

淫羊藿总黄酮提取物的HPLC指纹图谱建立及其中8种成分的含量测定^Δ

牛晓静*, 鲁静, 孙广科, 段晓颖#, 徐立然(河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450008)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3376-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.15

摘要 目的:建立淫羊藿总黄酮提取物的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并建立同时测定其中8种成分含量的方法。方法:采用HPLC法。色谱柱为ZORBAX Eclipse SB-C₁₈,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为30℃,检测波长为270 nm,进样量为5 μL。以淫羊藿苷峰为参照峰,绘制5批样品的HPLC指纹图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)》进行相似度评价,确定共有峰。结果:5批样品的HPLC图谱中有22个共有峰,相似度均大于0.99,并指认淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I等8个共有峰。上述8种成分进样量线性范围分别为0.019 5~0.292 5 μg($r=0.999\ 9$)、0.028 2~0.423 0 μg($r=0.999\ 6$)、0.050 5~0.757 5 μg($r=0.999\ 9$)、0.066 9~1.003 5 μg($r=0.999\ 9$)、0.089 6~1.344 0 μg($r=0.999\ 9$)、0.16~2.40 μg($r=0.999\ 9$)、0.026 8~0.402 0 μg($r=0.999\ 8$)、0.027 24~0.408 60 μg($r=0.999\ 8$);定量限分别为390.00、564.00、506.00、535.20、448.00、426.68、643.20、544.80 ng/mL,检测限分别为97.50、141.00、126.25、133.80、112.00、106.67、160.80、136.20 ng/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%;加样回收率分别为97.64%~103.79% (RSD=2.00%, $n=6$)、96.41%~99.10% (RSD=1.12%, $n=6$)、96.56%~103.56% (RSD=2.67%, $n=6$)、96.10%~99.57% (RSD=1.20%, $n=6$)、99.34%~104.18% (RSD=1.70%, $n=6$)、100.35%~105.37% (RSD=1.93%, $n=6$)、98.76%~102.83% (RSD=1.60%, $n=6$)、96.30%~101.10% (RSD=1.80%, $n=6$)。结论:所建HPLC指纹图谱可为淫羊藿总黄酮提取物的质量控制提供参考;所建含量测定方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定淫羊藿总黄酮提取物中8种成分的含量。

关键词 淫羊藿总黄酮提取物;高效液相色谱法;指纹图谱;含量测定;淫羊藿属苷A;朝藿定A1;朝藿定A;朝藿定B;朝藿定C;淫羊藿苷;鼠李糖基淫羊藿次苷II;宝藿苷I

Establishment of HPLC Fingerprints of Total Flavonoid Extract from *Epimedium brevicornu* and Content Determination of 8 Components

NIU Xiaojing, LU Jing, SUN Guangke, DUAN Xiaoying, XU Liran (The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of total flavonoid extract from *Epimedium brevicornu*, and to determine the contents of 8 components. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was carried out on ZORBAX Eclipse SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30℃, and detection wavelength was set at 270 nm. The sample size was 5 μL. Using icariin peak as reference, HPLC fingerprints of 5 batches of sample were drawn. The similarity evaluation was performed by using *Similarity Evaluation System of Chromatogram Fingerprint of TCM* (2004 A edition) to determine common peaks. RESULTS: There were 22 common peaks in HPLC chromatogram of 5 batches of sample, with the similarity above 0.99. Eight peaks were identified, such as icariin A, epimedin A1, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, rhamnosy licarid II and baicin I. The linear range of eight components were 0.019 5-0.292 5 μg($r=0.999\ 9$), 0.028 2-0.423 0 μg($r=0.999\ 6$), 0.050 5-0.757 5 μg($r=0.999\ 9$), 0.066 9-1.003 5 μg($r=0.999\ 9$), 0.089 6-1.344 0 μg($r=0.999\ 9$), 0.16-2.40 μg($r=0.999\ 9$), 0.026 8-0.402 0 μg($r=0.999\ 8$), 0.027 24-0.408 60 μg($r=0.999\ 8$), respectively. The limits of quantitation were 390.00, 564.00, 506.00, 535.20, 448.00, 426.68, 643.20, 544.80 ng/mL; the limits of detection were 97.50, 141.00, 126.25, 133.80, 112.00, 106.67, 160.80, 136.20 ng/mL, respectively. RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The recoveries were 97.64%-103.79% (RSD=2.00%, $n=6$), 96.41%-99.10% (RSD=1.12%, $n=6$), 96.56%-103.56% (RSD=2.67%, $n=6$), 96.10%-99.57% (RSD=1.20%, $n=6$), 99.34%-104.18% (RSD=1.70%, $n=6$), 100.35%-105.37% (RSD=1.93%, $n=6$), 98.76%-102.83% (RSD=1.60%, $n=6$), 96.30%-101.10% (RSD=1.80%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: Established of HPLC fingerprint can provide reference for quality control of total flavonoid extract from *E. brevicornu*. Established method is simple, accurate and reproducible, and can

