

高效液相色谱法测定大黄灵脾颗粒中淫羊藿苷的含量

丁丽玉¹, 王浣清¹, 王瀛峰², 陈群力³, 吴飞^{2*}, 须冰^{4*}

¹上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科, 上海 200437; ²上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程研究中心 上海 201203; ³上海健康医学院药学院, 上海 201318; ⁴上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肾内科, 上海 200437

摘要: 建立大黄灵脾颗粒中淫羊藿苷含量的 HPLC 测定方法。取 2.0 g 样品, 以 25 mL 50% 乙醇超声提取 30 min, 过滤后测定。采用 Apollo C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (28: 72) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 270 nm。淫羊藿苷线性范围为 0.03836 ~ 7.672 μg, 回归方程是 $Y = 1271 X + 31.68$ ($r = 0.9998$), 精密性、稳定性和重复性试验 RSD 均小于 1.0%, 低、中、高浓度平均加样回收率分别为 98.63%、98.95% 和 97.86%, RSD 分别为 2.0%、0.5% 和 3.2% ($n = 3$)。该方法简便, 快速, 重复性好; 可用于大黄灵脾颗粒的质量控制。

关键词: 大黄灵脾颗粒; 淫羊藿苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.019

Determination of Icarin in Dahuanglingpi Granule by High Performance Liquid Chromatography

DING Li-yu¹, WANG Huan-qing¹, WANG Ying-feng², CHEN Qun-li³, WU Fei^{2*}, XU Bing^{4*}

¹Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Integrative Chinese and Western Medicine

Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437, China; ² Shanghai

University of Traditional Chinese Medicine Engineering Research Center of Modern Preparation Technology

of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai, 201203, China; ³ College of pharmacy Shanghai University of

Medicine and Health sciences, Shanghai, 201318, China; ⁴ Department of Nephrology, Yueyang Hospital of Integrative Chinese and Western

Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437, China

Abstract: To establish a HPLC method for the determination of icaritin in Dahuanglingpi granule. 2.0 g sample was ultrasonically extracted for 30 minutes in 25 mL 50% ethanol and determined after filtration. The separation was performed on an Apollo C₁₈ analytical column (4.6 × 250 mm, 5.0 μm) with mobile phase consisting of acetonitrile-water (28: 72) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 270 nm and the column temperature was kept at 30 °C. The linear range of icaritin was 0.03836-7.672 μg, the regression equation was $Y = 1271X + 31.68$ ($r = 0.9998$) and the recovery at 80%, 100% and 120% concentration level was 98.63%, 98.95% and 97.86% (RSD was 2.0%, 0.5% and 3.2%, respectively, $n = 3$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were less than 1.0%. The developed HPLC method was accurate, simple and suitable for the determination of icaritin in Dahuanglingpi granule.

Key words: Dahuanglingpi granule; icaritin; high performance liquid chromatography

大黄灵脾颗粒是上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院的院内制剂, 来源于临床经典方大黄灵脾汤, 功能扶正降浊, 用于治疗慢性肾功能衰竭^[1-3], 也可以有效抑制慢性肾功能衰竭对听力的损

害^[4,5]。处方由淫羊藿、太子参、制大黄、丹参、淡附片等 10 味药组成, 方中淫羊藿、太子参和制大黄为君药。

在原有的质量标准中^[6], 大黄灵脾颗粒主要通过大黄素的 TLC 鉴别试验来实施化学成分的质量控制, 已经不能满足当前的质量控制要求。本研究建立制剂中君药淫羊藿的指标性成分淫羊藿苷含量的高效液相色谱分析法, 提高其质量控制的标准。

收稿日期: 2014-11-01 接受日期: 2015-03-17

基金项目: 上海市科委自然科学基金 (11DZ1972003); 上海优秀青年教师扶助基金 (B010310009)

* 通讯作者 Tel: 86-21-51322491; E-mail: a1983d3891h@126.com

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,含四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器和 Agilent ChemStation 色谱工作站(美国安捷伦公司);Milli-Q 型超纯水制备仪(密理博中国有限公司);XP 205 分析天平(0.01 mg,梅特勒-托利多仪器有限公司);FA2104N 分析天平(0.1 mg,上海精密科学仪器有限公司);HWS-26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);SK5200 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

