

露水草提取物质量标准的研究

谭梅,李良,杨建鸣,张俊升,王琼

(云南省兽药饲料检测所,昆明 650021)

[收稿日期] 2008-12-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2009)08-0028-03 [中图分类号] R286

[摘要] 建立了露水草提取物的质量标准。用薄层色谱法对其主要成分 β -蜕皮激素进行鉴别;以高效液相色谱法对露水草提取物中 β -蜕皮激素进行定量分析,流动相为乙腈-甲醇-水(1:2:4),流速为1 mL/min,检测波长为243 nm。结果薄层色谱无干扰,专属性强; β -蜕皮激素质量浓度在0.6~4.2 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.999\ 97$ ($n=7$),加样回收率为99.7%,RSD为0.6% ($n=6$)。所用方法简便、准确、重现性好,可用于露水草提取物的质量控制。

[关键词] 露水草提取物; β -蜕皮激素;高效液相色谱法;质量标准

Quality Standard for Extractum Cyanotis Vaga Siccus

TAN Mei, LI Liang, YANG Jian-ming, ZHANG Jun-sheng, WANG Qing

(Yunnan Institute of Veterinary Drug Control, Kunming, 650021; China)

Abstract: The quality standard for Extractum Cyanotis Vaga siccus was established with a TLC method for identified beta-hydroxyecdysone in Extractum Cyanotis Vaga siccus and a HPLC method for determining simultaneously beta-hydroxyecdysone in Extractum Cyanotis Vaga siccus. The mobile phase was made up of acetonitrile-methanol-water(1:2:4), the flow rate was 1 mL/min, and the ultraviolet detection was set at 243 nm. The quantitative evaluation of beta-hydroxyecdysone had the linear range of 0.6~4.2 mg/mL ($r=0.999\ 97$, $n=7$), the average recovery was 99.7% ($RSD=0.6\%$, $n=6$). This method is simple and accurate with high specificity and good repeatability. It is suitable for quality control of Extractum Cyanotis Vaga siccus.

Key words: Extractum Cyanotis Vaga siccus; beta-hydroxyecdysone; HPLC; quality standard

露水草提取物为鸭跖草科植物露水草 *Cyanotis arachnoids* C. B. Clarke 提取的产物,主要成分为20-羟基蜕皮甾酮(β -蜕皮激素)($C_{27}H_{44}O_7$)。其主要作用为促进细胞生长、刺激真皮细胞分裂,对人体也有促进蛋白质合成的作用。兽医临床广泛用于桑蚕养殖中调节家蚕的生长发育,促使桑蚕上簇整齐;在水产养殖中也用于促进虾、蟹脱壳,以达到高产的目的。为有效控制其质量,笔者对其质量标准进行了研究,用分光光度法、薄层色谱法对其中主要成分 β -蜕皮激素进行鉴别,用HPLC法测定提取物中 β -蜕皮激素的含量,现报

道如下。

1 仪器与试剂

600型 HPLC 仪,美国 Waters 公司; CARY 300 型紫外分光光度仪,美国瓦里安公司; AX-205 型电子分析天平,瑞士梅特勒公司; Reprostar 3 型薄层摄像系统,瑞士 CAMAG 公司; β -蜕皮激素对照品,批号 MFCD 00079355,含量 95%,Alfa Aesar 公司提供;露水草提取物,批号 20080322、20080325、20080327,云南恒大药业有限公司;硅胶 G 薄层板,瑞士 CAMAG 公司预制板;甲醇、乙腈为色谱纯;其他化学试剂为分析纯。

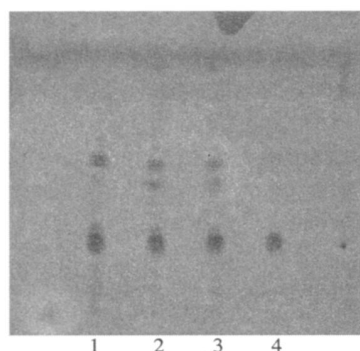
作者简介: 谭梅(1970年-),女,高级兽医师,主要从事中兽药研究及兽药管理等相关工作。E-mail: tmm@ivdc.gov.cn

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 取本品 40 mg,加乙醇 20 mL 使溶解,取 10 滴于白色滴板上,加 1~2 滴 0.1% 香草醛硫酸溶液,即显蓝绿色。

