

# 补肾强身胶囊中 4 种黄酮苷类成分的含量测定及转移率研究

张崇生, 倪赞\*, 叶建晨, 张鹏程(温州市食品药品检验科学研究院, 浙江 温州 325008)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 同时测定补肾强身胶囊中 4 种黄酮苷类成分朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的方法, 并考察淫羊藿苷在工艺过程中的转移率。方法 采用 50%乙醇超声提取, Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离, 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 检测波长为 270 nm。结果 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷在相应浓度范围内呈良好线性关系( $r \geq 0.999$ ), 平均加样回收率分别为 104.2%, 103.2%, 105.3%和 103.7%, RSDs 分别为 1.4%, 1.9%, 0.9%和 1.6%。9 批自制药中淫羊藿苷平均转移率为 56.04%, 计算确定补肾强身胶囊中淫羊藿苷含量限度应  $\geq 0.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 11 个生产企业 45 批样品中有 12 批样品低于此限度, 占比 26.7%。结论 本方法重复性好, 专属性强, 简便易行, 可用于补肾强身胶囊中淫羊藿的质量评价和转移率考察。

**关键词:** 补肾强身胶囊; 高效液相色谱法; 淫羊藿; 黄酮苷; 转移率; 质量评价

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)11-1345-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.11.011

引用本文: 张崇生, 倪赞, 叶建晨, 等. 补肾强身胶囊中 4 种黄酮苷类成分的含量测定及转移率研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1345-1348.

## Determination of Four Flavonoid Glycosides in Bushen Qiangshen Capsules and Study on Transfer Rate

ZHANG Chongsheng, NI Zan\*, YE Jianchen, ZHANG Pengcheng(Wenzhou Institute for Food and Drug Control, Wenzhou 325008, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine 4 flavonoid glycosides of epimedin A, epimedin B, epimedin C, and icariin in Bushen Qiangshen capsules by HPLC, and investigate the transfer rate of icariin from Epimedii Folium. **METHODS** After ultrasonic extracted by 50% ethanol, the sample was separated on an Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with the gradient elution. The mobile phase consisted of acetonitrile and water, with a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was set at 40 °C, and the wavelength was set at 270 nm. **RESULTS** Good linear relationships of epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin were obtained with correlation coefficients  $\geq 0.999$ . The average recoveries were 104.2%, 103.2%, 105.3% and 103.7%, and RSDs were 1.4%, 1.9%, 0.9% and 1.6%, respectively. The content limit of icariin was determined  $\geq 0.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , with the average transfer rate of icariin from 9 batches of self-made samples as 56.04%. Among 45 batches of samples from 11 manufacturers, 12 batches were below the limit, indicative of a rate of 26.7%. **CONCLUSION** The method has good reproducibility and strong specificity, which is simple and easy, and can be used to inspect the transfer rate of icariin in the preparation process and improve the quality control.

**KEYWORDS:** Bushen Qiangshen capsules; HPLC; Epimedii Folium; flavonoid glycosides; transfer rate; quality control

补肾强身胶囊是由明代张时彻《摄生众妙方》中五子衍宗丸演化而来, 取淫羊藿、金樱子、菟丝子、酒女贞子和烫狗脊 5 味药材组方<sup>[1]</sup>, 具有补肾强身的功效, 临床上主要用于治疗腰酸足软, 头晕耳鸣, 眼花心悸, 阳痿遗精<sup>[2]</sup>。

补肾强身胶囊作为 OTC 乙类中成药, 全国共有 49 家企业生产, 现行标准有收载于卫生部药品标准中药成方制剂第四册的 WS<sub>3</sub>-B-0751-91 和企业注册零散标准(W<sub>S</sub><sub>3</sub>-B-0751-91-1~5), 其中 44 家企业执行 WS<sub>3</sub>-B-0751-91 标准。这些标准均过于

简单, 仅有性状和胶囊剂常规检查, 对主要成分缺乏含量控制, 导致生产中投料药材质量参差不齐, 掺伪和以次充好情况不时出现, 药品效果无法得到保障。2015 年至今, 该品种已有 3 次药品质量不合格公告。因此本研究以补肾强身胶囊中君药-淫羊藿为对象, 通过测定朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷 4 种黄酮类指标成分含量<sup>[3-4]</sup>, 计算药材和成药间有效成分的转移率, 评估成药投料情况, 为标准提升、药材选用及工艺优化提供依据。

