二仙汤中总黄酮和淫羊藿苷的测定

年 华，张巧艳，郑汉臣，秦路平
（第二军医大学药学院，上海 200433）

二仙汤由淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏、知母 6 味中药组成，主要用于更年期综合征和骨质疏松的治疗，临床应用疗效确切。处方中淫羊藿为君药，具有补肾壮阳的功效，黄酮类成分为其主要有效成分，而淫羊藿苷为主要活性成分。淫羊藿苷的测定方法有毛细管电泳法[1]、薄层扫描法[2]和 HPLC 法[3]。由于复方成分十分复杂，常用检测方法干扰较大。因此本实验采用紫外分光光度法和高效液相色谱法分别测定了二仙汤中总黄酮和淫羊藿苷，为复方质量控制和工艺研究提供了依据。

1 仪器与试剂

Shimadzu 高效液相色谱系统，SPD—10A 紫外可见光检测器，LC—10ATVP（恒流泵）。UV—2450 紫外可见分光光度仪（Shimadzu）。Branson8510 超声提取器。淫羊藿苷（批号：0730-200111）购自中国药品生物制品检定所，二仙汤由本院生药教研室提供。试剂均为分析纯，水为重蒸水。

2 总黄酮的测定

2.1 溶液的制备：精密称取干燥至恒重的淫羊藿苷对照品 5 mg，置 25 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声使之溶解，用甲醇稀释至刻度，制成 0.2 mg/mL 淫羊藿苷对照品溶液。供试品溶液：精密称量组方所需 6 味药材各 1 g，加入 60 mL 蒸馏水，煮沸提取 2 次，每次 2 h，滤过，合并滤液，冷却，浓缩定容至 100 mL，即得。检测时用甲醇稀释 100 倍，作为供试品溶液。

2.2 标准曲线制备：精密称取干燥至恒重的淫羊藿苷对照品 5 mg，置 25 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声使之溶解，用甲醇稀释至刻度，摇匀。精密吸取上述溶液 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 于 50 mL 量瓶中，用甲醇加至刻度，摇匀。分别精密量取 10.0 mL，各加入 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 1.0 mL，摇匀，于 70 ℃恒温水浴中放置 10 min 使充分显色，取出后室温放置 15 min，以第 1 份试样为空白，照分光光度法，在 410 nm 波长处测定吸光度。以淫羊藿苷质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，并进行线性回归，得回归方程：$C=87.325\ A-0.171\ 4$，$r=0.999\ 9$。

2.3 回收率试验：精密量取 5 份已知总黄酮量的样品溶液 1 mL，各加入 1.10 mg 淫羊藿苷对照品，稀释后测定，计算回收率。结果平均回收率为 100.27%，RSD 为 1.36%（$n=5$）。

2.4 样品的测定：将二仙汤用甲醇稀释 100 倍后，作为供试品溶液。量取 10 mL，精密加入 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 1 mL，使摇匀，于 70 ℃恒温水浴放置 10 min，取出后室温放置 15 min，以试剂为空白，按比色法规定进行检查，在 410 nm 波长处测定吸光度。按照回归方程计算，结果见表 1。

表 1 二仙汤中总黄酮和淫羊藿苷测定结果

Table 1 Total flavonoids and icariin in Erxian Decoction

批 号	总黄酮/(mg·mL^{-1})	淫羊藿苷/(μg·mL^{-1})
1	1.16	92.7
2	1.22	93.2
3	1.18	92.9
4	1.17	93.4
5	1.19	92.3

3 淫羊藿苷的测定

3.1 色谱条件：色谱柱：Hypersil-BDS C_{18}（200 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水-冰醋酸（80∶70∶2）；体积流量：1.0 mL/min；检测波长：270 nm；灵敏度：0.08 AUFS。

3.2 溶液制备：精密称量组方所需 6 味药材各 1 g，加入 60 mL 蒸馏水，煮沸提取 2 h，提取液冷却浓缩后定容至 100 mL，即得二仙汤。检测时用蒸馏水稀释 10 倍后，摇匀，微孔滤膜滤过，滤液为供试品溶液。按照处方比例，除去淫羊藿药材，相同制备方法制得阴性溶液。

3.3 标准曲线的制备：精密称量干燥至恒重的淫羊藿苷对照品适量，以流动相制成 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0 μg/mL 淫羊藿苷对照品系列

收稿日期：2005-04-13
基金项目：国家自然科学基金资助项目（90209043）
作者简介：年 华（1978—），男（纳西族），上海市人，药师，博士研究生，研究方向：生药学。
Tel：（021）25074578 （021）55833965 E-mail：jackynian@sohu.com