淫羊藿对照品(批号:110737-200415,中国食品药品检定研究院);乙腈(色谱纯,上海星可生化有限公司);水(自制超纯水);其余试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

大黄灵脾颗粒(批号 120416、120522 和 130829,上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院提供)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液配制

取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 0.3836 mg/mL 的对照品溶液母液。精密吸取对照品溶液母液适量,加入甲醇稀释,制成浓度为 38.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

2.2 供试品处理方法的考察及结果

表 1 样品前处理方法考察

Table 1 Investigation of different sample pretreatment methods

提取溶剂 Extraction solvent	考察组别 Group								
	W	25% E	50% E	75% E	100% E	25% M	50% M	75% M	M
淫羊藿苷含量 Icariin content (mg/g)	0.330	0.428	0.468	0.450	0.061	0.382	0.461	0.462	0.163
提取方法及时间 Extraction method and time (min)	UE 15	UE 30	UE 45	RE 30	RE 60	RE 90			
淫羊藿苷含量 Icariin content (mg/g)	0.434	0.439	0.435	0.433	0.439	0.434			

注:W(水),M(甲醇),E(乙醇),UE(超声提取),RE(回流提取)。

Note: W(water), M(methanol), E(ethanol), UE(ultrasonic extraction), RE(reflux extraction).

2.2.4 供试品处理方法

根据以上实验结果,确定大黄灵脾颗粒中淫羊藿苷含量测定的前处理方法为:取大黄灵脾颗粒约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 25 mL,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用 50% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即

2.2.1 提取溶剂的考察

取大黄灵脾颗粒(批号 130829,以下用于前处理和方法学考察的样品均相同)2.0 g,精密称定,分别用 25 mL 纯水、25% 甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇、甲醇、25% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、无水乙醇等 9 种溶剂,超声提取 30 min,以提取溶剂补足失重,微孔滤膜过滤后 HPLC 测定淫羊藿苷,计算含量并比较,结果见表 1。

实验结果表明,与其他溶剂相比,50% 乙醇作为提取溶剂时,颗粒中淫羊藿苷的提取效率最高,选择 50% 乙醇作为提取溶剂。

2.2.2 提取方法的考察

取大黄灵脾颗粒 2.0 g,精密称定,分别用 25 mL 50% 乙醇超声提取和回流提取 30 min,以提取溶剂补足失重,微孔滤膜过滤后 HPLC 测定淫羊藿苷,计算含量并比较。

结果表明,两种提取方法的提取效率无差别,选择操作简便、快速的超声提取。

2.2.3 提取时间的考察

取大黄灵脾颗粒 2.0 g,精密称定,分别用 25 mL 50% 乙醇超声提取 15、30、45 min,以提取溶剂补足失重,微孔滤膜过滤后 HPLC 测定淫羊藿苷,计算含量并比较,结果见表 1。

结果表明,超声时间超过 30 min 后淫羊藿苷提取效率不再提高,选择 30 min 作为提取时间。

得。

2.3 阴性样品的制备

按照处方和工艺制备缺淫羊藿的阴性样品^[6]。精密移取 2.0 g 阴性样品,按照“2.2.4 供试品处理方法”项下方法处理,即得。

2.4 供试品的 HPLC 测定参数考察及结果

2.4.1 检测波长的考察

取供试品溶液、阴性样品溶液和对照品溶液,在 200~400 nm 范围内全波长扫描,查看样品中淫羊藿苷的最大吸收波长。

扫描结果显示,样品和对照品中淫羊藿苷在 270 nm 处有最大吸收(见图 1),且阴性样品在峰位处无杂质干扰。选定 270 nm 作为检测波长。

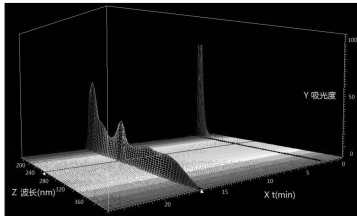


图 1 大黄灵脾颗粒对照品的 DAD 扫描图

Fig. 1 3D-HPLC chromatogram of icariin standard

2.4.2 色谱柱、流动相及柱温的考察

取供试品溶液和对照品溶液,分别对色谱柱、流

动相种类、流动相比例和色谱柱温进行考察。

结果表明,使用 Apollo C₁₈ 色谱柱时,样品与邻近杂质可以得到较好分离,且色谱峰形较好;流动相中乙腈与水比例为 28:72 时,淫羊藿苷保留时间合适,淫羊藿苷峰形较好;色谱柱温为 30 °C 时,淫羊藿苷保留时间合适且理论塔板数较高。