2.1.2 取本品适量,加乙醇制成每 1 mL 含 10 mg 的溶液,作为供试品溶液。另取 β -蜕皮激素对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 5 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述两种溶液各 5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙醇 (4:1) 为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 香草醛硫酸乙醇 (4 $\rightarrow$ 5) 溶液 (临用新制),在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。结果见图 1。

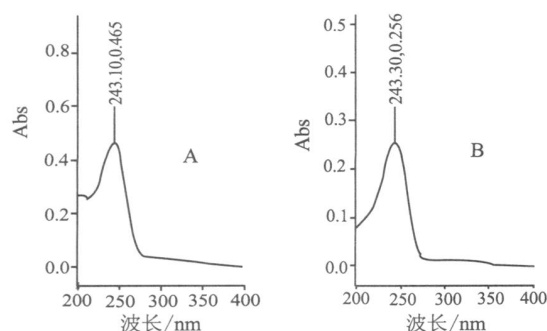


1 - 3 供试品溶液; 4 对照品溶液

图 1 薄层色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 测定波长确定 准确称取 105 $^{\circ}$ C 下干燥至恒重的 β -蜕皮激素对照品及露水草提取物样品,用甲醇分别溶解并稀释成每 1 mL 含 0.02 mg 的溶液,以甲醇为空白,在 200 nm~400 nm 波长范围内扫描,结果见图 2。 β -蜕皮激素及露水草提取物



A - 对照品溶液; B - 供试品溶液

图 2 紫外吸收光谱图

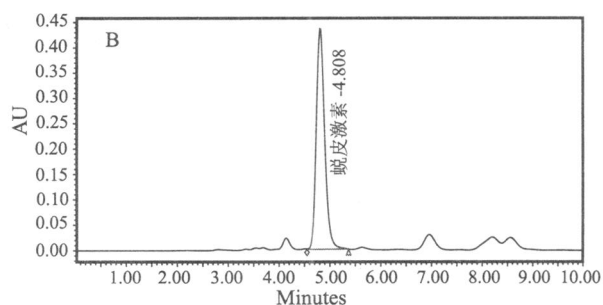
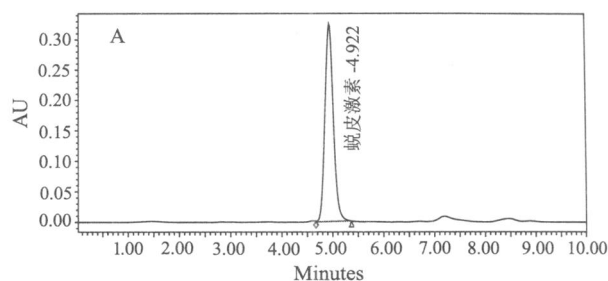
在 243.3 nm 波长处有最大吸收,且无干扰。故选择 243 nm 为检测波长。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 XTerra RP18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-甲醇-水 (1:2:4); 流速 1 mL/min; 检测波长 243 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 柱压 < 2500 psi。理论塔板数不低于 2500。

2.2.3 溶液制备 精密称取 β -蜕皮激素约 30 mg,用甲醇溶解并定容至 100 mL,作为对照品溶液。取露水草提取物,精密称取约 30 mg,置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为供试品溶液。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 专属性试验 精密吸取对照品溶液与供试品溶液 10 μ L,分别注入液相色谱仪,记录峰面积,按外标法以峰面积计算含量即可。在本色谱条件下,供试品溶液色谱图中具有与 β -蜕皮激素对照品保留时间一致的色谱峰,且无其他成分的色谱峰干扰 (图 3)。



A - 对照品溶液; B - 供试品溶液

图 3 高效液相色谱图

2.2.4.2 线性关系考察 精密取 β -蜕皮激素对照品溶液 2、4、6、8、10、12、14 μ L,以质量浓度为横坐标 (x),峰面积为纵坐标 (y) 绘制标准曲线,得回归方程 $y = 1.25e + 007x - 8.10e + 004$ ($r = 0.99997$, $n = 7$)。结果表明, β -蜕皮激素质量浓度在 0.6~4.2 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

2.2.4.3 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,记录峰面积。结果 β -蜕皮激素峰面积的 RSD 为 0.2% ($n = 6$)。

