

补肾壮骨丸中淫羊藿苷的高效液相色谱法测定

李晓妮¹, 胡爽¹, 赵承焕² (1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001; 2. 山西省太原市健康教育所, 山西 太原 030001)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定补肾壮骨丸中淫羊藿苷的含量。方法 70%乙醇提取后, 用聚酰胺柱纯化, 供试品溶液在 C₁₈ 色谱柱上以甲醇-水-冰醋酸(55: 45: 1) 为流动相, 270 nm 下外标法测定。结果 淫羊藿苷进样量在 0.084 ~ 1.008 μg 内线性关系良好($r = 0.9999$), 平均回收率为 99.4%, RSD 2.2%。结论 本法操作简便, 结果准确, 可作为补肾壮骨丸质量控制的方法。

关键词: 补肾壮骨丸; 淫羊藿苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R286; R917.01 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2004)01-0048-03

Determination of icariin in Bushen Zhuanggu pills by HPLC

LI Xiaoni¹, HU Shuang¹, ZHAO Chenghuan² (1. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Taiyuan Health Education Institute, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop an HPLC method for the assay of icariin in Bushen Zhuanggu pill. **METHOD** The sample was extracted with 75 % ethanol followed by purification with polyamide column. The assay quantitative analysis was performed on a C_{18} column with a mobile phase of methanol-water-glacial acetic acid (55:45:1), and detection wavelength at 270 nm. The determination was according to the external standard method. **RESULTS** Good linearity of icariin was showed within the range of 0.084~1.008 μ g ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.4%, and RSD was 2.2%. **CONCLUSION** The method is simple and accurate. It is suitable for the quality control of this preparation.

KEY WORDS: Bushen Zhuanggu pill; icariin; HPLC

补肾壮骨丸为经验方,是由熟地黄、骨碎补、淫羊藿、补骨脂、杜仲等16味中药材制成的水丸,具有补肾壮骨、活血通络、搜风止痛之功效,临床用于退行性关节炎的治疗,取得了较满意的疗效。淫羊藿苷为淫羊藿的重要活性成分。本实验用聚酰胺柱对成药的醇提取物进行净化后,以反相高效液相色谱法测定了淫羊藿苷的含量,方法操作简便、结果准确、重现性好,为该药的质量控制提供了有效的方法。

1 仪器与试药

岛津 LC-4A 高效液相色谱仪,SPD-2A 紫外检测仪,C-R3A 数据处理机;聚酰胺(14~30目,解放军八三三零五701厂),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯;补肾壮骨丸(三批,辽宁大孤山制药厂),淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,面积归一化法测定其纯度达到98.0%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Zorbax ODS 柱(4.6mm \times 250mm,10 μ m);流动相 甲醇-水-冰醋酸(55:45:1);流速 0.8mL \cdot min⁻¹;检测波长 270nm;AUFS 0.04;进样量 20 μ L;理论塔板数按淫羊藿苷峰计不低于3000。

2.2 供试品溶液的制备与考察

取本品3g,精密称定,置50mL具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇50mL,加塞,超声处理1h,放置,精密吸取上清液10mL,置蒸发皿中,水浴蒸至近干,用水定量转移至已处理好的聚酰胺柱(内径1.5cm,聚酰胺4g,干法装柱,先用50mL乙醇洗,继用150mL水洗)上,先后以水150mL,95%乙醇70mL洗脱,收集乙醇洗脱液,蒸干,残渣以甲醇溶解,定容于10mL量瓶中,摇匀,0.45 μ m滤膜过滤,即为供试品溶液。经方法学考察,该纯化方法的回收率满足要求,洗脱曲线见图1。

2.3 阴性对照品溶液的制备与测定

按成药处方制成不含淫羊藿的阴性样品。依照“2.4”项下供试品溶液的制备方法配制阴性对照品溶液。在上述色谱条件下进样,记录色谱图,可见在与淫羊藿苷对照品峰相应的位置上无干扰峰,而供试品色谱图该位置上有一相应的峰,其停流紫外扫描图与对照品一致,在270nm处有一肩峰。对照品、样品、阴性对照品色谱图见图2。

2.4 线性关系

用淫羊藿苷对照品制备成5个浓度的系列溶液,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜过滤后,在上述色谱条件下分别进样,

测定峰面积,以对照品进样量(μ g)为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程 $Y = 71512.5 X - 776.1$, $r = 0.9999$,淫羊藿苷进样量在0.084~1.008 μ g内具有良好的线性关系。

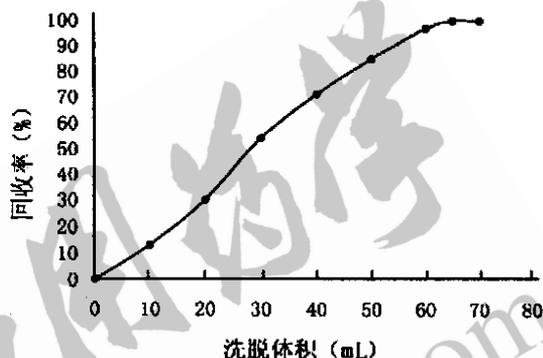


图1 淫羊藿苷标准品经聚酰胺柱的洗脱曲线

Fig 1 Elution curve of standard of icariin

2.5 精密度试验

取淫羊藿苷对照品溶液在上述色谱条件下连续进样6次,其峰面积的RSD=0.7%。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液,在0,1,2,4,8,12,24h分别进样测定峰面积,RSD为1.8%,则样品溶液在24h内稳定性良好。

