 时, 经外标法计算, 供试品中该成分含量约为 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2)由于何首乌中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量相对稳定, 可根据测定出的该成分含量, 结合已知的比例关系, 间接推算出何首乌在降脂强身片中的含量。例如, 已知何首乌中该成分的平均含量为 2%, 当测得降脂强身片中该成分含量为 5 mg 时, 则可计算出何首乌的含量约为 250 mg。

(3)对多个批号样品的测定结果进行统计分析, 如计算平均值、相对标准偏差(RSD)等, 评估样品中目标成分含量的一致性和稳定性。对 5 个不同批号的降脂强身片样品进行测定, 测得的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷含量分别为 38、40、39、41、37 $\mu\text{g/mL}$ 。计算其平均值为 39 $\mu\text{g/mL}$ 。通过公式计算相对标准偏差(RSD), 以此来评估数据的离散程度, 判断含量的稳定性。若发现含量异常波动或超出合理范围, 需进一步检查样品质量、实验操作等环节, 确保测定结果准确可靠。

(4)根据测定结果, 结合药品质量标准和临床应用要求, 对降脂强身片的质量进行评价, 为其质量控制提供依据。同时, 可对不同批次样品的含量差异进行分析, 探讨可能影响含量的因素, 如原料来源、生产工艺等, 为优化生产工艺和保证药品质量提供参考。例如, 若发现某一批次样品中何首乌含量明显低于其他批次, 且该批次原料来源于新的供应商, 可进一步研究原料来源与含量差异之间的关系, 从而针对性地优化生产工艺或选择更优质的原料。

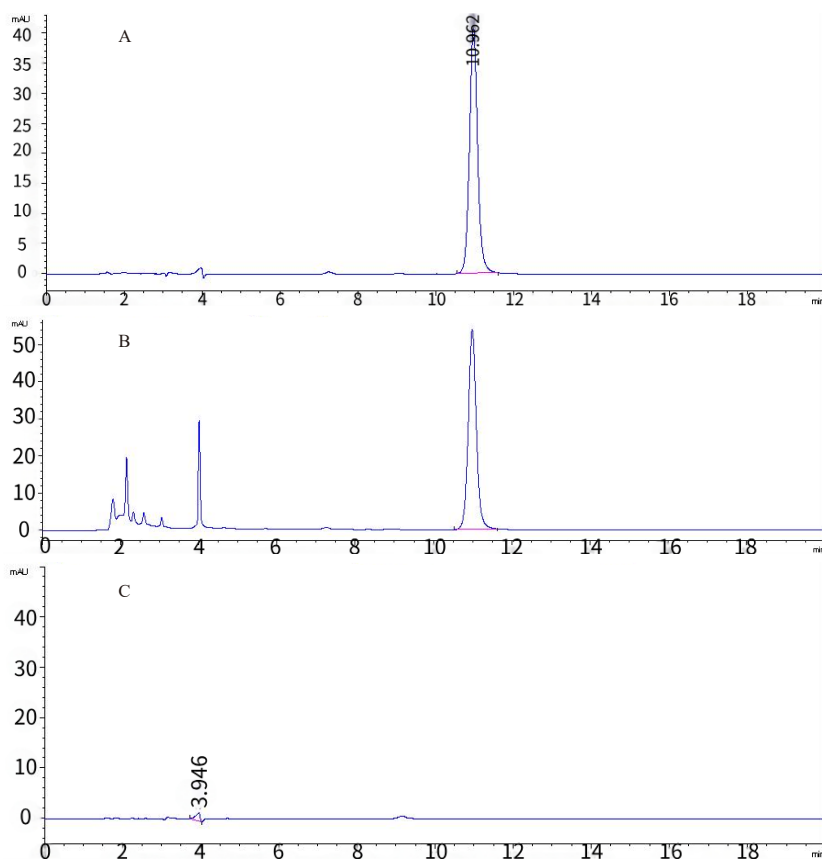
2 结果与分析

2.1 方法学考察

(1)系统适用性试验: 在方法学考察中, 系统适用性试验、精密度试验、重现性试验和稳定性试验均采用 40 $\mu\text{g/mL}$ 的对照

品溶液作为测试样本。这个浓度位于 9.96~159.36 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内，确保了实验数据的可靠性和方法的有效性。供试品溶液的浓度则根据实际样品中何首乌的含量确定，以保证实验结

果的准确性。空白溶剂使用纯甲醇。通过这些试验，可以全面评估 HPLC 方法的性能，包括系统适用性、精密度、重现性和稳定性(见图 1)。



注：图 A 为对照品 HPLC 图；图 B 为样品 HPLC 图；图 C 为空白溶剂对照 HPLC 图

图 1 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品和降脂强身片样品 HPLC 图

(2)线性范围考察：精密称取适量对照品配成储备液，再逐级稀释得系列浓度标准溶液(浓度分别为 9.96、19.92、39.84、79.68、159.36 $\mu\text{g/mL}$)。分别进样 5 μL ，测定峰面积。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘图并线性回归，得回归方程： $Y=15.45808X-12.98958$ ， $r=0.99992$ 。结果表明在 9.96~159.36 $\mu\text{g/mL}$ 内线性良好。

(3)精密度试验：精密吸取同一对照品溶液 5 μL ，重复进样 6 次。每次进样后记录峰面积，计算 RSD。结果显示该方法精密度高，峰面积 RSD 为 0.13%，表明仪器稳定性好，实验数据可靠，可用于准确测定(见表 1)。

(4)重现性试验：取同一批号样品 6 份制备供试液，分别测定含量并计算 RSD。该试验考察方法在不同操作下的重复性，RSD 为 1.47%，表明方法重现性良好(见表 2)。