^Δ 基金项目:河南省基础与前沿技术研究项目(No.152300410105);河南中医学院科研苗圃工程项目(No.MP2015-03)

* 主管药师,硕士。研究方向:中药新药、质量控制。电话:0371-66283639。E-mail:niuxiaojing314@163.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:中药新技术、新剂型。电话:0371-66283639。E-mail:dxy137@sina.com

be used for simultaneous determination of 8 components in total flavonoid extract from *E. brevicornu*.

KEYWORDS Total flavonoid extract from *Epimedium brevicornu*; HPLC; Fingerprint; Content determination; Icariin A; Epimedin A1; Epimedin A; Epimedin B; Epimedin C; Icariin; Rhamnosy licarid II; Baicin I

组分中药是指由有效组分配伍而成的现代中药,是创新中药研究的一种途径,其特点是“两个相对清楚”,即物质基础相对清楚及其作用机制相对清楚;组分中药具有满足现代药物质量可控要求,安全性、有效性证据较充分的特征,既保持了中药剂型的优势,又提高了中药制剂的质控水平^[1-4]。本课题组对益元康方按照组分中药的研究思路开展基础研究,就该方组成药材之一淫羊藿中主要有效成分黄酮类成分进行提取、分离、纯化,得到淫羊藿总黄酮提取物。本研究中,本课题组采用高效液相色谱法(HPLC)建立了淫羊藿总黄酮提取物的指纹图谱,并对其中8种成分的含量进行了测定,旨在为有效控制其质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括四元泵、二极管阵列检测器、在线脱气装置、自动进样器、Open1 AB色谱工作站(美国安捷伦公司);CP225D型电子天平、BSA224S-CW型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

淫羊藿总黄酮提取物(河南中医药大学第一附属医院中药制剂实验室自制,编号:G-1、G-2、G-3、G-4、G-5,总黄酮平均含量:71.6%);淫羊藿苷对照品(批号:110737-200415,供含量测定用)、宝藿苷I对照品(批号:111852-201102,供含量测定用)均由中国食品药品检定研究院提供;淫羊藿属苷A对照品(批号:151023,纯度:≥98%)、朝藿定A1对照品(批号:16071302,纯度:≥98%)、朝藿定A对照品(批号:130520,纯度:≥98%)、朝藿定B对照品(批号:130518,纯度:≥98%)、朝藿定C对照品(批号:130601,纯度:≥98%)、鼠李糖基淫羊藿次苷II对照品(批号:151023,纯度:≥98%)均由成都普菲德生物技术有限公司提供;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱(0~8 min, 15% A→20% A; 8~25 min, 20% A→23% A; 25~40 min, 23% A→30% A; 40~50 min, 30% A→32% A; 50~68 min, 32% A→35% A; 68~75 min, 35% A→45% A; 75~80 min, 45% A→60% A; 80~85 min, 60% A→15% A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:270 nm;进样量:5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 单一对照品贮备液 精密称取淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I对照品各适量,分别置于

