

引用:李琴雯,易方,刘会. 疏肝健脾解毒方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定[J]. 湖南中医杂志,2022,38(11):188-191.

疏肝健脾解毒方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定

李琴雯,易方,刘会

(湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙,410006)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱(HPLC)法测定疏肝健脾解毒方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。方法:采用HPLC法,以依利特Supersil ODS-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)为色谱柱,以乙腈-0.2%甲酸溶液为流动相梯度洗脱(0~23 min,12%乙腈;23~65 min,12%~26%乙腈),流速为1.0 ml/min,柱温为30℃,检测波长为260 nm。结果:经方法学验证,毛蕊异黄酮葡萄糖苷在7.2~43.2 μg(R²=0.9998)范围内线性关系良好,精密度、稳定性和重复性试验的RSD均<2.0%(n=6),加样回收率为98.87%(RSD为1.79%)。结论:本研究建立的含量测定方法简便,结果准确可靠,适用于疏肝健脾解毒方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的测定,可为其质量标准的深入研究提供依据。

[关键词] 疏肝健脾解毒方;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;含量测定;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.11.043

Content determination of calycosin glucoside in liver-soothing, spleen-strengthening, and detoxicating prescription

LI Qinwen, YI Fang, LIU Hui

(The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the content of calycosin glucoside in liver-soothing, spleen-strengthening, and detoxicating prescription. Methods: HPLC was performed on an Elite Supersil ODS-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.2% formic acid solution for gradient elution (0-23 minutes: 12% acetonitrile; 23-65 minutes: 12%-26% acetonitrile), at a flow rate of 1.0 ml/min, a column temperature of 30℃, and a detection wavelength of 260 nm. Results: Methodological validation showed that calycosin glucoside had a good linear relationship within the range of 7.2~43.2 μg (R²=0.9998), and precision, stability, and reproducibility tests had a relative standard deviation (RSD) of <2.0% (n=6), with a recovery rate of 98.87% (RSD=1.79%). Conclusion: The method for content determination established in this study is simple and convenient with accurate and reliable results and is thus suitable for determining the content of calycosin glucoside in liver-soothing, spleen-strengthening, and detoxicating prescription, which provides a basis for in-depth research on quality standard.

[Keywords] liver-soothing, spleen-strengthening, and detoxicating prescription; calycosin glucoside; content determination; high-performance liquid chromatography

疏肝健脾解毒方是在全国著名中医肿瘤专家、国医大师潘敏求教授的指导下,全面凝练总结我院肿瘤中心治疗乳腺癌的临床经验而形成的处方。潘教授在长期的临床实践过程中,紧扣

基金项目:湖南省中医药科研计划青年项目(2021250)
第一作者:李琴雯,女,硕士,主管中药师,研究方向:医院制剂生产与研发
通信作者:刘会,女,副主任药师,研究方向:医院制剂生产与研发,E-mail:1208728426@qq.com

乳腺癌的核心病机,不断对本方进行优化和调整,形成了我院治疗乳腺癌的特色名方。临床研究发现,运用疏肝健脾解毒方治疗乳腺癌可减轻患者症状,提高患者生活质量,延长生存期^[1]。目前对该方的研究主要集中在临床应用和作用机制方面^[2-5],其质量控制方面的研究尚属空白。而现行的质量标准也仅采用薄层色谱法对部分药味进行鉴别,专属性较低,缺少方中有效成分的含量控制。为了有效控制和评价疏肝健脾解毒方的质量,确保用药安全,亟需提高该药的质量标准。本研究采用高效液相色谱法(HPLC),测定疏肝健脾解毒方中君药黄芪的主要有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量,并对其进行方法学验证研究,以期为该制剂质量标准的提升及进一步开发提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Aigent-1260 高效液相色谱仪(安捷伦仪器设备有限公司),AL204 电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司),Qoption-Q 超纯水仪(英国 ELGA LabWaters),DK-98-II A 电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂 疏肝健脾解毒方(自制颗粒,10 g/袋);毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201606,中国食品药品检定研究院);乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);其余试剂为分析纯;实验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为依利特 Supersil ODS-