基金项目: 2020 年温州市基础性科研项目(Y2020193)

作者简介: 张崇生, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0577)88536561  
药师 Tel: (0577)88520350 E-mail: ni\_zan@163.com

E-mail: 1018763742@qq.com \*通信作者: 倪赞, 男, 硕士, 副主任

## 1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司); XS205DU 十万分之一分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); SB-5200D 超声波清洗器(宁波新芝生物股份有限公司); TGL-16C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); Milli-Q Integral 5 超纯水器(德国密理博公司)。

对照品淫羊藿苷(批号: 110737-201516; 纯度: 94.2%)、朝藿定 C(批号: 111780-201804; 纯度: 92.6%)均购自中国食品药品检定研究院; 对照品朝藿定 A(批号: MUST-18072304; 纯度: 98.13%)、朝藿定 B(批号: MUST-18071403; 纯度: 99.23%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司。试剂乙腈(德国 Merck 公司)为色谱纯, 其余试剂均为国产分析纯, 水由密理博公司超纯水器制得。

本研究共收集了 9 批淫羊藿, 来源于饮片公司和当地药材市场, 遍及甘肃、内蒙古、陕西、宁夏、浙江、广东、安徽、河南和湖北等十余个产地, 经温州市食品药品检验科学研究院叶建晨副主任中药师鉴定均为药典规定品种。45 批补肾强身胶囊样品主要来源为 2019 年浙江省药品质量风险考核项目抽样, 部分通过互联网购买, 涉及 11 家生产企业, 分布于吉林、四川、贵州、黑龙江、江西、陕西、上海、云南和浙江。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相: A 为乙腈, B 为水。梯度洗脱: 0~20 min, 15%→25%A; 20~45 min, 25%A; 45~47 min, 25%→50%A; 47~50 min, 50%A; 50~60 min, 15%A。柱温: 40 °C; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 270 nm; 进样量: 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷对照品各 20 mg, 用甲醇配制成浓度水平为 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的单一对照品储备液, -20 °C 避光保存。精密量取上述单一对照品储备液各 5 mL, 混匀作为混合对照品储备液 S<sub>储</sub>(250 μg·mL<sup>-1</sup>)。取 S<sub>储</sub>, 用甲醇分别配制 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100 和 150 μg·mL<sup>-1</sup> 的系列浓度水平的混合对照品溶液 S<sub>1</sub>~S<sub>6</sub>(按浓度由低到高顺序编号)。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取供试品内容物约 0.5 g, 加 50%乙醇 50 mL(低浓度样品减少稀释体

积), 超声处理(250 W, 40 kHz) 30 min, 离心取上清, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液。

**2.2.3 自制成药和阴性样品溶液的制备** 按补肾强身胶囊处方比例及制备工艺, 取淫羊藿 45 g、金樱子 27 g、菟丝子 27 g, 置 3 L 锥形瓶中, 分别加水 800, 600 mL, 煎煮 2 次, 第 1 次 4 h, 第 2 次 3 h, 合并煎液, 六号筛滤过, 静置过夜, 取上清液, 70 °C 减压浓缩至总重 36~40 g 的清膏, 取酒女贞子细粉 27 g、烫狗脊细粉 27 g, 过五号筛, 与上述清膏拌匀, 60 °C 干燥至 60 g, 粉碎, 过五号筛, 即得。收集的 9 批淫羊藿药材, 加上金樱子、菟丝子、酒女贞子和烫狗脊 4 味药材, 共制备成序号为 1~9 自制补肾强身胶囊(简称自制成药)。同时按上述方法制备缺淫羊藿阴性样品, 按“2.2.2”项下方法分别制备相应供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 系统适用性试验** 取“2.2”项下混合对照品溶液 S<sub>6</sub>、供试品溶液和阴性样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果见图 1。朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷色谱峰与相邻峰均能达到有效分离, 分离度均>1.5, 理论板数均>3 000, 阴性样品对目标成分的测定无干扰。

