

RP-HPLC法同时测定五味首乌片中淫羊藿苷、 大黄素和大黄素甲醚的含量

高燃, 任爱农*, 许珍珍, 顾学红, 姚苗苗

(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 法同时测定五味首乌片中多指标成分的含量。方法: 采用 Akasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) - 0.4% 磷酸 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 min, 30% A; 15 min, 50% A; 20~30 min, 75% A; 35~40 min, 30% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 30℃, 进样量 20 μL; 供试品溶液制备采用溶剂分级萃取。结果: 淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚线性范围分别为 1.44~7.18, 1.28~6.39, 0.690~3.45 μg, 平均加样回收率 (n=6) 分别为 101.6%, 103.0%, 99.55%。结论: 本方法快速、灵敏, 重现性好, 适合于五味首乌片中淫羊藿苷、大黄素和大黄素甲醚含量测定。

关键词: RP-HPLC; 五味首乌片; 淫羊藿苷; 大黄素; 大黄素甲醚; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1454-04

RP-HPLC simultaneous determination of icaritin, emodin and physcion in Wuwei Shouwu tablets

GAO Ran, REN Ai-nong*, XU Zhen-zhen, GU Xue-hong, YAO Miao-miao

(Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for simultaneous quantitative determination of icaritin, emodin and physcion in Wuwei Shouwu tablets. **Methods** The analytical column was Akasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and 0.4% phosphoric acid (B) with gradient elution (0 min, 30% A; 15 min, 50% A; 20~30 min, 75% A; 35~40 min, 30% A) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The wavelength of UV detector was 270 nm and column temperature was 30℃. The solution with 20 μL was injected into the HPLC system for analysis every time. The sample solution was extracted with different solvents. **Results** The linear ranges of icaritin, emodin and physcion were 1.44~7.18, 1.28~6.39, and 0.690~3.45 μg respectively. Their average recoveries (n=6) were 101.6%, 103.0%, 99.55%, respectively. **Conclusion** This method is sensitive, repeatable and suitable to determine the contents of icaritin, emodin and physcion in Wuwei Shouwu tablets.

Key words RP-HPLC; Wuwei Shouwu tablets; icaritin; emodin; physcion

五味首乌片是江苏省中医药研究院研制的中药新药, 由制何首乌、淫羊藿、山楂、牛膝及辅料组成, 具有滋补肝肾、消导脂浊、活血通脉功效。临床主要用于高脂血症。处方中制何首乌, 补肝肾, 益精血, 乌须发, 强筋骨, 为君药; 肾为水脏, 属阴, 阴阳互根, 阴虚可导致阳虚, 故取淫羊藿温肾助阳、阳生阴长, 为臣药; 山楂, 消食健胃, 行气散瘀, 为佐药; 牛膝, 引诸药下行以补益肝肾, 兼能活血, 有利于瘀痰的清除, 为使药。为多指标严格控制产品质量, 选择该处

方的君、臣 2 味药中的 3 种代表性有效成分: 大黄素、大黄素甲醚和淫羊藿苷作为检测指标。现代药理研究证明大黄素、大黄素甲醚具有降低其总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白·胆固醇、血浆纤维蛋白原含量, 升高高密度脂蛋白·胆固醇的作用^[1,2], 提示该类成分具有良好的调节血脂和血浆纤维蛋白原的作用, 能够抑制高脂血症的形成, 预防动脉粥样硬化的发生。淫羊藿苷可明显促进幼年小鼠附睾及精囊的发育, 表现出具有性激素样作用^[3]; 还可促

* 通讯作者 Tel: (025) 85639647 E-mail: lyy-0@126.com

使卵泡颗粒细胞分泌雌二醇,促进肾上腺皮质细胞分泌皮质酮^[4]。提示淫羊藿具有补肾壮阳、抗衰老作用,其作用机理可能与其直接刺激靶腺分泌激素有关。目前国内有文献报道高效液相色谱法同时测定大黄素、大黄素甲醚含量^[5]和高效液相色谱法测定淫羊藿苷的含量^[6],但用高效液相色谱法同时测定淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚含量未见文献报道。为了较全面、快速地控制本产品质量,本文应用溶剂分级萃取法,同时兼顾提取该产品中极性成分淫羊藿苷及弱极性成分大黄素、大黄素甲醚,采用高效液相色谱法同步进行含量测定。