溶液，取 20 μL 注入色谱仪，测定。以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标，进行线性处理，得回归方程 $Y=19\,055\,X-278.08$，$r=0.999\,9$。结果表明，淫羊藿苷在 0.51～15.20 μg/mL 内呈良好的线性关系。最低检测质量浓度为 0.05 μg/mL。

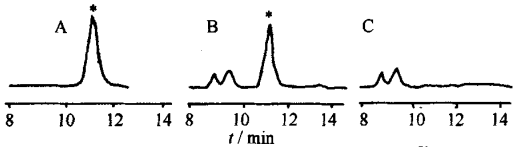
3.4 精密度试验：精密吸取淫羊藿苷对照品溶液，重复进样 5 次，测峰面积，结果其 RSD 为 0.56%。

3.5 重现性试验：取同一批号的样品 5 份，制备供试品溶液，进样，测定，计算淫羊藿苷的质量浓度，结果其 RSD 为 0.97%。

3.6 稳定性试验：取配制好的待测供试品溶液，每隔 4 h 测定 1 次。结果表明淫羊藿苷的面积在 48 h 内保持稳定，RSD 为 1.2%。

3.7 回收率试验：精密量取含淫羊藿苷 9.0 μg/mL 样品适量，各 5 份，分别精密加入 4.00 μg 淫羊藿苷对照品，在上述色谱条件下测定并计算回收率。结果平均回收率为 100.29%，RSD 为 1.12%。

3.8 样品的测定：将二仙汤用蒸馏水稀释 10 倍后，摇匀，微孔滤膜滤过，滤液为供试品溶液。精密吸取 20 μL，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定。根据标准曲线计算淫羊藿苷，结果见表 1。色谱图见图 1。



* -淫羊藿苷

* -icariin

图 1 淫羊藿苷对照品(A)、二仙汤(B)和缺淫羊藿阴性对照(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of icariin reference substance (A), Erxian Decoction (B), and negative sample (C)

4 讨论

4.1 黄酮显色剂的选择：由于复方成分复杂，紫外吸收相互干扰大，必须运用显色剂。比较了亚硝酸钠-硝酸铝法、硝酸铝、三氯化铝显色系统，发现只有氯化铝显色后，峰形稳定且回收率可靠。显色时间和显色剂用量反复考察后，发现在本法显色剂用量下，对照品和供试品溶液显色后 15～40 min 内显色稳定，吸光度变化不大。

4.2 紫外检测波长的选择：在控制的显色时间内将对照品溶液与供试品液在 200～600 nm 波长进行扫描。结果均在 410 nm 波长处有良好的吸收峰，且阴性对照在此波长处无干扰。故选择 410 nm 波长处测定总黄酮。

4.3 高效液相色谱条件的选择：对淫羊藿苷对照品在 200～600 nm 波长进行紫外扫描，淫羊藿苷在 270 nm 处有最大吸收，并且供试品色谱中其他组分在淫羊藿苷出峰处可以达到基线分离，且灵敏度高，故确定 270 nm 作为测定波长。通过对流动相分离效果的反复比较，本实验的色谱条件分离效果最佳，杂质干扰最少。

4.4 本研究采用紫外分光光度法和高效液相色谱法直接测定复方二仙汤中总黄酮和淫羊藿苷，无需进一步纯化提取过程。该法简便易行，快速，结果准确可靠，可为二仙汤质量控制标准的制定提供参考。

References:

[1] Chai Y, Ji S, Zhang G *et al*. Determination of icariin in traditional Chinese medicine by capillary zone electrophoresis [J]. *Biomed Chromatogr*, 1999, 13 (5): 373-375.

[2] Gao S Q, Fu D X, Song Y H, *et al*. Determination of icariin in Huozhen Capsules by TLC scanning [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1999, 34 (12): 843-845.

[3] Zhang G G, Zeng H, Xu S X. Quantitative determination of icariin in "Tangzhi Shuangjiang Cha" by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2001, 19 (4): 365-366.

羊栖菜多糖酶法提取工艺研究

张华芳，金京顺，周来温，沈 澄

(绍兴文理学院 医学院，浙江 绍兴 312000)

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setchell 习称小叶海藻，其干燥藻体全体入药，称为海藻，具有消痰软坚、利水消肿的功效。现代药理研究表明，羊栖菜有增强免疫功能、降胆固醇、抗肿瘤等作

收稿日期：2005-04-17
基金项目：浙江省教育厅项目(20031130)
作者简介：张华芳(1976—)，女，浙江绍兴人，讲师，硕士，主要从事天然药物的研究和开发工作。E-mail: huafang_zhang@hotmail.com