C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);以乙腈-0.2%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱(0~23 min、12%~12%乙腈,23~65 min、12%~26%乙腈),流速为1.0 ml/min,柱温为30℃,检测波长为260 nm,进样量10 μl。

2.2 对照品溶液制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品3.6 mg,置100 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成每1 ml含毛蕊异黄酮葡萄糖苷36.0 μg的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取疏肝健脾解毒方颗粒1袋,研细,精密称定10.0024 g,置圆底烧瓶中,精密量取甲醇50 ml并称定重量,加热回流4 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按照配方,取除黄芪以外的其他药材进行提取、干燥、制粒,将所得产品按2.3项下的方法进行处理,得到阴性对照溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 分别吸取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液、疏肝健脾解毒方供试品溶液和疏肝健脾解毒方阴性对照溶液10 μl,按照2.1项下方法检测,结果表明,疏肝健脾解毒方、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 t_R37.98 min 均有吸收峰,通过改变流动相比比例和流速,该峰依然重合,而疏肝健脾解毒方阴性供试品溶液无干扰,说明疏肝健脾解毒方中含有的毛蕊异黄酮葡萄糖苷来源于黄芪,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为疏肝健脾解毒方质量控制成分具有较好的专属性。(见图1~3)

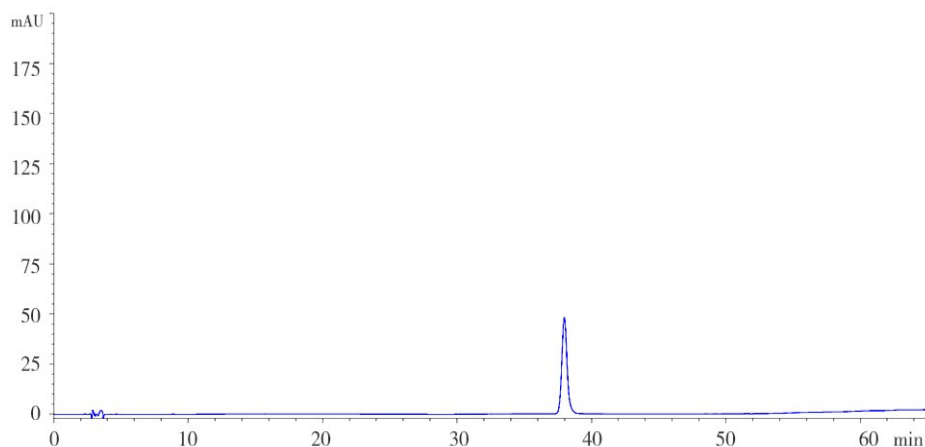


图1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 HPLC 色谱图

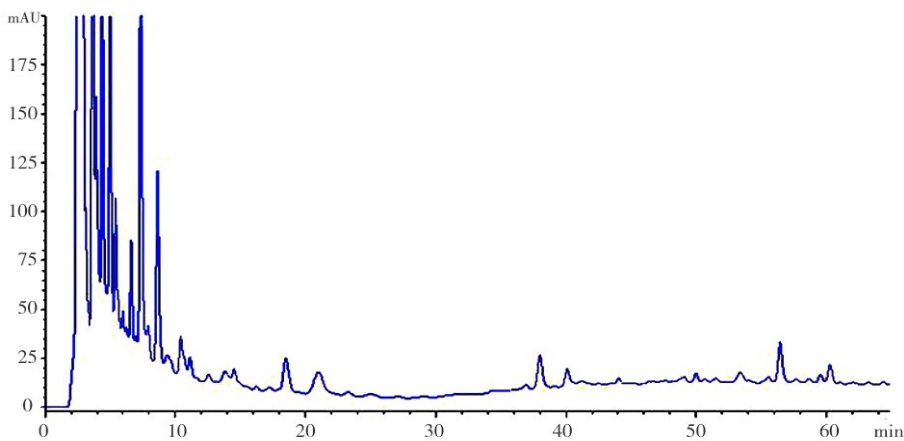


图 2 疏肝健脾解毒方 HPLC 色谱图

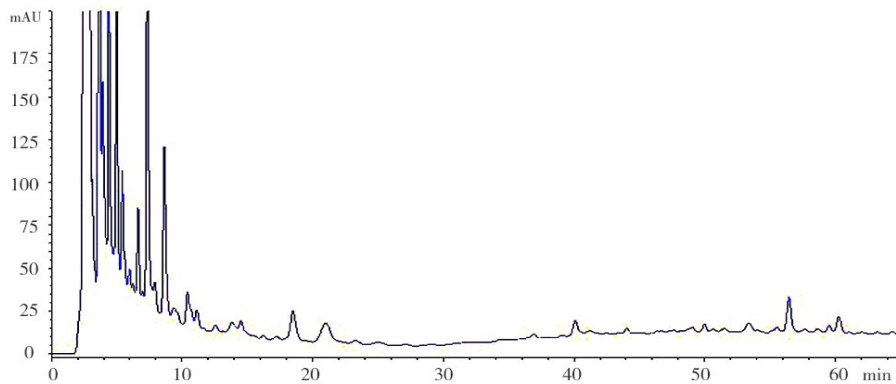


图 3 阴性样品 HPLC 色谱图

2.5.2 标准曲线的制备 按照拟定的色谱条件,精密吸取上述 2.2 项下的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 2、4、6、8、10、12 μl 进样,测定峰面积,以对照品进样量 X 为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷的线性回归方程为: $Y=132.65X-5.0501(R^2=0.9998)$,表明毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 7.2~43.2 μg 质量范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5.3 稳定性试验 取制备好的供试品溶液,于 0、2、4、8、12、24 h 定时按照 2.1 项下方法进样,测定并计算得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.84%,表明供试品溶液稳定性良好。