1 仪器与试剂

Waters高效液相色谱仪(Alliance 2695 四元泵自动进样系统, 996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站), Millipore Milli-Q 超纯水制备仪(美国), METTLER 万分之一及十万分之一电子天平(瑞士)。

对照品淫羊藿苷(批号 110737-200414)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄素甲醚(批号 0758-200206)均购于中国药品生物制品检定所,供含量测定用;五味首乌片(本院制剂室自制;批号: 070502, 070601, 070603 规格: 每片重 0.55 g);乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 溶液制备

2.1 混合对照品溶液^[5] 精密称取对照品淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚适量,用甲醇制成淫羊藿苷浓度为 $0.718 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄素浓度为 $3.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和大黄素甲醚浓度为 $0.575 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一成分对照品储备液。分别精密量取上述淫羊藿苷对照品储备液 2.5 mL、大黄素对照品储备液 0.5 mL、大黄素甲醚对照品储备液 1.5 mL,置同一 5 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得淫羊藿苷浓度为 $0.359 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄素浓度为 $0.320 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄素甲醚浓度为 $0.173 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液 取五味首乌片 20 片,精密称定,计算平均片重,粉碎成细粉(过 5 号筛),精密称取约 2.0 g 置 100 mL 三角烧瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称重,水浴中回流 1 h,放冷再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密取续滤液 25 mL,置烧瓶中,水浴加热挥去溶剂,加 10 mL 水溶解,用乙酸乙酯提取 3 次,每次 20 mL,合并乙酸乙

酯溶液,水层再用二氯甲烷提取 3 次,每次 20 mL,收集氯仿溶液,合并乙酸乙酯溶液和氯仿溶液,采用旋转蒸发仪减压回收溶剂至干,残渣用适量甲醇溶解,移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 阴性样品溶液 按照该产品生产工艺,分别制备缺制何首乌、缺淫羊藿和同时缺制何首乌、淫羊藿的阴性样品,再分别按“2.2”项下方法制成对应的阴性样品溶液。

3 色谱条件^[6,7]

采用 Akasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈(A) - 0.4% 磷酸(B),梯度洗脱(0 min, 30% A; 15 min, 50% A; 20~30 min, 75% A; 35~40 min, 30% A),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 270 nm,柱温 30 ℃。在本色谱条件下,淫羊藿苷、大黄素和大黄素甲醚能达到较好分离,样品中其他成分对三者的测定无干扰。见图 1。

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL, 进样测定,记录峰面积,以峰面积 Y 对进样量 X (μg) 进行线性回归,得淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚回归方程分别为:

$$Y = 1.88 \times 10^6 X + 1.24 \times 10^5 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 3.30 \times 10^6 X + 4.02 \times 10^5 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 3.38 \times 10^6 X + 1.97 \times 10^5 \quad r = 0.9996$$

结果表明上述 3 种成分进样量分别在 1.44~7.18, 1.28~6.39, 0.690~3.45 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL, 重复进样 5 次,记录峰面积。结果淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.9%, 1.2%。

4.3 稳定性试验 取五味首乌片样品(批号 070502)的供试品溶液,分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 进样 20 μL, 记录峰面积。结果淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.8%, 0.8%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

4.4 重复性试验 取五味首乌片样品(批号 070502)细粉 6 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样 20 μL, 记录峰面积,计算含量。结果淫羊藿苷、大黄素和大黄素甲醚含量平均值($n=6$)分别为 0.198, 0.414, 0.176 $\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$; RSD 分别为 0.2%, 0.3%, 0.2%。