2.7 重现性试验

按2.4项下供试品溶液的制备方法平行配制同批样品溶液6份,分别进样测试,计算淫羊藿苷含量,RSD为2.9%。

2.8 回收率试验

取已知含量的样品(批号980606)1g,精密称定6份,分别加入高、中、低三种浓度的淫羊藿苷对照品,按2.4项下供试品溶液的制备方法配制样品溶液,同法测定,计算回收率为99.4%,RSD为2.2%。结果见表1。

2.9 样品测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液,进样测定,记录色谱图,以外标两点法计算3批样品中淫羊藿苷的含量,结果见表2。

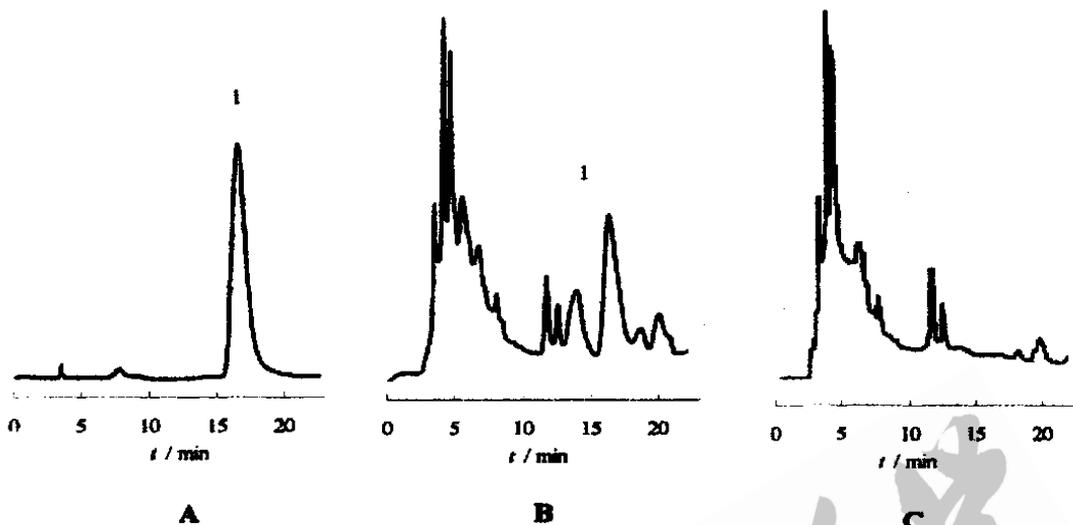


图2 淫羊藿苷标准品、样品和阴性样品的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of standard, sample and blank sample

A. 淫羊藿苷标准品; B. 补肾壮骨丸; C. 阴性样品; 1. 淫羊藿苷

A. standard of icariin; B. Bushen Zhuanggu pill; C. blank sample; 1. icariin

表1 补肾壮骨丸中淫羊藿苷的回收率测定结果

Tab 1 Recovery of icariin in Bushen Zhuanggu pill

称样量 (g)	样品中淫 羊藿苷 (mg)	加入淫羊 藿苷 (mg)	测得淫羊 藿苷 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
1.0016	0.3536	0.4412	0.7914	99.2		
1.0038	0.3543	0.4412	0.8040	101.9		
1.0121	0.3573	0.8824	1.2344	99.4	99.4	2.2
1.0073	0.3556	0.8824	1.2177	97.7		
1.0045	0.3546	1.1471	1.5212	101.7		
1.0207	0.3603	1.1471	1.4672	96.5		

表2 补肾壮骨丸中淫羊藿苷的含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Contents of icariin in Bushen Zhuanggu pills($n=3$)

批号	含量(%)	RSD(%)
980506	0.0327	0.6
980606	0.0353	2.6
980706	0.0362	1.9

3 讨论

3.1 本品处方中的君药熟地黄无对照品,无法定量;骨碎补的活性成分柚皮苷虽有对照品,但其含量很低,方法也不成熟,因此以测定臣药淫羊藿中的主要成分淫羊藿苷的含量作为成药的质量控制方法。

3.2 淫羊藿苷的含量测定方法有薄层紫外分光光度法^[1],薄层扫描法^[2],高效液相色谱法^[3]和毛细管胶束电动色谱

法^[4]。曾试用薄层扫描法,由于骨碎补中有效成分柚皮苷与淫羊藿苷均为黄酮苷类,极性及理化性质较相似,二者难于分离,直接影响淫羊藿苷的含量测定。本实验选用70%乙醇提取,可排除植物蛋白的干扰;聚酰胺对黄酮类成分有选择吸附特性,因此以聚酰胺柱纯化,先用水洗,除去水溶性杂质,再用95%乙醇洗脱待测成分。

在本实验建立的流动相系统:甲醇-水-冰醋酸(55:45:1)下,分离效果良好, t_R 值适宜,所用试剂毒性小、价格便宜,适合企业生产中的质量控制。

参考文献

- [1] 叶立新, 邓振洪, 孔少仪. 薄层-紫外分光光度法测定金蚱片中淫羊藿苷的含量[J]. 广东药学院学报, 1999, 15(4): 289.
- [2] 陈岳蓉, 王水潮. 薄层扫描法[J]. 西北药学杂志, 2001, 16(1): 19.
- [3] 柴逸峰, 李修禄. 用反相高效液相色谱法测定淫羊藿及制剂中淫羊藿苷的含量研究[J]. 药物分析杂志, 1991, 11(3): 207.
- [4] 梁统, 周克元, 凌光鑫. 毛细管胶束电动色谱法测定淫羊藿及其中药制剂中淫羊藿苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2000, 16(2): 97.

收稿日期:2002-07-12