2.5.4 精密度试验 取同一份供试品溶液,按照 2.1 项下方法重复进样 6 次,测定并计算得毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积 RSD 为 0.79%。表明仪器精密度符合要求。

2.5.5 重复性试验 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,依次按照 2.1 项下方法进样,测得峰面积并计算得毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量 RSD 为

0.65%,表明该法重复性良好。

2.5.6 回收率试验 精密称取 6 份疏肝健脾解毒方粉末,计算颗粒粉末中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量,再将等量毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品加入到 6 份粉末中,按照 2.3 项下供试品溶液处理方法进行制备,计算各样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷实测值,计算平均回收率为 98.87%,RSD 为 1.79%(n=6),表明该测定方法回收率良好。(见表 1)

表 1 加样回收率试验结果

编号	样品取样量 (g)	样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	加样回收率 (%)	平均加样 回收率(%)	RSD (%)
1	10.0011	169.4	180.0	354.2	101.37	98.87	1.79
2	10.0008	168.8	180.0	351.7	100.83		
3	10.0027	173.2	180.0	345.7	97.88		
4	10.0013	167.9	180.0	338.2	97.21		
5	10.0021	171.5	180.0	343.6	97.75		
6	10.0016	170.8	180.0	344.4	98.18		

2.6 含量测定 取 3 批疏肝健脾解毒方样品,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,再按照 2.1 项下方法对其进行测定,结果显示 3 个批次毛蕊异黄酮

葡萄糖苷含量分别为 16.98、17.21、16.69 $\mu\text{g/g}$, 平均值为 16.96 $\mu\text{g/g}$, RSD 值为 1.54%, 表明本研究建立疏肝健脾解毒方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定方法稳定、均一性良好。

3 讨 论

疏肝健脾解毒方为湖南省中医药研究院附属医院临床经验方, 主要用于防治乳腺癌及乳腺癌前病变, 在我院经过多年的临床应用, 疗效确切, 可显著改善患者症状体征, 减少复发, 疗效稳定, 毒副作用小。疏肝健脾解毒方中黄芪健脾益气, 扶正固本, 为君药。黄芪的化学成分主要有黄酮类、皂苷类等成分, 其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷是黄芪的主要成分之一, 也是 2020 版《中国药典》中收录黄芪的质量控制指标之一, 具有明显的抗病毒、抗菌、抗氧化和免疫调节活性等作用, 且在抗肿瘤方面的研究取得了一些进展^[6-7]。本方来源于临床经验方, 临床使用汤剂, 而口服剂型中药物吸收的快慢顺序为: 溶液剂>混悬剂>散剂>颗粒剂>胶囊剂>片剂。由于溶液剂型不易贮存、运输和携带; 散剂粉尘大, 黏附性强; 胶囊剂、片剂的日服生药量小, 故本研究未选用溶液剂、散剂、胶囊剂、片剂等剂型。颗粒剂既保持了传统汤剂作用迅速的特点, 又具有体积小, 存储及运输较方便、性质稳定、质量可控等特点, 适合工业化生产, 故选用颗粒剂作为本研究的样品剂型。

