

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.04

HPLC 法测定芪贞增免颗粒、蛋鸡宝中淫羊藿苷的含量

章安源¹, 章安雯², 张志民¹, 陈玲¹, 李有志^{1*}

(1.山东省兽药质量检验所,山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室,济南 250022;2.枣庄职业学院,山东枣庄 277100)

[收稿日期] 2019-01-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0021-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了建立一种 HPLC 法测定芪贞增免颗粒、蛋鸡宝中淫羊藿中含量,使用 C18(250 mm×4.6 mm,5 μm) 色谱柱,样品前处理用 40% 甲醇稀释,乙腈:水(25:75)梯度洗脱,采用二极管阵列检测器(HPLC-DAD),波长采集范围为 200~400 nm,记录色谱图波长为 270 nm,流速为 1 mL/min,进样量为 10 μL。结果表明,淫羊藿苷在 5~400 μg($R^2=0.9998$)、呈良好的线性关系;平均加样回收率分别为 92.02%,92.22%($n=6$),RSD 分别为 1.54%,1.88%。方法简单、准确、重复性好,为控制本制剂的质量提高标准依据。

[关键词] 高效液相色谱法;芪贞增免颗粒;蛋鸡宝;淫羊藿苷

Determination of Icaritin in Qizhenzengmian Granule and Danjibao Powder by HPLC

ZHANG An-yuan, ZHANG An-wen, ZHANG Zhi-min, CHEN Ling, LI You-zhi

(1.Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute;Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China;2.Zaozhuang Vocational College,Zaozhuang,277100,China)

Corresponding author: LI You-zhi, E-mail:13853120817@126.com

Abstract: To establish a HPLC method for the determination of icaritin in Qizhenzengmian granules and Danjibao powder. Samples directly diluted by 40% methanol solution. Using gradient elution with acetonitrile water (25 : 75) as the mobile phase. High performance liquid chromatography with diode array detector. Photodiode array detector wavelength range was 200~400 nm, The recorded wave length was 270 nm, The flow rate was 1 mL/min, The injection volume was 10 μL. Icaritin was linear within the range of 5~400 μg/mL ($R^2=0.9998$). The recovery of icaritin of Qizhenzengmian granule and Danjibao powder were 92.02% and 92.22% respectively. The method was accurate and simple, which can be provided a reliable way for the improving quality control of Qizhenzengmian granule and Danjibao powder.

Key words: HPLC; Qizhenzengmian granule; Danjibao powder; icaritin

淫羊藿是使用悠久的传统中药之一,其主要有效成分是黄酮类化合物淫羊藿苷^[1]。现代药理学

研究发现,淫羊藿苷具有多种生物活性^[2],并有抗缺氧、抗氧化等多种生物学功效^[3-4]。淫羊藿来源

作者简介:章安源,兽医师,从事兽药和畜禽产品质量监督检验及科研工作。

通讯作者:李有志。E-mail:13853120817@126.com

于小檗科淫羊藿属植物 *Epimedium L* 干燥叶,以淫羊藿为主药的制剂很多,如芪贞增免颗粒和蛋鸡宝,相关标准仅用薄层和显微鉴别淫羊藿苷^[5],淫羊藿药材种类多,鉴别困难。采收于夏秋的淫羊藿药材地上部分花果已脱落,仅存叶片和叶柄,药材中残存一些花序轴和果梗,可作为补充特征,若药材仅有叶片,可利用鉴别的特征就更少^[6]。统计表明淫羊藿药材各药用部位中淫羊藿苷含量均为叶>根>茎^[7],中成药在投料的过程中若投入淫羊藿茎及地下部分,仅靠当前的质量评价方法难以鉴别^[8]。未对含量进行控制,不能全面反映制剂的质量水平,达不到制剂治疗效果。

本实验室首次应用 HPLC 对芪贞增免颗粒和蛋鸡宝中淫羊藿苷进行定量研究,方法快速、准确。为控制本制剂的质量提供标准依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器与设备 高效液相色谱仪 Waters e2695 (配二极管阵列检测器 2998); AE-240 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-250DB 超声仪 (昆山市超声仪器有限公司);

1.2 试药与试剂 淫羊藿苷(批号:110737-201516,

含量 94.2%);购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈(Merck, 色谱纯);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-118 C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A:乙腈;流动相 B:水^[5];流速:1 mL/min;进样量 10 μL;柱温为 30 ℃。检测波长范围 270 nm,结果见表 1。