25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释制成质量浓度分别为0.390、0.282、1.010、1.338、1.792、1.600、0.268、0.908 mg/mL的单一对照品贮备液。

2.2.2 混合对照品溶液 分别精密量取“2.2.1”项下单一对照品贮备液各适量,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得含淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I质量浓度分别为19.50、28.20、50.50、66.90、89.60、160.00、26.80、27.24 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取样品20 mg,精密称定,置于锥形瓶中,加甲醇20 mL振摇使溶解,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度的试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(编号:G-1)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以淫羊藿苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(编号:G-1)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以淫羊藿苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于4%(n=7),表明供试品溶液于室温下放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取样品(编号:G-1)适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以淫羊藿苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于5%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4 HPLC指纹图谱的生成与相似度评价、共有峰相关分析

2.4.1 HPLC指纹图谱的生成 取5批样品各适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)》对5批样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

2.4.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)》,以样品的HPLC对照指纹图谱为对照,进行整体相似度评价。结果显示,5批样品的相似度均大于0.99,表明各批样品间差异较小,质量稳定性良好,详见表1。

2.4.3 共有峰的指认及相关分析 5批样品有22个共有峰,其峰面积合计占色谱峰总面积的90%以上。通过

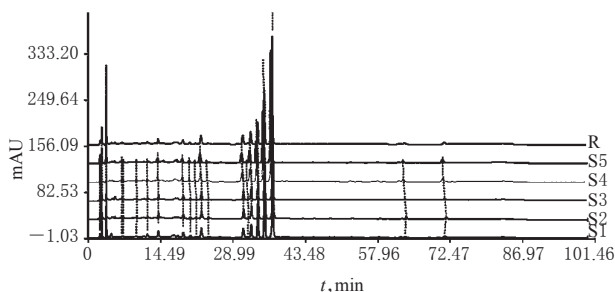


图1 5批样品的HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superposed fingerprints of 5 batches of samples

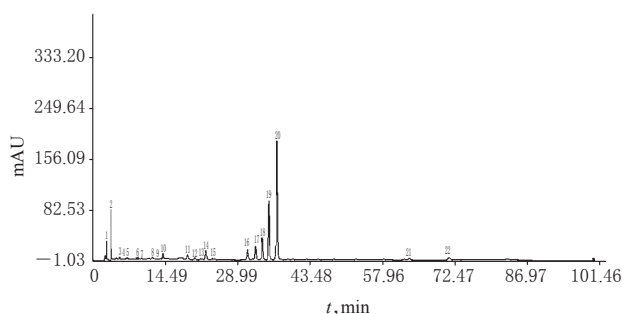


图2 样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprint of sample

表1 5批样品相似度评价结果

Tab 1 Results of similarity evaluation for 5 batches of samples

| 编号 | G-1 | G-2 | G-3 | G-4 | G-5 | 对照(R) |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G-1 | 1.000 | 0.995 | 0.995 | 0.997 | 0.995 | 0.997 |
| G-2 | 0.995 | 1.000 | 0.999 | 0.994 | 0.994 | 0.996 |
| G-3 | 0.995 | 0.999 | 1.000 | 0.995 | 0.996 | 0.997 |
| G-4 | 0.997 | 0.994 | 0.995 | 1.000 | 0.999 | 1.000 |
| G-5 | 0.995 | 0.994 | 0.996 | 0.999 | 1.000 | 0.999 |
| 对照(R) | 0.997 | 0.996 | 0.997 | 1.000 | 0.999 | 1.000 |

与对照品HPLC图谱比对, 指出了8个共有峰分别为淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I。其中, 20号峰为淫羊藿苷峰, 由于其分离度较好、响应值较高, 故以其为参照峰, 计算其他峰相对于淫羊藿苷峰的相对保留时间和相对峰面积, 详见表2、表3。

2.5 含量测定

2.5.1 系统适用性 取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图3。由图3可知, 8种成分峰分离度均大于1.5, 理论板数均大于5000。

