

HPLC 测定骨骼风痛胶囊中薯蓣皂苷元的含量

石钺, 杨帅, 李开通(中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 目的 建立骨骼风痛胶囊中薯蓣皂苷元的含量测定方法。方法 采用 HPLC, 色谱柱为 Hypersil ODS2(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(93:7); 检测波长 203 nm。结果 薯蓣皂苷元在 0.772 8~3.864 0 μg 内与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y=443\,254X+18\,856$, $r=0.999\,1$; 平均回收率为 97.87%, RSD 为 1.71%。结论 本法可用于骨骼风痛胶囊的质量控制。

关键词: 骨骼风痛胶囊; 薯蓣皂苷元; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.792; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)08-0657-03

Determination of Diosgenin in Gugufengtong Capsule by RP-HPLC

SHI Yue, YANG Shuai, LI Kaitong (Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of diosgenin in Gugufengtong capsule.

METHODS diosgenin was separated on Hypersil ODS2 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column and detected at 203 nm, with methanol-water (93:7) as mobile phase. **RESULTS** There was good linearity from 0.772 8 to 3.864 0 μg ($Y=443\,254X+18\,856$, $r=0.999\,1$) in separation of diosgenin. The average recovery was 97.87% with RSD of 1.71%. **CONCLUSION** This method provides the reference to establish quality standard for Gugufengtong capsule.

KEY WORDS: gugufengtong capsule; diosgenin; RP-HPLC

骨骼风痛胶囊是骨骼风痛片的改剂型品种, 由穿山龙、鸡血藤和干姜 3 味药组成。该药具有祛风除湿、活血通络、散寒止痛之功效, 临床上用于风湿痹痛症。原剂型收载于《国家中成药标准汇编经络肢体脑系分册》[标准号 WS-10720(ZD-0720)-2002], 原制剂质量标准中含量测定项是以制剂中水溶性总皂苷的含量为定量指标, 为有效控制骨骼风痛胶囊的质量, 在总成分测定的基础上, 利用 HPLC 对制剂中穿山龙的指标性成分薯蓣皂苷元的含量进行了测定, 并对该方法学进行考察, 研究报道如下。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

岛津 LC-2010A 型高效液相色谱仪(CLASS-VP 色谱工作站, 日本岛津公司), TU-1800PC 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), METTLER AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒公司), KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药品

薯蓣皂苷元对照品(中国药品生物制品检定所,

批号: 1539-200001, 供含量测定用); 甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。骨骼风痛胶囊(北京瑞诺康医药科技开发有限公司, 批号: 050301, 050302, 050306, 050307, 050308, 050309)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件及系统适用性

色谱柱: Hypersil ODS2(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(93:7); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温室温; 检测波长: 203 nm。理论板数按薯蓣皂苷元峰计算应不低于 2 000, 薯蓣皂苷元的分离度 $R > 1.5$ 。

对照品溶液的制备: 精密称取薯蓣皂苷元对照品 6.44 mg, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含薯蓣皂苷元 0.257 6 mg)。

供试品溶液的制备: 取本品内容物适量, 混匀, 研细, 取约 3 g, 精密称定, 置 100 mL 三角瓶中, 加入乙醇 50 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 放冷, 滤过, 滤渣用乙醇 20 mL 洗涤, 合并乙醇液, 水浴蒸干, 残渣加 3 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 20 mL 溶解, 转移至 100 mL

作者简介: 石钺, 男, 博士, 研究员 Tel: (010)62895086 E-mail: yshi@implad.ac.cn

三角瓶中,水浴加热水解3 h,取出,放冷,加入三氯甲烷30 mL,加热回流30 min,放冷,分取三氯甲烷层,再用三氯甲烷30 mL洗涤容器及残渣,合并三氯甲烷液,挥去溶剂,残渣加甲醇溶解并转移至10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