表 1 梯度洗脱表

Tab 1 Gradient elution

时间/min	A/%	B/%
0	10	90
25	25	75
30	20	80
45	10	90

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取淫羊藿对照品适量,加甲醇配制成浓度为 100 μg/mL 的对照品溶液。结果见图 2。

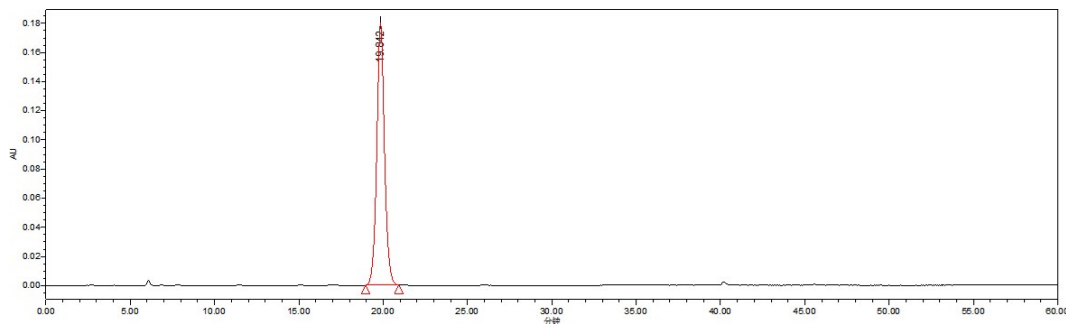


图 2 淫羊藿对照品溶液

Fig 2 Control solution

2.2.2 标准工作液的制备 取适量 2.2.1 项下溶液,用初始流动相稀释,制备成系列浓度为 5、10、25、50、100、200、250、400 μg/mL 标准工作液,绘制标准曲线。

2.2.3 供试品溶液制备 取样品充分研磨,精密称取 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 40% 甲醇

25 mL,称定重量,超声(120 W,频率 40 kHz),超声水浴温度 40 ℃,处理 30 min,放冷,用 40% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液后再次精密加入 40% 甲醇 25 mL,合并两次滤液后,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得^[5]。对照品与供试品出峰时间相一致。结果见图 3 和图 4。

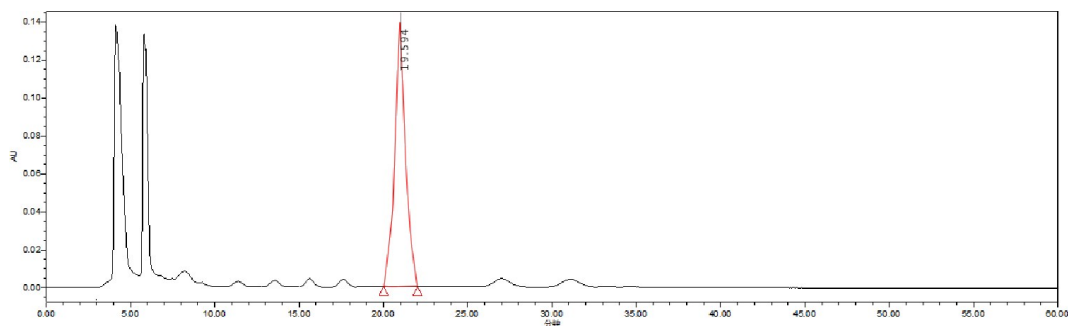


图 3 芪贞增免颗粒

Fig 3 Sample solution of Qizhenzengmian Granule

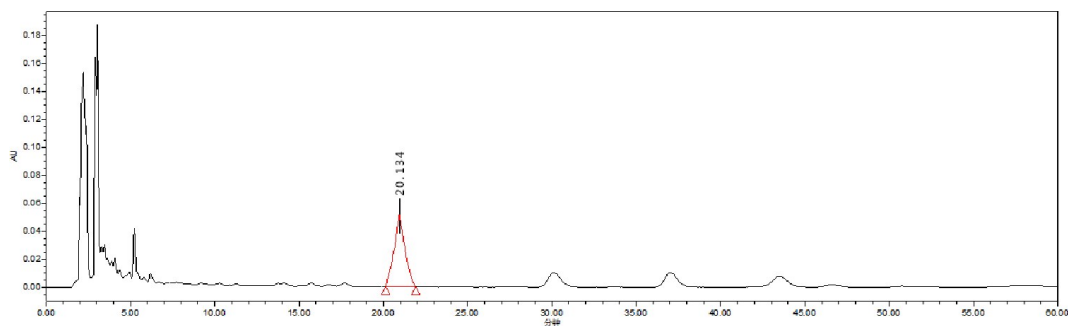


图 4 蛋鸡宝

Fig 4 Sample solution of Danjibao Powder

2.2.4 阴性样品 取除淫羊藿的其它药材适量,按样品的制备工艺和配方比例制备阴性样品,按 2.2.3 项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.2.5 阳性添加样品 精密称取已知含量的同批样品(山东某兽药生物有限公司提供)6 份,分别精密加入适量对照品,置于 25 mL 容量瓶中,按 2.2.3 项下方法混合均匀制成阳性添加样品溶液。