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液1、2、5、10、15 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以各待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 回归方程与线性范围见表4。

2.5.3 定量限与检测限考察 分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 按“2.1”项下色谱条

表2 5批样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms from 5 batches of samples

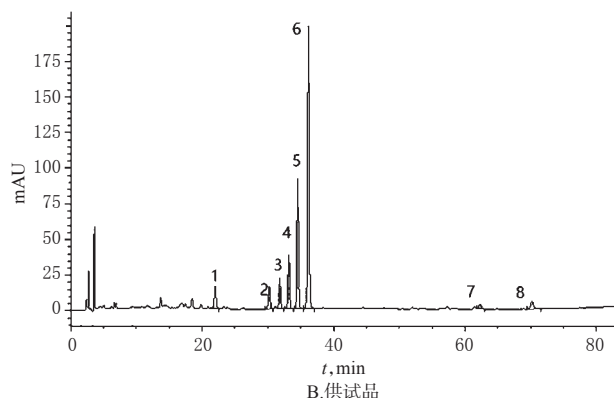
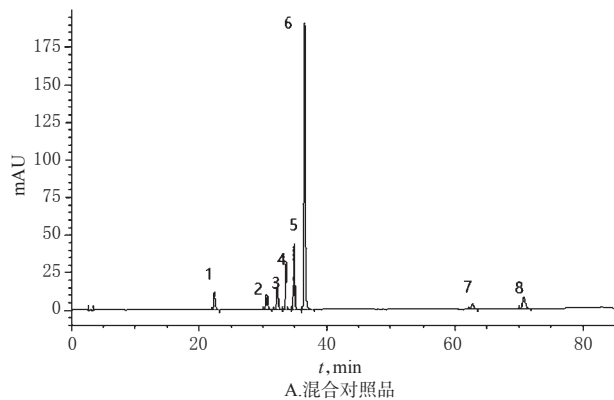
| 峰号 | G-1 | G-2 | G-3 | G-4 | G-5 |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 0.064 1 | 0.065 1 | 0.065 2 | 0.063 8 | 0.064 3 |
| 2 | 0.067 6 | 0.066 1 | 0.068 1 | 0.067 2 | 0.067 8 |
| 3 | 0.074 1 | 0.072 1 | 0.075 2 | 0.074 7 | 0.075 6 |
| 4 | 0.099 7 | 0.097 8 | 0.098 0 | 0.097 0 | 0.097 6 |
| 5 | 0.183 7 | 0.180 2 | 0.184 3 | 0.180 2 | 0.184 5 |
| 6 | 0.189 9 | 0.184 8 | 0.186 7 | 0.183 9 | 0.189 7 |
| 7 | 0.262 6 | 0.258 4 | 0.264 3 | 0.260 2 | 0.262 5 |
| 8 | 0.323 1 | 0.313 3 | 0.322 2 | 0.318 5 | 0.321 5 |
| 9 | 0.386 1 | 0.374 9 | 0.395 7 | 0.383 4 | 0.380 0 |
| 10 | 0.524 7 | 0.503 8 | 0.520 2 | 0.507 8 | 0.515 2 |
| 11 | 0.555 6 | 0.538 4 | 0.558 5 | 0.545 6 | 0.551 5 |
| 12 | 0.593 7 | 0.571 1 | 0.595 0 | 0.576 2 | 0.590 3 |
| 13 | 0.607 6 | 0.604 9 | 0.624 1 | 0.610 3 | 0.612 4 |
| 14 | 0.663 4 | 0.634 6 | 0.650 4 | 0.652 3 | 0.664 4 |
| 15 | 0.867 6 | 0.819 4 | 0.859 7 | 0.829 3 | 0.829 1 |
| 16 | 0.865 7 | 0.845 6 | 0.893 0 | 0.854 1 | 0.855 8 |
| 17 | 0.891 8 | 0.860 4 | 0.911 0 | 0.874 6 | 0.882 7 |
| 18 | 0.933 7 | 0.896 1 | 0.920 6 | 0.908 1 | 0.931 3 |
| 19 | 0.972 4 | 0.909 9 | 0.975 3 | 0.943 4 | 0.961 9 |
| 20(参照) | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 21 | 1.721 2 | 1.674 5 | 1.731 3 | 1.712 2 | 1.747 4 |
| 22 | 1.936 0 | 1.892 5 | 1.940 3 | 1.909 6 | 1.941 4 |