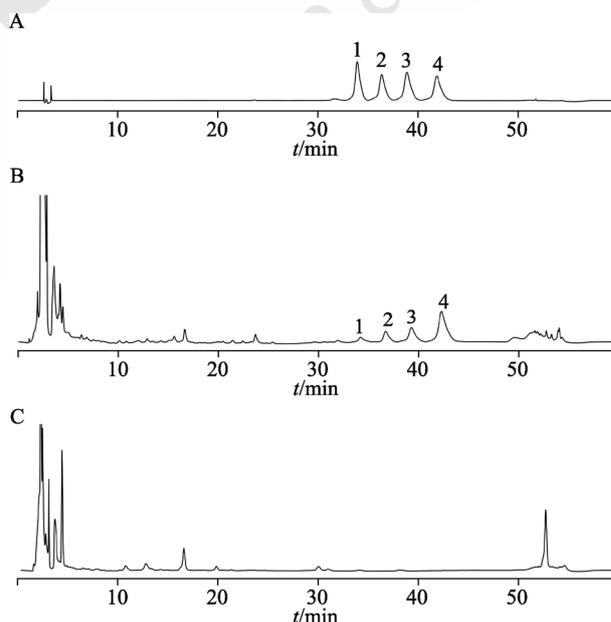


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-供试品; C-阴性样品; 1-朝藿定 A; 2-朝藿定 B; 3-朝藿定 C; 4-淫羊藿苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference substances; B-sample; C-negative sample; 1-epimedin A; 2-epimedin B; 3-epimedin C; 4-icariin.

**2.3.2 标准曲线和线性范围** 取“2.2.1”项下混合对照品溶液 S<sub>1</sub>~S<sub>6</sub> 和 S<sub>储</sub>, 按“2.1”项下色谱条

件测定,以峰面积值  $Y$  对质量浓度  $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$  进行线性回归,各化合物的线性范围、回归方程和相关系数见表 1。

**2.3.3 检测限考察** 取“2.2.1”项下  $S_{\text{储}}$ ,用甲醇逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件测定,分别以信噪比  $S/N \geq 3$  和  $S/N \geq 10$  确定检测限和定量限,结果见表 1。

**表 1** 4 种黄酮苷类成分线性范围、回归方程、相关系数( $r$ )、检测限和定量限

**Tab. 1** Linear range, regression equation, correlation coefficient( $r$ ), detection limit and quantitative limit for 4 flavonoid glycosides

成分	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归方程	$r$	检测限/定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
朝藿定 A	6.70~269.2	$Y=2.2828 \times 10^4 X - 121878$	0.9990	0.204 0.527
朝藿定 B	5.70~227.0	$Y=1.0423 \times 10^4 X - 34481.9$	0.9995	0.182 0.436
朝藿定 C	6.20~247.7	$Y=1.5309 \times 10^4 X - 50143.6$	0.9998	0.197 0.611
淫羊藿苷	5.20~207.6	$Y=1.4607 \times 10^4 X - 52599.0$	0.9999	0.167 0.416

**2.3.4 仪器精密度试验** 取“2.2.1”项下  $S_4$  混合对照品溶液  $10 \mu\text{L}$ ,按“2.1”项下色谱条件测定,连续测定 6 次,计算朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的峰面积 RSD,结果分别为 0.97%, 0.85%, 0.53% 和 0.22%,表明仪器精密度良好。

**2.3.5 重复性试验** 取表 2 中序号 32 的补肾强身胶囊内容物细粉,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定。朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的 RSD 分别为 2.0%, 1.8%, 1.5% 和 0.6%,表明方法重复性良好。

**2.3.6 稳定性试验** 取“2.3.5”项下同一供试品溶液,分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样,计算朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 2.0%, 0.6% 和 0.8%,表明供试品溶液 24 h 内稳定。