2.3 方法线性考察 分别精密吸取 2.2.2 项下标准工作液 10 μL ,在 2.1 项色谱条件下注入仪器,以峰面积为横坐标(X),浓度(μg)为纵坐标(Y),回归方程 $Y=0.0004X-0.2941$, $R^2=0.9998$;结果表明,淫羊藿苷在 5~400 μg 与其对应的峰面积有良好的线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL 注入色谱仪,连续进样 6 次。以峰面积计算,得出淫羊藿苷的 RSD 2.11%。表明仪器精密度良好,符合

检测要求。

2.5 重复性试验 同批供试品(批号为 20180201,山东某兽药生物科技有限公司提供),按 2.2.3 项下制备 6 份样品溶液,分别注入液相色谱仪,计算淫羊藿苷含量, RSD 为 1.4%,说明该方法重现性好,含量稳定。

2.6 稳定性试验 取 2.2.3 项下同一供试品溶液(批号:20180201),室温下每隔 4 h 连测 6 次,进样体积 20 μL ,淫羊藿苷峰面积 RSD 分别为 0.93%,0.89%、0.91%,表明本制剂在制备后的 24 h 内成份较稳定。

2.7 回收率试验 取 2.2.5 项下溶液 2 mL,按 2.1 项下条件测定淫羊藿苷含量。回收率在 92.02%~92.22%之间,变异系数在 1.54%~1.88%之间,见表 2-表 3。表明该方法回收率较好,准确度和精密度可以满足检测需求。

表 2 芪贞增免颗粒中淫羊藿苷回收率试验 ($n=6$)

Tab 2 Recovery of icariin of Qizhenzengmian granule

样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	批内平均回收率/%	批内 RSD/%
0.0923	0.1006	0.1775	92.00		
0.0923	0.1006	0.1801	93.36		
0.0923	0.1006	0.1737	90.05	92.02	1.54
0.0923	0.1006	0.1812	93.92		
0.0923	0.1006	0.1764	91.45		
0.0923	0.1006	0.1762	91.34		

表 3 蛋鸡宝中淫羊藿苷回收率试验 ($n=6$)

Tab 3 Recovery of icariin of Danjibao powder

样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	批内平均回收率/%	批内 RSD/%
0.0641	0.1069	0.1586	92.76		
0.0641	0.1069	0.1583	92.60		
0.0641	0.1069	0.1598	93.45	92.22	1.88
0.0641	0.1069	0.1612	94.27		
0.0641	0.1069	0.1540	90.08		
0.0641	0.1069	0.1542	90.16		

2.8 样品测定 精密称取不同企业芪贞增免颗粒,蛋鸡宝样品,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶

液,每份样品测定 2 次,以 2 次测定结果的平均值作为测定值,结果见表 4。

表 4 样品测定结果 ($n=6$)

Tab 4 The result of the sample content

批号	芪贞增免颗粒/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	批号	蛋鸡宝/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
20180201 A 企业	0.0923	20181101	0.0641
20180202 A 企业	0.0901	20181102	0.0625
20180203 A 企业	0.0911	20181103	0.0592
20180401 B 企业	0.0452	20181145	0.0348
20180403 B 企业	0.0448	20181146	0.0342
20181103 C 企业	0.1234	20185541	0.1567

2.9 检出限和定量限 取“2.2.4”项下溶液,色谱图显示无淫羊藿成分干扰,应用本试验建立的检测方法,添加对照品 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$,取与对照图谱中相同保留时间的噪音信号平均值,信噪比 (S/N) ≥ 3 ,确定为方法的检出限。添加对照品 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 显示