2.5 HPLC 方法学考察及样品含量测定结果

2.5.1 色谱条件

Apollo C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5.0 μm) 色谱柱;流动相乙腈-水 (28:72), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 270 nm。

2.5.2 专属性试验

在上述前处理方法和液相条件下,分别对淫羊藿苷对照品、大黄灵脾颗粒、大黄灵脾颗粒阴性样品进行测定。结果显示淫羊藿苷出峰时间在 15.8 min 左右,样品中淫羊藿苷与杂质分离良好,阴性样品中相应峰位处无杂质干扰测定,表明本分析方法特异性好,灵敏度高,结果见图 2。

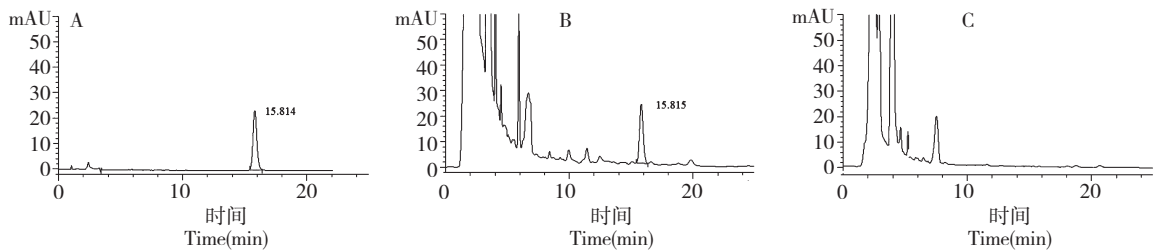


图 2 淫羊藿苷对照品(A)、大黄灵脾颗粒样品(B)及阴性样品(C)的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of icariin standard (A), Dahuanglingpi granule sample (B) and negative sample (C)

2.5.3 线性关系考察

取浓度为 38.36 μg/mL 的淫羊藿苷对照品溶液,分别进样 1.0、2.0、5.0、10.0 μL,取浓度为 0.3836 mg/mL 的淫羊藿苷对照品溶液,分别进样 2.0、5.0、10.0、20.0 μL,以峰面积对进样质量(μg)进行线性回归计算。

线性方程为: $Y = 1271X + 31.68$, $r = 0.9998$ 。结果表明:进样质量在 0.03836~7.672 μg 范围内,淫羊藿苷的峰面积与进样质量呈良好的线性相关。

2.5.4 精密度试验

精密吸取浓度为 38.36 μg/mL 的淫羊藿苷对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定峰面积,计算峰面积的 RSD 值(RSD = 0.5%)。结果表明仪器进样精密度良好。

取大黄灵脾颗粒,按照“2.2.4 供试品处理方

法”项下平行处理 6 份,进样分析并记录结果,计算峰面积得 RSD 值(RSD = 0.7%)。结果显示,样品测定重复性良好,颗粒中淫羊藿苷的平均含量为 0.481 mg/g。

2.5.5 溶液稳定性考察

取大黄灵脾颗粒,按照“2.2.4 供试品处理方法”项下处理,于 0、2、4、6、8、10 和 12 h 进样测定,计算峰面积的 RSD 值(RSD = 0.8%)。结果显示在 12 h 内供试品稳定良好。

2.5.6 加样回收率试验

精密称取 1.0 g 已测定淫羊藿苷含量的大黄灵脾颗粒供试品(淫羊藿苷含量 0.481 mg/g)9 份,置锥形瓶中,按低、中、高 3 个浓度组分别精密加入淫羊藿苷对照品溶液(0.3836 mg/mL)0.90、1.20 和 1.50 mL,按照“2.2.4 供试品处理方法”项下处理并

分析测定。结果表明,此测定方法中淫羊藿苷的在 95% 和 97.86%,回收率符合要求。结果见表 2。低、中、高浓度水平上回收率分别为 98.63%、98.