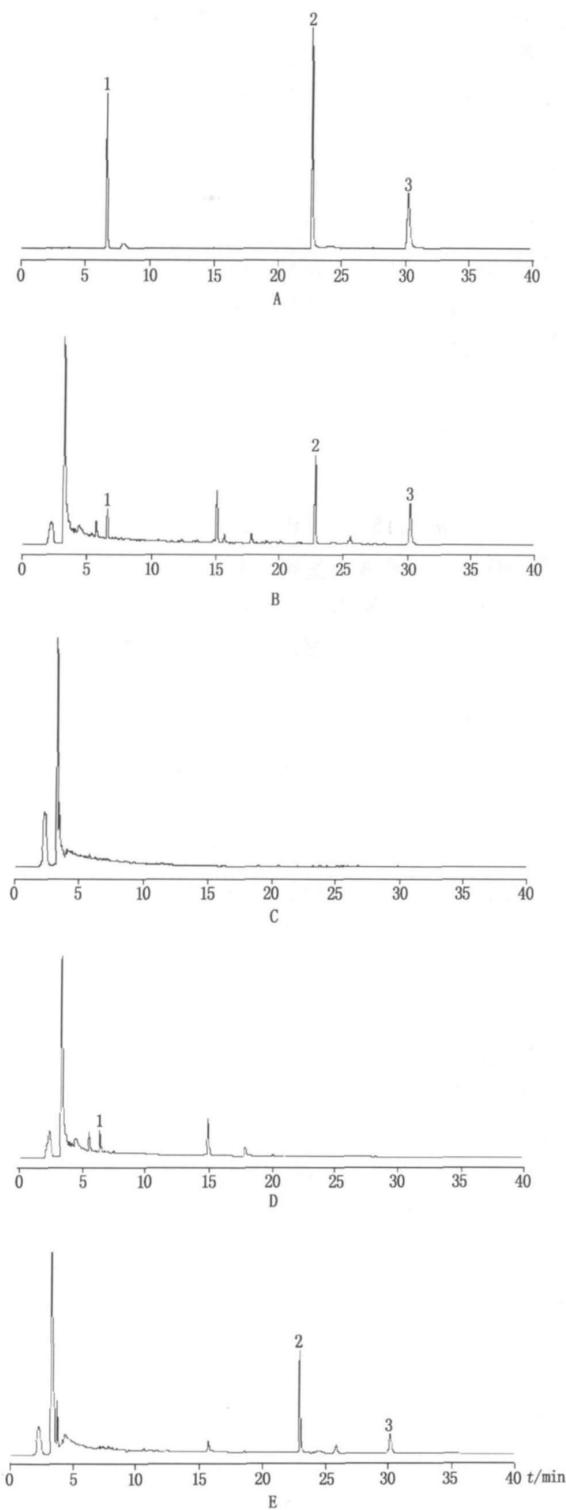


图 1 对照品 (A)、样品 (B)、缺制何首乌和淫羊藿的阴性样品 (C)、缺制何首乌的阴性样品 (D) 及缺淫羊藿的阴性样品 (E) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances (A), sample (B) and negative sample without Radix Polygoni multiflori Preparata and Herba Epimedii (C), negative sample without Radix Polygoni multiflori Preparata (D) and negative sample without Herba Epimedii (E)

1 淫羊藿苷 (icariin) 2 大黄素 (emodin) 3 大黄素甲醚 (physcion)

4.5 加样回收率试验 取五味首乌片样品 (批号 070502) 细粉共 6 份, 每份约 1 g, 3 份为一组, 精密称定。按高、低加入量分别精密加入浓度为淫羊藿苷 $0.300 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄素 $0.827 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和大黄素甲醚 $0.290 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一成分对照品溶液 1 mL 和 1.2 mL, 照“2.2”项下方法制备溶液, 进样 20 μL , 计算回收率, 见表 1。淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.6%, 103.0%, 99.55%。

表 1 淫羊藿苷、大黄素和大黄素甲醚回收率试验结果 ($n=3$)

Tab 1 Recovery of icariin, emodin and physcion

成分 (component)	样品含有量 (sample content) μg	加入量 (added) μg	回收率 (recovery) %	RSD %
淫羊藿苷 (icariin)	0.362	0.300	102.3	0.4
		0.360	100.8	0.4
大黄素 (emodin)	0.827	0.827	102.0	0.9
		0.993	104.0	0.8
大黄素甲醚 (physcion)	0.290	0.290	98.20	0.2
		0.348	100.9	0.4

5 样品测定

分别取 3 批五味首乌片样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取“2.1”项下的混合对照品溶液 10 μL 及供试品溶液 20 μL 进样, 记录峰面积, 外标法计算样品中淫羊藿苷、大黄素及大黄素甲醚含量, 结果见表 2。

表 2 五味首乌片的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$, $n=2$)

Tab 2 Determination of Wuwei Shouw tablets (mg per tablet, $n=2$)

批号 (Lot No.)	淫羊藿苷 (icariin)	大黄素 (emodin)	大黄素甲醚 (physcion)
070502	0.199	0.422	0.188
070601	0.200	0.362	0.173
070603	0.199	0.421	0.176

6 讨论

6.1 检测波长的选择 首先分别考虑淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚的特征吸收波长。在大黄素和大黄素甲醚的特征吸收波长 440 nm 处, 淫羊藿苷基本没有吸收, 而在淫羊藿苷特征吸收波长 270 nm 波长处, 淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚分离度好, 各峰吸收明显, 故检测波长选择 270 nm。