信噪比 (S/N) ≥ 10 ,作为此方法定量限。

3 讨论与结论

3.1 供试品前处理提取方法的选择 Jang 等以提取溶液浓度、提取温度、溶液 pH、液料比及提取时间为因素,发现在各因素中,提取溶液浓度及提取

温度是影响提取率的主要因素^[9]。试验中着重考察以上条件因素。选择6种不同浓度提取溶剂:乙醇30%、40%、50%和30%、40%、50%甲醇^[10-13],结果表明40%甲醇溶解样品不易结团,溶解性最好且提取率最高,检测样品杂质峰少。分别采用回流和超声不同方式提取,超声水浴温度控制在20℃、30℃、40℃,并考察了不同的提取时间^[14-17]。回流提取1h后和超声提取30min淫羊藿苷即可提取完全,考虑到超声提取更加简便、快速、故超声处理30min来制备样品。分别提取样品2次、3次、4次,超声频率40kHz,水浴温度控制在40℃,试验结果显示提取2次与3次、4次的淫羊藿苷含量差异无统计学意义,为节约时间,提取2次样品即可满足实验需求^[18]。

3.2 流动相的优选 《中国兽药典》2015版二部中淫羊藿药材含量测定使用流动相是乙腈:水(30:70),但制剂中其它药材对其分离度有影响,杂质多,故比较以下5种流动相组进行梯度洗脱:乙腈-水(25:75)、乙腈-0.05%磷酸(27:73)^[15]、乙腈-水(50:50)^[16]、乙腈-水(28:72)^[17]、乙腈-水(23:77)^[19]。经过比对发现使用乙腈-水(25:75)梯度洗脱后淫羊藿苷峰分离度高,峰形对称,并无拖尾及其它杂质峰的干扰。使用其他流动相显示淫羊藿苷多在30min后出峰,出峰时间晚,此方法测定供试品方法稳定,准确度高,且节约时间。

3.2 色谱柱的选择 使用不同型号的十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱进行比较,HypersilBDS-C18(250mm×4.6mm,5μm)^[15]、Cosmosil C18(250mm×4.6mm,5μm)^[18]、Agilent Eclipse XDB-118 C18柱(250mm×4.6mm,5μm)进行比较,后者普通C18柱即可满足淫羊藿苷测定方法的重复性需求,结果表明方法实用性及耐用性良好。

3.3 柱温的确定 25℃和30℃、35℃柱温进行考察,30℃柱温时,基线平稳,柱压稳定,对照品出峰时间与样品时间一致,选择30℃柱温符合检测要求。

3.4 影响淫羊藿苷含量测定的因素 淫羊藿苷含量测定结果表明来自于不同厂家芪贞增免颗粒和

蛋鸡宝含量差别较大,分析可能是不同产地淫羊藿药材中淫羊藿苷的含量有差异^[13],也可能与药材贮存有关^[2],其次或于颗粒剂与散剂不同的工艺制备过程中对药物中有效成分有影响。

3.5 结论 采用现行标准中简单的显微鉴别特征和薄层色谱难以控制制剂和药效的稳定性,难确保临床疗效。应完善制剂中淫羊藿苷含量质量标准。本实验处理简捷,快速,方法可靠,重现性及回收率均符合要求,适合测定淫羊藿苷的含量,可有效控制芪贞增免颗粒、蛋鸡宝等方剂的内在质量。今后还需结合大生产继续积累数据,考察产品的稳定性。也有研究认为以多指标来评价淫羊藿质量更为科学^[13,15]。

参考文献:

- [1] 冯晶. 淫羊藿的研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(9): 74-75.
Feng J. Advances in Epimedium [J]. Hubei Chinese Medicine, 2012, 34(9): 74-75.
- [2] 范梅娟. 强力健身胶囊定性定量方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 697-700.
FAN M J. Study on qualitative and quantitative for Qiangli Jian-shen capsules [J]. China Journal Of Pharmaceutical Analysis, 2012, 32(4) 697-700.
- [3] Zhai Y K, Guo X Y, Ge B F, et al. Icarin stimulates the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells via activating the PI3K-AKT-e NOS-NO-c GMP-PKG [J]. Bone, 2014, 66(9): 189-193.
- [4] Ma H P, Ma X N, Ge B F, et al. Icarin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in osteoblasts and preserves their osteogenic differentiation potential in vitro [J]. Cell Prolif, 2014, 47(6): 527-532.
- [5] 中华人民共和国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015年版二部 [S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Republic of China Veterinary Pharmacopoeia Part II. 2015 [S].
- [6] 郭宝林, 肖培根. 中药淫羊藿主要种类评述 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 303-305.
Guo B L, Xiao P G. Comments on main species of herba Epimedii [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2003, 28(4): 303-305.