表 2 淫羊藿苷加样回收率试验结果

Table 2 Recovery test of icaritin

	低浓度 Low concentration			中浓度 Middle concentration			高浓度 High concentration		
	取样量 Sample amount (g)	1.0331	1.0017	1.0069	1.0052	1.0134	1.0256	1.0099	0.9726
样品含量 Sample content (mg)	0.4969	0.4818	0.4843	0.4835	0.4874	0.4933	0.4858	0.4678	0.4893
对照品加入量 Added amount (mg)	0.3452	0.3452	0.3452	0.4603	0.4603	0.4603	0.5754	0.5754	0.5754
测得含量 Detected content (mg)	0.8358	0.8164	0.8324	0.9370	0.9427	0.9510	1.0584	1.0103	1.0635
回收率 Recovery (%)	98.17	96.91	100.82	98.53	98.90	99.42	99.51	94.28	99.79
平均回收率 Average recovery (%)		98.63			98.95			97.86	
相对标准偏差 RSD (%)		2.0			0.5			3.2	

2.5.7 样品测定

取 3 个批次大黄灵脾颗粒(批号 120416、120522 和 130829),按照“2.2.4 供试品处理方法”项下处理并分析测定($n=3$)。3 个批次的样品中淫羊藿苷含量测定结果分别为 0.449、0.610 和 0.482 mg/g。

3 讨论

淫羊藿作为常用的中药补阳药,化学成分有黄酮类、多糖、木脂素、生物碱等,其中黄酮类成分为主要成分,具有广泛的药效作用^[7,8]。研究表明,淫羊藿苷具有增强免疫、抑菌抗炎和保护心脑血管等作用。淫羊藿是方中君药,选择淫羊藿苷作为大黄灵脾颗粒的质量控制指标是合理的。

淫羊藿在中药复方及制剂中使用广泛,并建立了相应的含量测定方法^[9-12]。本研究首次针对院内制剂大黄灵脾颗粒建立了淫羊藿苷的含量测定方法,提升了制剂的质量控制水平,从而保证制剂的临床疗效。本实验选定君药淫羊藿中公认的指标性成分淫羊藿苷作为测定对象,系统考察了前处理方法和分离参数,并进行了方法学验证。结果表明本方法的线性、精密度、重复性、稳定性及加样回收率均能满足定量测定的要求。因此,本方法可用于对大黄灵脾颗粒的质量控制。

多源自于民间方、古方,中药院内制剂是医生经

过多年临床应用所形成的经验方的制剂,应用广泛,疗效显著。由于历史原因,院内制剂的质量控制水平较低,化学控制指标不足,多缺少定量控制指标^[13,14]。

以前院内制剂的良好疗效主要靠药材饮片的优良质量保证,但是近年来随着需求剧增,药材种植规模和面积急剧扩大,大部分药材质量下降较快^[15],而院内制剂一般无药材检查的质控环节,所以为保证院内制剂的临床疗效,有必要提高最终之际的质量控制水平,院内制剂的质量控制提升势在必行。近年来国家和一些地方出台了一系列政策^[16],大力鼓励基于院内制剂的中药新药研制,进行院内制剂的临床再评价和质量标准提高研究,本研究正是在这一趋势下开展的工作。

参考文献

- 1 Wu ZY(吴志英),Zhang T(张天),Xue B(薛波). Effect of Rheum-Epimedium decoction in treating chronic renal failure on T cell immunity. *Chin J Integr Med* (中国中西医结合杂志),1994,14:52-55.
- 2 Chen M(陈敏),Xu YQ(徐艳秋),Xu B(须冰),et al. Effect of Dahuanglingpi granule on the rats with chronic renal failure. *Chin J Exper Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志),2009,15(2):68-70.
- 3 Zhou XJ(周筱静),Zheng PD(郑平东). Experimental study of Rhubarb and Epimedium decoction on chronic renal fail-