表3 5批样品HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 3 Relative peak areas of common peaks in HPLC chromatograms from 5 batches of samples

| 峰号 | G-1 | G-2 | G-3 | G-4 | G-5 |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 0.008 2 | 0.008 1 | 0.009 2 | 0.008 2 | 0.009 6 |
| 2 | 0.023 0 | 0.024 1 | 0.024 0 | 0.022 4 | 0.022 9 |
| 3 | 0.041 2 | 0.041 9 | 0.042 1 | 0.041 4 | 0.043 8 |
| 4 | 0.093 4 | 0.084 7 | 0.087 8 | 0.083 2 | 0.084 1 |
| 5 | 0.012 3 | 0.010 8 | 0.011 7 | 0.012 3 | 0.012 3 |
| 6 | 0.006 5 | 0.006 4 | 0.006 4 | 0.006 1 | 0.007 1 |
| 7 | 0.005 2 | 0.005 9 | 0.005 9 | 0.005 8 | 0.005 7 |
| 8 | 0.009 4 | 0.009 1 | 0.010 9 | 0.009 3 | 0.009 2 |
| 9 | 0.035 5 | 0.034 4 | 0.032 6 | 0.034 3 | 0.034 8 |
| 10 | 0.040 8 | 0.044 0 | 0.043 2 | 0.039 9 | 0.041 3 |
| 11 | 0.017 7 | 0.016 6 | 0.016 8 | 0.016 9 | 0.016 1 |
| 12 | 0.005 4 | 0.005 3 | 0.005 9 | 0.005 6 | 0.004 8 |
| 13 | 0.108 7 | 0.096 7 | 0.097 7 | 0.094 3 | 0.096 1 |
| 14 | 0.006 7 | 0.007 0 | 0.006 8 | 0.006 6 | 0.007 4 |
| 15 | 0.106 2 | 0.102 5 | 0.103 0 | 0.103 7 | 0.099 0 |
| 16 | 0.008 3 | 0.008 1 | 0.007 2 | 0.006 7 | 0.006 9 |
| 17 | 0.131 6 | 0.121 2 | 0.121 6 | 0.120 0 | 0.115 0 |
| 18 | 0.232 9 | 0.210 7 | 0.206 6 | 0.205 2 | 0.196 8 |
| 19 | 0.531 4 | 0.489 5 | 0.474 2 | 0.465 7 | 0.449 5 |
| 20(参照) | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 | 1.000 0 |
| 21 | 0.020 9 | 0.023 9 | 0.021 3 | 0.021 2 | 0.025 2 |
| 22 | 0.053 8 | 0.049 7 | 0.058 7 | 0.058 9 | 0.049 2 |

件进样测定, 记录峰面积, 以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果, 淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I的定量限分别为390.00、564.00、506.00、



注:1.淫羊藿属苷A;2.朝藿定A1;3.朝藿定A;4.朝藿定B;5.朝藿定C;6.淫羊藿苷;7.鼠李糖基淫羊藿次苷II;8.宝藿苷I

Note: 1. icariin A; 2. epimedin A1; 3. epimedin A; 4. epimedin B; 5. epimedin C; 6. icariin; 7. rhamnosy licaridid II; 8. baicin I