- [7] 徐文芬,何顺志,黄敏,等. 高效液相色谱法测定贵州产淫羊藿药材不同药用部位中淫羊藿苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):1-3.
Xu W F, He S Z, Huang M, *et al.* Determination of icariin contents in different plant parts of Epimedium plants in Guizhou by HPLC[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae,2007,13(5):1-3.
- [8] 邓爱平,方文韬,周青罡,等. 淫羊藿质量影响因素及质控对策分析[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):1062-1070.
Deng A P, Fang W T, Zhou Q G, *et al.* Research actuality and quality-influencing factor of Epimedium folium[J]. China Journal Of Chinese Material Medica,2018,43(5):1062-1070.
- [9] 方芳,王凤忠. 植物黄酮醇提取方法研究进展食品[J]. 工业科技,2018,39(7):323-334.
Fang F, Wang F Z. Research progress on the extraction methods of flavonols in plants[J]. Industrial Technology 2018,39(7):323-334.
- [10] Martins S, Aguilár C N, Teixeira J A, *et al.* Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from Larrea tridentate leaves by solvents extraction [J]. Separation and Purification Technology, 2012,88(2):163-167.
- [11] 焦守国,许学丽. HPLC 法测定金乌骨通胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 解放军药学报,2009,25(6):547-549.
Jiao S G, Xu X L. Determination of icariin in Jinwu Gutong Capsules by HPLC[J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army,2009,25(6):547-549.
- [12] 赵明宏,韩镌竹,王常丽,等. 高效液相色谱法同时测定复方仙灵脾颗粒中淫羊藿苷和丹参酮 II A 的含量[J]. 解放军药学报,2011,27(1):63-65.
Zhao M H, Han J Z, Wang C L, *et al.* Simultaneous determination of icariin and tanshinone II A in compound Xianlingpi granules by high performance liquid chromatography[J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army,2011,27(1):63-65.
- [13] 许红涛,李媛,何勇静,等. HPLC 法测定二仙汤提取物中抗骨质疏松有效成分的含量[J]. 中国药房,2015,26(15):2122-2124.
Xu H T, Li Y, He Y J, *et al.* Determination of anti-osteoporosis active components in erxian decoction extract by HPLC[J]. China Pharmacy, 2015,26(15):2122-2124.
- [14] 张桂林,马慧萍,李兰茹,等. HPLC 法测定抗骨质增生片中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房,2016,27(30):1291-1293.
Zhang G L, Ma H P, Li L R, *et al.* Determination of icariin in Kanggu Zhengsheng tablets by HPLC [J]. China Pharmacy, 2016,27(30):1291-1293.
- [15] 王明权,毕志明,李萍,等. 高效液相色谱法测定淫羊藿中淫羊藿定 C 和淫羊藿苷的含量季晖[J]. 中国中药杂志,2003,28(11):1025-1027.
Wang M Q, Bi Z M, Li P, *et al.* Determination of Epimedin C and icariin in herba Epimedium by HPLC[J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2003,28(11)1025-1027.
- [16] 罗亚玲,李冰,吴强,等. 高效液相色谱法同时测定抗骨增生丸中柚皮苷和淫羊藿苷的含量[J]. 成都大学学报(自然科学版),2018,37(2):47-50.
Luo Y L, Li B, Wu Q, *et al.* Simultaneous determination of naringin and icariin in anti-hyperostosis pills by HPLC[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2018,37(2):47-50.
- [17] 易廷平. 高效液相色谱法测定肾舒康胶囊淫羊藿苷含量[J]. 实用中医药杂志,2012,28(6):514-515.
Yi Y P. To determine the contents of icariin in Shenshukang capsules[J]. Methods Journal OF Practical Traditional Chinese Medicine, 2012,28(6):514-515.
- [18] 俞吉,朱裕林,桑冉,等. 高效液相色谱法测定骨疏灵颗粒中淫羊藿苷含量[J]. 实用药物与临床,2015,18(6):691-693.
Yu J, Zhu Y L, Sang R, *et al.* Determination of icariin in gushuling granule by HPLC [J]. Practical Pharmacy And Clinical Remedies, 2015,18(6):691-693.
- [19] 徐东,孙立立,杨书斌,等. 高效液相色谱法测定补肾宁胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 中成药,2001,23(5):331-333.
XU D, Sun L L, Yang S B, *et al.* Determination of icariin in Bushenning Capsules by HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine [J]. 2001,23(5):331-333.

(编辑:陈希)