- ure. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 1996, 4:12-15.
- 4 Ye D(叶丹), Sun AH(孙爱华), Wu ZY(吴志英), *et al.* Experimental study of Rhubarb and Epimedium decoction in counteracting hearing impairment due to chronic renal failure. *Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai* (上海中医药大学上海市中医药研究院学报), 1998, 12(2):73-76.
 - 5 Ye D(叶丹), Wu ZY(吴志英), Zhang T(张天), *et al.* Experimental study of Rhubarb and Epimedium decoction in counteracting hearing impairment due to chronic renal failure. *Jiangsu J Tradit Chin Med* (江苏中医), 1998, 19(10):44-45.
 - 6 Standard of hospital preparation quality control by Shanghai municipal food and drug administration (上海市食品药品监督管理局医疗机构制剂质量标准), SYZ-ZF-151-2005.
 - 7 Wang J(王静), Li JP(李建平), Zhang YW(张跃文), *et al.* Progress in pharmacology study of *Epimedium*. *Chin Pharm* (中国药业), 2009, 18(8):60-61.
 - 8 Guo LN(郭丽娜), Ma YH(马莹慧), Zhao W(赵伟), *et al.* Progress in analysis methods for chemical constituents from *Epimedium*. *Chin New Drug J* (中国新药杂志), 2013, 22:919-923.
 - 9 Ren YD(任亚东), Shi M(施猛), Sun QY(孙秋艳), *et al.* Determination of icariinin Zhengyuan Capsules by HPLC. *Asia-pacific Tradit med* (亚太传统医药), 2014, 10(11):16-18.
 - 10 Tu H(涂禾), Ma JH(马家骅), Guo HY(郭宏彦), *et al.* Content determination of icariin in Shenwang Cream by HPLC. *J China Pharm* (中国药房), 2014, 25:2945-2946.
 - 11 Tu XM(涂兴明), Li CE(李赐恩), Wu KY(吴康郁). Determination of icariin in Gukang Oral Liquid by HPLC. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm* (中药新药与临床药理), 2013, 24:613-615.
 - 12 Li WJ(李文静), Hong B(洪博). RP-HPLC simultaneous determination of four major active components in Guilu Bushen pills. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2013, 33:854-858.
 - 13 Zhu WT(朱文涛), Lu S(卢双). The value of Chinese Medicine Hospital Preparations. *J Tradit Chin Med Manag* (中医药管理杂志), 2009, 17:347-348.
 - 14 Li Z(李哲), Chang N(常暖), Li L(李黎). The policy history, present situation and countermeasures of Chinese medicine hospital preparations. *Chin J Lib Inform Sci Tradit Chin Med* (中国中医药图书情报杂志), 2014, 38:38-41.
 - 15 Ran MX(冉懋雄). The development status and suggestion on the cultivation of Chinese herbal materials. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2008, 10(3):3-7.
 - 16 Science and Technology Commission of Shanghai Municipality. 2013 Shanghai annual Guide for projects of science and technology innovation in medical and agricultural field (上海市2013年度“科技创新行动计划”医学与农业领域项目指南), 2013-04-10.
-
- (上接第73页)
- 7 Kang J(康军). Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Magnolia officinalis*. *J Tradit Chin Med* (中医中药), 2008, 12:120-124.
 - 8 Zhang YT(张永太), Wu H(吴皓). *Magnolia officinalis* pharmacological research progress. *Chin J Inf TCM* (中国中医药信息杂志), 2005, 15:96-99.
 - 9 Qian JZ(钱俊臻), Wang BC(王伯初). Advances in the pharmacological effects of hesperidin. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22:176-180.
 - 10 Wu HJ(吴惠君), Ou JL(欧金龙), Chi XL(池晓玲), *et al.* Overview pharmacological effects of Citrus. *J Prac Tradit Chin Int Med* (实用中医内科杂志), 2013, 27:91-92.
 - 11 Lu Y(鹿岩), Li N(李妮), Duan MY(段梦雅), *et al.* 357 Kinds of Chinese medicine granules used in clinical analysis on 2010-2013. *Mod Pharm Clin* (现代药理与临床), 2014, 29:1050-1053.