**2.3.7 加样回收率试验** 取“2.3.5”项下同一补肾强身胶囊内容物细粉,精密称取  $0.25 \text{ g}$ ,共 6 份,分别精密加入  $S_{\text{储}} 5 \text{ mL}$ ,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定。计算朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的平均加样回收率分别为 104.2%, 103.2%, 105.3% 和 103.7%,RSD 分别为 1.4%, 1.9%, 0.9% 和 1.6%,表明回收率良好。

## 2.4 样品含量测定

取 45 批样品按“2.2.2”项下方法平行制备 3

份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果见表 2。结果显示 45 批样品中,7 批未检出上述 4 种黄酮类成分,6 批检出 4 种黄酮类成分,其余 32 批部分检出,其中淫羊藿苷含量为  $0.502 \sim 5.556 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,检出率为 80%,因此选取淫羊藿苷作为淫羊藿药材到成药转移率计算的指标成分。

**表 2** 补肾强身胶囊中 4 种黄酮苷类成分含量测定结果( $n=3$ )  
**Tab. 2** Content determination results of 4 flavonoid glycosides in Bushen Qiangshen capsules( $n=3$ )  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

序号	产地	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	黄酮苷类成分总量
1	甘肃	-	0.998	-	1.198	2.196
2	甘肃	-	1.003	-	1.204	2.208
3	甘肃	-	0.999	-	1.199	2.198
4	甘肃	-	-	1.277	-	1.277
5	四川	-	-	-	-	-
6	甘肃	-	-	-	-	-
7	甘肃	-	-	-	2.285	2.285
8	陕西	-	-	1.085	-	1.085
9	四川	-	0.493	-	1.381	1.874
10	贵州	-	-	-	1.316	1.316
11	贵州	-	-	-	1.084	1.084
12	四川	-	-	1.457	1.068	2.525
13	四川	-	0.603	-	1.406	2.009
14	山西	-	-	-	-	-
15	贵州	-	-	-	1.386	1.386
16	四川	-	0.599	-	1.399	1.998
17	贵州	-	-	-	1.351	1.351
18	甘肃	-	-	1.188	0.792	1.980
19	四川	-	0.597	-	1.492	2.088
20	贵州	-	-	-	1.398	1.398
21	四川	-	0.674	-	1.444	2.118
22	甘肃	-	-	-	2.511	2.511
23	甘肃	-	-	1.087	0.692	1.778
24	甘肃	0.889	1.087	0.889	4.051	6.917
25	山西	-	-	-	-	-
26	山西	-	-	-	-	-
27	四川	-	0.506	-	1.416	1.922
28	贵州	-	0.693	-	0.990	1.683
29	甘肃	0.598	0.697	-	1.992	3.287
30	甘肃	0.599	0.999	1.498	2.996	6.093
31	甘肃	0.692	0.791	0.989	2.671	5.143
32	甘肃	0.503	0.906	1.208	2.114	4.730
33	甘肃	0.794	1.885	2.381	5.556	10.615
34	贵州	-	0.601	1.102	1.002	2.705
35	贵州	-	-	-	1.378	1.378
36	四川	-	0.490	-	1.471	1.961
37	四川	-	0.404	-	1.414	1.819
38	四川	-	0.392	-	1.371	1.763
39	吉林	-	-	-	-	-
40	甘肃	-	-	1.405	0.502	1.906
41	贵州	-	-	-	0.790	0.790
42	贵州	-	-	-	0.598	0.598
43	四川	-	0.498	-	1.595	2.093
44	贵州	-	-	-	1.558	1.558
45	吉林	-	-	-	-	-

注:“-”-低于定量限。

Note:“-”-less than LOD.

## 2.5 淫羊藿药材到成药的转移率

取“2.2.3”项下 9 批自制成药与相应的淫羊藿药材,按“2.2.2”项下方法各平行制备 3 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果见表 3。9 批自制成药中淫羊藿苷转移率为 32.83%~74.41%,平均转移率为 56.04%,标准偏差为 15.78%。

表 3 淫羊藿药材到成药的转移率( $n=3$ )

Tab. 3 Transfer rate of icariin from *Epimedii Folium* to *Bushen Qiangshen* capsules( $n=3$ )