图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

表4 回归方程与线性范围

Tab 4 Regression equation and linear range

| 待测成分 | 回归方程 | r | 线性范围, μg |
|-------------|----------------------|---------|---------------------|
| 淫羊藿属苷A | $y=1.997.6x+0.744$ | 0.999 9 | 0.019 5~0.292 5 |
| 朝藿定A1 | $y=1.427.4x+0.667$ | 0.999 6 | 0.028 2~0.423 0 |
| 朝藿定A | $y=1.577.8x+1.554.6$ | 0.999 9 | 0.050 5~0.757 5 |
| 朝藿定B | $y=1.709x+10.487$ | 0.999 9 | 0.066 9~1.003 5 |
| 朝藿定C | $y=1.628.8x+6.319.9$ | 0.999 9 | 0.089 6~1.344 0 |
| 淫羊藿苷 | $y=1.860x-2.379.8$ | 0.999 9 | 0.16~2.40 |
| 鼠李糖基淫羊藿次苷II | $y=1.780.6x+0.005.8$ | 0.999 8 | 0.026 8~0.402 0 |
| 宝藿苷I | $y=3.288x-8.705.6$ | 0.999 8 | 0.027 24~0.408 60 |

535.20、448.00、426.68、643.20、544.80 ng/mL, 检测限分别为97.50、141.00、126.25、133.80、112.00、106.67、160.80、136.20 ng/mL。

2.5.4 精密度试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(编号:G-5)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I峰面积的RSD分别为1.15%、1.15%、0.15%、0.13%、0.08%、0.10%、0.33%、1.46%($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(编号:G-5)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h时按

“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I峰面积的RSD分别为1.31%、1.25%、0.15%、0.12%、0.08%、0.09%、0.31%、1.31%($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置12 h内基本稳定。

2.5.6 重复性试验 取样品(编号:G-5)适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I的平均含量分别为2.94%、4.09%、4.76%、7.10%、17.33%、34.49%、0.89%、1.01%,RSD分别为2.04%、2.97%、2.93%、2.31%、2.16%、2.41%、1.61%、0.71%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.5.7 加样回收率试验 取已知含量的样品(编号:G-5)10 mg,共6份,分别加入“2.2.1”项下单一对照品贮备液(淫羊藿属苷A、朝藿定A1、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、鼠李糖基淫羊藿次苷II、宝藿苷I对照品贮备液分别加入750 μL 、1.5 mL、400 μL 、550 μL 、950 μL 、2 mL、330 μL 、110 μL),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表5。

表5 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 5 Results of recovery tests ($n=6$)

| 待测成分 | 样品含量, mg | 加入量, mg | 测得量, mg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % |
|--------|----------|---------|---------|----------|------------|--------|
| 淫羊藿属苷A | 0.294 9 | 0.292 5 | 0.590 0 | 100.89 | 101.01 | 2.00 |
| | 0.300 2 | 0.292 5 | 0.603 8 | 103.79 | | |
| | 0.295 8 | 0.292 5 | 0.590 5 | 100.75 | | |
| | 0.295 2 | 0.292 5 | 0.593 8 | 102.09 | | |
| | 0.295 8 | 0.292 5 | 0.581 4 | 97.64 | | |
| | 0.295 4 | 0.292 5 | 0.590 6 | 100.92 | | |
| 朝藿定A1 | 0.410 2 | 0.423 0 | 0.826 0 | 98.30 | 97.85 | 1.12 |
| | 0.417 6 | 0.423 0 | 0.832 1 | 97.99 | | |
| | 0.411 5 | 0.423 0 | 0.819 3 | 96.41 | | |
| | 0.410 6 | 0.423 0 | 0.829 8 | 99.10 | | |
| | 0.411 5 | 0.423 0 | 0.828 9 | 98.68 | | |
| | 0.410 5 | 0.423 0 | 0.819 3 | 96.64 | | |
| 朝藿定A | 0.477 4 | 0.404 0 | 0.894 7 | 103.29 | 100.76 | 2.67 |
| | 0.486 0 | 0.404 0 | 0.897 1 | 101.76 | | |
| | 0.478 9 | 0.404 0 | 0.869 0 | 96.56 | | |
| | 0.477 9 | 0.404 0 | 0.883 4 | 100.37 | | |
| | 0.478 9 | 0.404 0 | 0.897 3 | 103.56 | | |
| | 0.479 8 | 0.404 0 | 0.879 8 | 99.01 | | |
| 朝藿定B | 0.712 1 | 0.735 9 | 1.428 5 | 97.35 | 97.38 | 1.20 |
| | 0.714 9 | 0.735 9 | 1.427 2 | 96.79 | | |
| | 0.714 3 | 0.735 9 | 1.421 5 | 96.10 | | |
| | 0.712 8 | 0.735 9 | 1.429 1 | 97.34 | | |
| | 0.714 3 | 0.735 9 | 1.447 0 | 99.57 | | |
| | 0.723 0 | 0.735 9 | 1.437 8 | 97.13 | | |
| 朝藿定C | 1.738 2 | 1.702 4 | 3.463 9 | 101.37 | 100.96 | 1.70 |
| | 1.769 4 | 1.702 4 | 3.469 9 | 99.89 | | |
| | 1.743 4 | 1.702 4 | 3.434 6 | 99.34 | | |
| | 1.739 9 | 1.702 4 | 3.447 8 | 100.32 | | |