(5)稳定性试验：取供试品溶液室温放置，于 0~12 h 内不同时间分别进样 5 μL 测定。计算峰面积 RSD，结果为 0.71%，表明供试品溶液在室温 12 小时内稳定，实验过程中溶液浓度变化小，数据可靠，见下图 2。

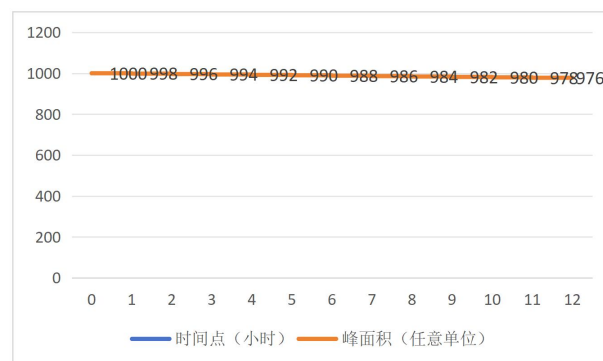


图 2 稳定性试验

(6)加样回收率试验：选取 2 片磨碎的降脂强身片样品，含量(0.295 mg/片)，置入具塞锥形瓶中，分别加入适量的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照储备液，按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液，按色谱条件测定含量，计算加样回收率($n=6$)，结果表明 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的平均回收率为 94.64%(RSD%=1.16)，符合方法学要求(见表 3)。

表1 精密度试验结果

序号	1	2	3	4	5	6	RSD(%)
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	596.17	597.04	596.99	598.36	597.39	597.83	0.13

表2 重现性试验结果

序号	1	2	3	4	5	6	RSD(%)
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	0.291	0.291	0.280	0.292	0.288	0.289	1.47

表3 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷加样回收率试验结果

样品(g)	样品中的含量(mg)	对照品加入量(mg)	实测得的量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.7539	0.74	0.45	1.16	93.85%		
0.7516	0.74	0.45	1.16	94.35%		
0.7533	0.74	0.45	1.18	96.76%		
0.7536	0.74	0.45	1.16	93.92%	94.64%	1.16%
0.7546	0.74	0.45	1.17	94.25%		
0.7536	0.74	0.45	1.17	95.03%		

3 讨论与结论

本研究采用高效液相色谱法(HPLC)对降脂强身片中何首乌的含量进行了精确测定,旨在为该制剂的质量控制提供科学依据。

首先通过线性范围的评估,确定了2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的线性范围,结果显示该成分与峰面积之间存在着良好的线性关系($r=0.99992$),这表明HPLC方法在该浓度范围内是可靠的。通过加样回收率法,评估了方法的准确性。结果显示加样回收率远低于1.5%,证明了方法具有较高的精确性和可靠性。

质量控制的科学依据:研究结果表明,HPLC方法不仅具有良好的线性范围,而且能够准确测定何首乌的含量,这对于降脂强身片的质量控制至关重要。通过确保制剂中有效成分的稳定含量,可以保证药品的疗效和安全性。

临床研究和质量监控的应用:基于研究成果,建议在后续的临床研究和质量监控中广泛应用此HPLC检测方法。这不仅有助于药品的安全性评价,还能推动药品标准化建设,确保患者能够获得质量一致、疗效可靠的治疗。

本方法稳定、快速、简便、准确且具可重复性,适用于降脂强身片中何首乌有效成分(何首乌苷)的含量测定,通过该成分含量能有效关联评估何首乌的含量,为其质量控制提供可靠依据,有助于保证药品质量和临床疗效。

参考文献

[1] 崔宇擎,张华伟,王喜生,等.5-HMF高效液相色谱检测方法的

建立及功能糖与不同产地党参、何首乌和熟地中5-HMF含量分析[J].中兽医医药杂志,2024,43(01):13-17.

[2] 刘野,武俊颖,贺奥城,等.基于UPLC-MS分析技术测定不同产区制何首乌饮片中8个化学成分的含量[J].中草药,2023,21(06):1634-1639.

[3] 罗玲,唐文婷,易睿,等.何首乌对高血脂小鼠的降脂作用及转录组学研究[J].特产研究,2023,45(06):116-123.

[4] 李妍怡,王莹,张南平,等.基于UPLC-MS/MS分析不同采收期对何首乌蒽醌含量的影响[J].中国药物警戒,2022,19(12):1277-1284.

[5] 王莹,辜冬琳,范晶,等.九蒸九晒炮制过程何首乌中5-羟甲基糠醛和二苯乙烯苷含量变化分析[J].中国药物警戒,2022,19(12):1291-1294,1308.

[6] 杨建波,汪祺,高慧宇,等.何首乌及首乌藤中二蒽酮类成分研究进展[J].中国现代中药,2022,24(08):1431-1436.

[7] 王雪婷,杨建波,高慧宇,等.HPLC法测定不同产地生何首乌和不同炮制工艺制何首乌中顺(反)式二苯乙烯苷含量[J].中国药物警戒,2023,20(04):383-387.

[8] 陈薇娜,冯霞,陈丹丹,等.基于高效液相色谱-一测多评法联合化学计量学的决明降脂片综合质量评价[J].中国药物应用与监测,2022,19(02):83-87.

[9] 郑巍,倪东杰,韦庆,等.高效液相色谱法测定降脂护肝胶囊中葛根素的含量[J].药学实践杂志,2017,35(03):259-261.

[10] 王焱.高效液相色谱法同时测定制何首乌中多种活性成分[J].亚太传统医药,2016,12(19):45-47.