2.2.4.4 重现性试验 取同一批样品,精密称取 6 份,按样品含量测定项下的方法测定含量。结果 β -蜕皮激素的平均含量为 0.386 mg/mL, RSD 为 0.6% ($n=6$)。

2.2.4.5 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8 h 分别进样 5 次,依法测定峰面积。结果 8 h 内 RSD 为 0.6% ($n=5$),表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.4.6 加样回收试验 精密称取已知含量的露水草提取物 (β -蜕皮激素含量为 0.386 mg/mL) 适量,共 6 份,分别精密加入低、中、高 3 种不同质量浓度的 β -蜕皮激素对照品溶液适量,照供试品溶液的制备方法操作,得回收率试验溶液,依法测定,结果见表 1。

表 1 β -蜕皮激素加样回收试验 ($n=6$)

样品含量 / (mg mL ⁻¹)	加入量 / (mg mL ⁻¹)	测得量 / (mg mL ⁻¹)	回收 率 / %	平均回 收率 / %	RSD / %
0.300	0.315	0.607	98.70		
0.296	0.315	0.608	99.51		
0.275	0.394	0.667	99.70	99.50	0.5
0.280	0.394	0.668	99.11		
0.321	0.473	0.792	99.75		
0.318	0.473	0.793	100.25		

2.2.5 样品含量测定 取 3 个批次的露水草提取物,分别按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液。分别取 10 μ L 注入液相色谱仪进行测定。结果 3 批样品中 β -蜕皮激素的质量分数分别为 56.9%、62.0%、55.5% ($n=3$)。

3 讨论

β -蜕皮激素为露水草提取物中药理作用明确,含量较高的成分。以 β -蜕皮激素为指标可有效控制该提取物质量。提供对该提取物紫外吸收及 TLC 鉴别,用 HPLC 法建立药效成分 β -蜕皮激素的含量测定,多批次的检验表明,所用方法简便易行,结果稳定,重现性良好,可作为该提取物的质量控制方法。综合考虑提取工艺及临床药效,制定该提取物含量测定限度为含 β -蜕皮激素 ($C_{27}H_{44}O_7$) 不低于 50.0%。

参考文献:

- [1] 云南省卫生局. 云南省药品标准 [S]. 1974 年版。
- [2] 杨爱静. 两种仪器分析方法测定 β -蜕皮激素含量的比较 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2005, 10(4): 24-25.
- [3] 惠玉虎, 张立, 李健. RP-HPLC 法测定珍珠露水草提取物中蜕皮激素的含量 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 426-427.

动物药品学会关于 2009 年有关学术活动的通知

尊敬的理事会各位领导、常务理事、理事、理事单位、团体会员单位、会员:

根据中国畜牧兽医学会和中国兽医药品监察所的安排,2009 年我分会参加协办中国畜牧兽医学会石家庄 2009 学术年会和参加协办中国兽医药品监察所南京 2009 年第二届中国兽药大会,故今年我分会不再单独举办大型学术交流活动。现将有关情况通知如下,欢迎积极参加,参加者请直接同会议联系。

一、关于第二届中国兽药大会

中国兽医药品监察所定于 2009 年 9 月 14 日至 16 日在南京举办第二届中国兽药大会,根据大会安排,我分会与中国畜牧兽医学会生物制品学分会、中国微生物学会兽医微生物学专业委员会负责共同主办学术论坛。具体内容详见网址:
http://www.ivdc.gov.cn/tz/200906/t20090617_32452.htm

二、关于中国畜牧兽医学会 2009 年学术年会

中国畜牧兽医学会定于 2009 年 10 月 11-14 日在石家庄市,举办以“动物源性食品安全:畜牧兽医科技工作者面临的新的挑战”为主题的 2009 年学术年会,我分会将与中国畜牧兽医学会生物制品学分会共同主办“兽药安全学术论坛”,我分会拟安排如下报告:①中国兽医药品监察所徐士新研究员/主任/博士,兽药安全评价和评审;②中国农业大学沈建忠教授/副院长/博士,兽药与畜产品安全;③中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所张继瑜研究员/副所长/博士,抗寄生虫药研究的进展。其他具体内容详见网址:<http://www.bj-fm.com/caav/cn/index.asp?actionId=1>

特此通知

中国畜牧兽医学会动物药品学分会

2009 年 8 月 2 日

摘自中国兽药信息网:http://www.ivdc.gov.cn/tz/200908/t20090803_32689.htm [2009-08-10]