6.2 供试品溶液制备方法的确定 在提取过程中, 曾比较不同的提取方式 (超声法、加热回流法)、不同溶剂种类 (甲醇、水)、溶剂不同用量 (30, 50, 100 mL)、不同提取时间 (0.5, 1, 1.5 h) 对目标成分的含

量影响。结果表明采用 50mL 甲醇回流提取 1 h 淫羊藿苷、大黄素、大黄素甲醚含量可达最高, 但杂质峰干扰较大, 故采用溶剂萃取。考虑到淫羊藿苷极性较大, 大黄素、大黄素甲醚极性较小, 为兼顾两类成分同步提出, 使得检测指标覆盖面广, 采取溶剂分级萃取, 先采用极性溶剂乙酸乙酯萃取, 提出淫羊藿苷, 然后再采用弱极性溶剂二氯甲烷萃取, 提出大黄素和大黄素甲醚, 使同一个样品, 极性成分和弱极性成分同步提出, 供试品溶液制备一次完成, 提高了工作效率。

6.3 流动相的选择 为了使所检测的色谱峰分离度好, 出峰时间合理, 采用梯度洗脱方法。但在流动相比例调整中发现, 淫羊藿苷极性较大, 适合在水比例较大的系统中分离, 而大黄素和大黄素甲醚极性较小, 适宜在乙腈比例较大的系统中分离, 两类成分同步检测时, 淫羊藿苷先出峰, 大黄素、大黄素甲醚的峰后出, 流动相比例由水相向乙腈相增大, 在此变化中, 若变化太快则基线会隆起较大的溶剂包, 故选择梯度时, 乙腈增大变化较缓和, 10 min 后色谱图基线显示平缓; 但 10 min 前基线有坡度, 说明乙腈比例偏大, 该段成分堆积, 所以在 10 min 前的流动相中还应降低乙腈比例。

参考文献

- 1 XU Zai-pin(徐在品), LU Zhan-jun(卢占军), CHEN Juan-hua(陈眷华), *et al*. The effect of rhubarb ethanol-extract on hyperlipidemia and liver fatty in rabbits(大黄醇提液抗家兔实验性高血脂症及脂肪肝的实验研究). *Chin J Appl physiol*(中国应用生理学杂志), 2007, 23(3): 375
- 2 LI Shu-ping(李树平), ZHOU Li-ling(周利玲), HAN Wei(韩伟), *et al*. The trioxymethylantraquinone's accommodation effect to the hyperlipidemia model and fibrinogen in the plasma(大黄素对高脂血症模型血脂及血浆纤维蛋白原的调节作用). *Chin J Tradit Med Sci Technol*(中国中医药科技), 2007, 14(5): 349
- 3 LILI(李梨), ZHOU Qi-xin(周岐新), SHI Jing-shan(石京山). Study advancement in pharmacological actions of icariin(淫羊藿苷药理作用研究进展). *J China Pharm*(中国药房), 2005, 16(12): 952
- 4 LI Fang-ling(李芳芳), LI Si(李思), LÜ Zhan-jun(吕占军), *et al*. The effect of the icariin to the rat's granulosa cell and the adrenal glands output effect(淫羊藿苷对大鼠卵泡颗粒细胞和肾上腺皮质细胞分泌功能的影响). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1997, 22(8): 499
- 5 CUI Lan(崔岚), AN Fu-rong(安富荣), XIA Ling-hong(夏玲宏). Simultaneous determination of 4 anthraquinones in Shugan Quzhi capsules by RP-HPLC(RP-HPLC 法同时测定舒肝祛脂胶囊中 4 种大黄蒽醌的含量). *Chin J Inf TCM*(中国中医药信息杂志), 2008, 5(1): 48
- 6 HUANG Yao-guang(黄耀广), CHEN Xiu-ying(陈秀英). Determination of icariin in Huichun capsules by RP-HPLC(RP-HPLC 法测定回春胶囊中淫羊藿苷的含量). *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2008, 22(1): 52
- 7 WANG Yan-jun(王艳君), CHEN Zu-li(陈祖利), YI Zong-ming(伊宗明). Determination of emodin in Jingtianquban tablets by HPLC(景天祛斑片中大黄素的含量测定). *Chin Arch Tradit Chin Med*(中医药学刊), 2006, 11(24): 2045

(本文于 2008 年 8 月 16 日收到)