阴性对照液的制备:按本品制剂工艺制备不含穿山龙的制剂,同供试品溶液的制备方法制备,作为阴性对照液,备用。

在上述色谱条件下,分别取供试品溶液、对照品溶液及阴性对照液10 μ L进样,色谱图见图1。结果表明,对照品峰与阴性对照液杂质峰没有重叠,分离效果良好。

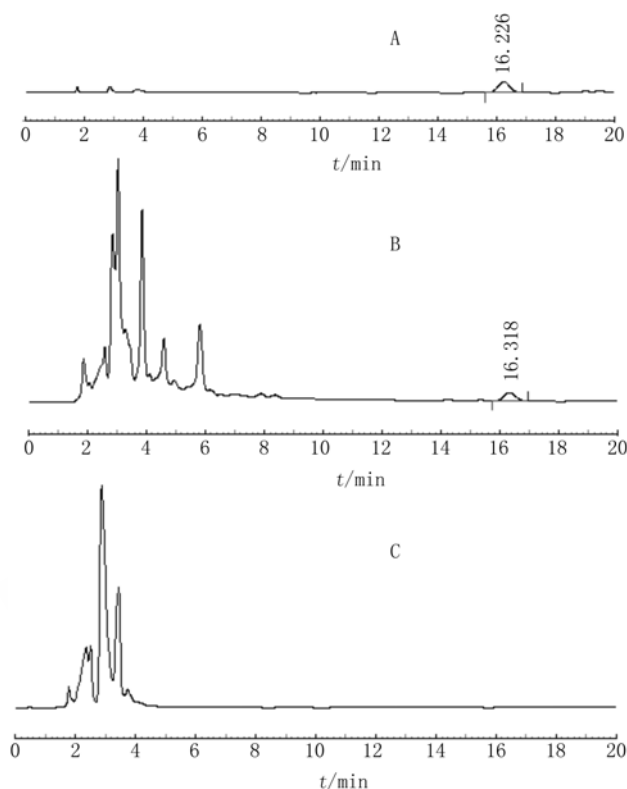


图1 高效液相图

A-薯蓣皂苷元对照品; B-供试品; C-穿山龙阴性

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard of diosgenin; B-sample; C-blank sample

2.2 线性关系考察

分别精密量取上述对照品溶液3.0,6.0,9.0,12.0,15.0 μ L注入液相色谱仪中,记录峰面积,以薯蓣皂苷元进样量(μ g)为横坐标,相应峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程: $Y=443\ 254X+18\ 856$, $r=0.999\ 1$; 线性范围:0.772 8~3.864 0 μ g。

2.3 仪器精密度试验

取同一浓度的对照品溶液重复进样5次,每次10 μ L,测定薯蓣皂苷元峰面积并计算其相对标准偏

差,测定结果RSD为1.57%,表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于0,4,8,12,24 h各进样10 μ L分析,结果薯蓣皂苷元峰面积的RSD为1.50%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5 重复性试验

同一批样品分别称取5份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液并进行测定,每次进样10 μ L,结果薯蓣皂苷元的平均含量为0.914 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD为1.93%,表明方法的重复性良好。

2.6 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品5份,分别加入薯蓣皂苷元对照品适量,按“2.1”项下方法制备供试品溶液并进行测定,计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收率试验($n=5$)

Tab 1 Results of sample recovery test($n=5$)

称样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测定总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.501 3	1.372 2	1.030 4	2.382 6	98.06		
1.505 4	1.375 9	1.030 4	2.396 3	99.03		
1.503 1	1.373 7	1.030 4	2.374 1	97.09	97.87	1.71
1.507 8	1.378 1	1.030 4	2.358 5	95.15		
1.509 9	1.380 0	1.030 4	2.410 6	100.02		

2.7 样品含量测定

取6批样品的内容物各3 g,研细,按“2.1”方法制备供试品溶液,分别注入高效液相色谱仪,测定峰面积,外标一点法计算,即得。每批样品各测2次,结果见表2。

表2 样品含量测定($n=2$)

Tab 2 Results of sample determination($n=2$)

批 号	薯蓣皂苷元含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		
	1	2	平均值
050301	0.308	0.306	0.307
050302	0.252	0.246	0.249
050306	0.215	0.215	0.215
050307	0.318	0.316	0.317
050308	0.218	0.219	0.218
050309	0.263	0.262	0.262

3 讨论

3.1 提取方法选择

影响薯蓣皂苷元提取以及薯蓣总皂苷水解的因素很多,样品在提取和水解过程中也可能产生副反应^[1-2],因此,控制供试品溶液的制备条件是很关键的。薯蓣皂苷元可选择先提取后水解,或先水解后提取的方法,在固定其他提取条件时考察这两种方法,结果以提取后再水解的方法为优。

3.2 提取条件选择

分别以甲醇、乙醇超声提取30 min、回流提取

1 h 为提取方法进行测定, 结果表明, 以乙醇为溶剂效果较好; 超声提取和回流提取测得薯蓣皂苷元差别不大, 但考虑到超声提取操作简便, 省时经济, 故选择超声提取较为理想。

3.3 水解条件选择

曾参考文献[3]的方法, 选定盐酸的浓度(2, 3 和 4 mol·L⁻¹)和时间(2, 3, 4, 5 h)进行了考察, 结果以 3 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 20 mL, 沸水回流水解 3 h 时薯蓣皂苷元含量较高。

3.4 萃取条件选择

分别用三氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯进行直接萃取, 以及三氯甲烷回流萃取, 结果表明以三氯甲烷 30 mL 回流萃取效果为优。

3.5 检测波长选择

取薯蓣皂苷元对照品适量, 以甲醇为溶剂分别在 200~400 nm 波长范围内扫描, 结果薯蓣皂苷元

对照品在 203 nm 处有最大吸收峰。

3.6 流动相的优化

选用甲醇-水溶剂系统进行试验, 结果甲醇-水(93:7)分离效果较好, 分析时间适宜, 样品中其他组分无干扰, 易于定量分析。

REFERENCES

- [1] GAO X X, GOU Y S, GAO Z G, et al. The research concerning the comparing of diosgenin contents in *Dioscorea nipponica* Mak. from different product places [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research (特产研究), 2005, 27(4): 49-52.
- [2] XU X L, ZHANG Z R. RP-HPLC determination of diosgenin in Yam [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 28(9): 886-887.
- [3] BAI L, CHEN X H, XU X S, et al. HPLC determination of diosgenin in Bixie Fenqing pills [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005, 25(11): 1333-1335.

收稿日期: 2009-04-01