本研究首先采用 2020 版《中国药典》黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定方法, 结果显示毛蕊异黄酮葡萄糖苷出峰时间快(约 6.8 min), 杂峰较多, 分离效果差, 可能与中药复方中所含化学成分复杂、多样有关。通过相关参考文献^[8-10]研究及预试验, 选择以甲醇(乙腈)-水、甲醇(乙腈)-0.2%甲酸按一定比例混合作为流动相。通过多次实验后, 结果显示以乙腈-0.2%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱(0~23 min、12%~12%乙腈, 23~65 min、12%~26%乙腈)时, 基线较平稳, 目标峰位置受到的干扰最小, 分离度较好。

本研究比较了不同浓度提取溶媒(50%甲醇、75%甲醇、甲醇)进行供试品制备, 结果显示以甲醇为溶剂时测定的含量最高; 考察了加热回流提取及超声提取 2 种提取方法进行供试品制备, 实验结果显示加热回流提取时测定的含量最高。

综上, 本研究建立疏肝健脾解毒方中毛蕊异黄

酮葡萄糖苷含量测定方法专属性较好, 无阴性干扰, 重复性、精密度、加样回收率等均符合要求, 方法简便, 可操作性强。本研究为该处方后续申报医院制剂提供了实验依据。

参考文献

- [1] 李琳霏, 杨晓, 潘博, 等. 疏肝健脾解毒方对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(6): 645-649.
- [2] 李琳霏, 王启芝, 曾普华, 等. 疏肝健脾解毒方含药血清对 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1849-1851.
- [3] 李琳霏, 张真, 潘博, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨疏肝健脾解毒方含药血清对三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 22-28.
- [4] 李琳霏, 杨晓, 王容容, 等. 疏肝健脾解毒方对乳腺癌前病变肝郁证大鼠模型乳腺组织血管生成的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(10): 1195-1199.
- [5] 李琳霏, 蒋益兰, 潘博. 疏肝健脾解毒方治疗乳腺增生症 40 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(7): 21-22.
- [6] 张冬青. 黄芪总黄酮及其活性成分对肿瘤细胞的抑制作用与机理研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2010.
- [7] 张冬梅. 毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 表达的影响[J]. 中草药, 2015, 46(10): 1498-1502.
- [8] 李素凯, 刘露, 刘梦燕, 等. 人参杞黄颗粒中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定[J]. 特产研究, 2021, 43(4): 90-94.
- [9] 王晖, 刘敏, 刘磊, 等. HPLC 法同时测定益肺清解汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和绿原酸的含量[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(15): 36-39.
- [10] 崔明筠, 付开聪, 张雪梅, 等. 高效液相色谱法测定肠宁胃舒片中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(18): 2795-2797.

(收稿日期: 2022-03-27)

孙思邈的养性之道(二)

除养性以外, 还要配以适量的运动、合理的饮食, 再加上药物等辅助措施。孙思邈认为, “养性之道, 常欲小劳, 但莫大疲及强所不能堪耳。且流水不腐, 户枢不蠹, 以其运动故也”, 即建议运动, 但反对运动过量。他还认为, “莫久行久立, 久坐久卧, 久视久听。盖以久视伤血, 久卧伤气, 久立伤骨, 久坐伤肉, 久行伤筋也”。总之, 养生最重要的是养性, 如忽视养性而一味药物食物滋补, 则不可能达到健康长寿的目的, 即孙思邈所言: “故养性者, 不但饵药餐霞, 其在兼于百行, 百行周备, 虽绝药饵足以延年。德行不充, 纵服玉液金丹未能延寿”。(韦钦国, <http://www.cntcm.com.cn/news.html?aid=210144>)