续表5

Continued tab 5

| 待测成分 | 样品含量, mg | 加入量, mg | 测得量, mg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % |
|------------|-------------|------------|------------|-------------|---------------|-----------|
| 淫羊藿苷 | 1.743 4 | 1.702 4 | 3.516 9 | 104.18 | 103.07 | 1.93 |
| | 1.756 2 | 1.720 4 | 3.487 6 | 100.64 | | |
| | 3.459 4 | 3.200 0 | 6.731 7 | 102.26 | | |
| | 3.521 5 | 3.200 0 | 6.872 8 | 104.73 | | |
| | 3.469 8 | 3.200 0 | 6.681 0 | 100.35 | | |
| | 3.462 9 | 3.200 0 | 6.711 0 | 101.50 | | |
| | 3.469 8 | 3.200 0 | 6.841 5 | 105.37 | | |
| | 3.487 6 | 3.200 0 | 6.821 5 | 104.18 | | |
| | 0.089 3 | 0.088 4 | 0.178 1 | 100.45 | | |
| | 0.090 9 | 0.088 4 | 0.180 8 | 101.70 | | |
| 鼠李糖基淫羊藿次苷Ⅱ | 0.089 5 | 0.088 4 | 0.176 8 | 98.76 | 100.75 | 1.60 |
| | 0.089 4 | 0.088 4 | 0.177 0 | 99.10 | | |
| | 0.089 5 | 0.088 4 | 0.180 4 | 102.83 | | |
| | 0.089 9 | 0.088 4 | 0.179 8 | 101.70 | | |
| | 0.101 3 | 0.099 9 | 0.199 8 | 98.60 | | |
| | 0.103 1 | 0.099 9 | 0.204 0 | 101.00 | | |
| | 0.101 6 | 0.099 9 | 0.200 1 | 98.60 | | |
| | 0.101 4 | 0.099 9 | 0.200 3 | 99.00 | | |
| | 0.101 6 | 0.099 9 | 0.197 8 | 96.30 | | |
| | 0.102 1 | 0.099 9 | 0.203 1 | 101.10 | | |
| 宝藿苷Ⅰ | 0.101 3 | 0.099 9 | 0.199 8 | 98.60 | 99.10 | 1.80 |
| | 0.103 1 | 0.099 9 | 0.204 0 | 101.00 | | |
| | 0.101 6 | 0.099 9 | 0.200 1 | 98.60 | | |
| | 0.101 4 | 0.099 9 | 0.200 3 | 99.00 | | |
| | 0.101 6 | 0.099 9 | 0.197 8 | 96.30 | | |
| | 0.102 1 | 0.099 9 | 0.203 1 | 101.10 | | |

2.5.8 样品含量测定 取5批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并以外标法计算其中8种成分的含量,结果见表6。