序号	淫羊藿/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	自制成药/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	转移率/%
1	3.735	2.085	74.41
2	5.115	1.422	37.08
3	4.837	2.661	73.35
4	7.004	2.173	41.36
5	6.148	2.695	58.44
6	5.929	2.492	56.04
7	5.573	2.959	70.80
8	6.985	1.720	32.83
9	5.335	2.404	60.09

## 3 分析与讨论

### 3.1 补肾强身胶囊中淫羊藿的质量控制

中国药典 2015 年版对淫羊藿药材的规定:水分不得过 12.0%<sup>[5]</sup>;按干燥品计算,含淫羊藿苷不得少于 0.50%。处方中淫羊藿投料 225 g,制得成药 300 g,以  $X-2SD=24.48\%$  为转移率,确定补肾强身胶囊中淫羊藿苷含量限度不得少于 0.73  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。11 个生产企业 45 批样品中有 5 家生产企业的 12 批淫羊藿苷含量低于限度,占比 26.7%。调研结果表明,一家生产企业有 3 批成药使用同一批次淫羊藿,其中一批淫羊藿苷含量远低于另外 2 批,推测投料、煎煮和贮藏等环节存在较大问题<sup>[6]</sup>,譬如无全草投料;淫羊藿茎占比过高;煎煮过程中水分损失过多;药材存放过久,淫羊藿苷含量降低所致。另外 4 家生产企业都使用贵州产地淫羊藿,成药中淫羊藿苷含量较低,而从表 2 可知,使用甘肃产地淫羊藿投料的成药,淫羊藿苷含量远高于其他批次,揭示补肾强身胶囊中淫羊藿苷含量可能与产地密切相关。

### 3.2 淫羊藿产地分析

45 批补肾强身胶囊原药材淫羊藿产地见表 2,以黄酮类成分总量为因变量,产地为自变量,由于产地属于分类变量,黄酮类成分总量属于连续

性的变量,采用 IBM SPSS 21.0 进行 Spearman 相关性分析<sup>[7]</sup>,结果表明,淫羊藿中黄酮类成分总量与甘肃产地显著相关( $P<0.05$ ),这与调研过程中,生产企业普遍反映甘肃产地淫羊藿质量最佳,价格最高的情况相符合,贵州、吉林和山西所产的淫羊藿质量较差,一定程度上揭示了淫羊藿药材的道地性。

### 3.3 讨论

补肾强身胶囊是人民群众认知度较高的中药成方制剂,质量尤为关键。本研究对市场上 11 个生产企业 45 批样品检测结果表明,生产企业淫羊藿药材的投料情况令人堪忧,建议相关部门尽快完善补肾强身胶囊质量标准,增加淫羊藿的检测项目,加强对淫羊藿投料的监管,杜绝投料不足或掺伪掺杂,尽量采用道地药材,改进生产工艺,如淫羊藿比较蓬松,在煎煮时注意水位,提高有效成分提取率,以规范市场,保障民众用药的安全性和有效性。本研究建立的 HPLC 重复性好,专属性强,简单方便,可用于补肾强身胶囊中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的定性鉴别和定量测定。

## REFERENCES

- [1] HUANG Y G, GU X X, ZHANG D Z, et al. The man's health precious—"Panlongpai Bushenqiangshen capsule"[J]. *Chin Med Mod Distance Educ China*(中国中医药现代远程教育), 2008, 6(10): 1220-1221.
- [2] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂(第四册)[S]. 1991: 87.
- [3] WU W K. Determination of icariin, epimedin C and specnuezhenide in *BushenQiangshen* capsule[J]. *Pharm Today*(今日药学), 2017, 27(6): 388-389, 403.
- [4] ZHAO Y D, CHEN S F, WANG Y D, et al. Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai[J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 796-806.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2015: 327-328.
- [6] XU W F, HE S Z, WANG Y Y, et al. Influence of processing and storage on contents of icariin and total flavonoids of *Epimedii Folium*[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2012, 34(8): 1556-1559.
- [7] WARRENS M J. Transforming intraclass correlation coefficients with the Spearman-Brown formula[J]. *J Clin Epidemiol*, 2017(85): 14-16.

收稿日期: 2020-11-16

(本文责编: 曹粤锋)