表6 样品含量测定结果($n=3, \%$)Tab 6 Results of content determination of samples ($n=3, \%$)

| 待测成分 | 编号 | | | | | 平均含量 | RSD |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | G-1 | G-2 | G-3 | G-4 | G-5 | | |
| 淫羊藿属苷A | 3.09 | 2.88 | 2.96 | 2.91 | 2.94 | 2.96 | 2.73 |
| 朝藿定A1 | 4.16 | 4.11 | 4.39 | 4.44 | 4.09 | 4.24 | 3.88 |
| 朝藿定A | 4.68 | 4.46 | 4.71 | 4.81 | 4.76 | 4.68 | 2.87 |
| 朝藿定B | 7.71 | 7.21 | 7.43 | 7.63 | 7.10 | 7.42 | 3.53 |
| 朝藿定C | 18.64 | 17.67 | 18.02 | 18.30 | 17.33 | 17.99 | 2.86 |
| 淫羊藿苷 | 32.82 | 31.82 | 33.41 | 34.60 | 34.49 | 33.43 | 3.49 |
| 鼠李糖基淫羊藿次苷Ⅱ | 0.86 | 0.85 | 0.91 | 0.90 | 0.89 | 0.88 | 2.93 |
| 宝藿苷Ⅰ | 0.92 | 0.93 | 0.92 | 1.01 | 1.01 | 0.96 | 4.97 |

3 讨论

本课题组前期通过均匀设计^[5],发现以60%乙醇提取淫羊藿总黄酮的效果最佳,由于淫羊藿总黄酮提取物中存在大量杂质,故通过大孔吸附树脂HPD-400进行纯化除杂后,可获得纯度较高的总黄酮,经测定其总黄酮平均含量为71.6%。

本试验参考文献[6-10],采用HPLC法对5批已纯化的淫羊藿总黄酮提取物建立了指纹图谱,发现有22个共有峰,各批样品相似度均在0.99以上,质量稳定性良好。为进一步比较各批样品间的含量差异,选择标定指认的8个共有峰,建立含量测定方法。含量测定结果显示,5批样品中8种成分含量的RSD均小于5%,表明5批样品含量差异不大,提取及纯化工艺稳定、可行。

综上所述,所建HPLC指纹图谱可为淫羊藿总黄酮提取物的质量控制提供参考;所建含量测定方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定淫羊藿总黄酮提取物中8种成分的含量。

参考文献

- [1] 张伯礼,王永炎. 方剂关键科学问题的基础研究:以组分配伍研制现代中药[J]. 中国天然药物, 2005, 3(5): 258-261.
- [2] WANG Y, FAN XH, QU HB, et al. Strategies and techniques for multi-component drug design from medicinal herbs and traditional Chinese medicine[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(12): 1356-1362.
- [3] ZHANG JH, ZHU Y, FAN XH, et al. Efficacy-oriented compatibility for component-based Chinese medicine[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(6): 654-658.
- [4] 严红梅,陈小云,张振海,等. 基于中药组分和“组分结构”理论的中药研究模式的探讨[J]. 中草药, 2015, 46(8): 1103-1110.
- [5] 牛晓静,曹英杰,鲁静,等. 淫羊藿黄酮类成分的多指标均匀设计提取工艺研究[J]. 医药导报, 2016, 35(4): 393-396.
- [6] 裴利宽,黄文华,何天谷,等. 中药淫羊藿主要资源种类药材质量的系统研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21): 2217-2222.
- [7] 裴利宽,郭宝林,黄文华. 淫羊藿属主要资源种类的HPLC指纹图谱特征和种类鉴定[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1662-1668.
- [8] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [9] 程岩,王乃利,王新峦,等. 朝鲜淫羊藿的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(10): 644-657.
- [10] 李英,张小龙,杨晶,等. 淫羊藿中黄酮类成分研究[J]. 中草药, 2015, 46(14): 2057-2061.

(收稿日期:2018-05-23 修回日期:2018-10-22)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