

HPLC 法测定壮骨止痛颗粒中淫羊藿苷的含量

王巨存¹, 冯鑫¹, 赵薇¹, 冯亦颖², 高颖¹

(1. 天津市天津医院, 天津 300211; 2. 天津市南开医院, 天津 300100)

摘要 目的: 采用高效液相色谱法测定壮骨止痛颗粒中淫羊藿苷的含量。方法: 采用 Thermo C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水 (26:74) 为流动相, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 270 nm, 柱温为室温。结果: 淫羊藿苷在 0.01 ~ 0.07 mg · mL⁻¹ 范围内呈良好的线性关系 ($r = 0.9999$), 平均回收率为 99.5% ($n = 6$), RSD 为 0.85%。结论: 本方法操作简便, 精密度好, 结果准确可靠。

关键词: 高效液相色谱法; 淫羊藿苷; 壮骨止痛颗粒

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)04-0742-03

HPLC determination of icariin content in Zhuanggu Zhitong granule

WANG Ju-cun¹, FENG Xin¹, ZHAO Wei¹, FENG Yi-ying², GAO Ying¹

(1. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 2. Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

Abstract Objective: To determine icariin content in Zhuanggu Zhitong granule by HPLC. **Methods:** Thermo C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile-water (26:74) was used as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detected wavelength was 270 nm, the temperature of column was controlled at room temperature. **Results:** The calibration curve was linear in the range of 0.01 - 0.07 mg · mL⁻¹ for icariin ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.5% ($n = 6$), RSD was 0.85%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reliable.

Key words: HPLC; icariin; Zhuanggu Zhitong granule

壮骨止痛颗粒是我院应用多年的中药制剂, 由淫羊藿、蛇床子、延胡索组成, 具补肾壮骨, 活血止痛功能, 用于绝经后骨质疏松症和老年性骨质疏松症的治疗。方中君药淫羊藿所含淫羊藿苷具有抑制前体破骨细胞分化成破骨细胞^[1], 抑制破骨细胞骨吸收活性^[2], 促进成骨细胞增殖、分化^[3], 抑制去卵巢大鼠骨量丢失、防止骨质疏松的作用^[4]。为有效控制该制剂质量, 本实验采用高效液相色谱法对淫羊藿苷进行定量分析。

1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪 (515HPLC 泵、486 紫外检测器, Millennium 2010 色谱工作站); ZF-1 型紫外分析仪 (上海顾村电光仪器厂)。

淫羊藿苷对照品 (批号: 110737-200312) 购自中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯, 水为注射用水, 其余试剂均为分析纯。壮骨止痛颗粒样品 (批号 090202, 090317, 090905, 规格: 10 g · 袋⁻¹; 由

天津医院制剂室制备)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Thermo C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (26:74); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 270 nm; 柱温: 25 °C。进样量: 20 μL。理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 5000。

2.2 提取条件的选择

2.2.1 提取溶剂 取同一批号 (090202) 样品, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇或甲醇 20 mL, 称定重量, 提取时间均为 60 min, 放冷, 再称定各自重量, 用相应溶剂补足减失的重量, 滤过, 取续滤液, 测定样品中淫羊藿苷的含量 ($n = 3$)。甲醇提取结果为 0.299 mg · g⁻¹, 稀乙醇提取结果为 0.527 mg · g⁻¹。采用稀乙醇提取所测结果高于甲醇提取所测结果 (RSD = 27.6%), 故采用稀乙醇作为提取溶剂。

2.2.2 提取方式 取同一批号(090202)样品,研细,取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇20 mL,称定重量,分别采用超声(200 W,40 kHz)处理与加热回流的方式,提取时间均为60 min,放冷,再称定各自重量,用稀乙醇补足减失的重量,滤过,取续滤液,测定样品中淫羊藿苷含量($n=3$)。加热回流提取结果为 $0.462 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,超声处理提取结果为 $0.534 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。采用超声处理方式所测结果高于加热回流处理方式($\text{RSD}=7.23\%$),且超声处理方式操作简单,故采用超声处理方式提取。

2.2.3 提取时间 取同一批号(090202)样品,研细,取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇20 mL,称定重量,分别超声处理30,60,90 min,放冷,再称定各自重量,用稀乙醇补足减失的重量,滤过,取续滤液,测定样品中淫羊藿苷含量($n=3$)。30 min 提取结果为 $0.501 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,60 min 提取结果为 $0.536 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,90 min 提取结果为 $0.548 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。30 与 60 min 测定结果的RSD为3.4%,60 与 90 min 测定结果的RSD为1.1%,认为60 min 提取时间可行,故将提取时间定为60 min。

2.2.4 提取溶剂用量 取同一批号(090202)样品,研细,取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇20 mL或40 mL,称定重量,提取时间均为60 min,放冷,再称定各自重量,用稀乙醇补足减失的重量,滤过,取续滤液,测定样品中淫羊藿苷的含量($n=3$)。20 mL 提取结果为 $0.525 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,40 mL 提取结果为 $0.533 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。采用稀乙醇20 mL 提取与40 mL 提取所测结果相近($\text{RSD}=0.76\%$),故提取溶剂用量选定为20 mL。

上述结果表明,取本品适量,研细,取约1 g,以稀乙醇20 mL 为提取溶媒,超声提取60 min 较为适宜。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL 含0.05 mg 的溶液,即得。

2.3.2 供试品溶液 取本品适量,研细,取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇20 mL,称定重量,超声处理1 h,放冷,再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 阴性对照溶液 取缺淫羊藿的阴性样品,按“2.3.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.4 方法专属性 在上述色谱条件下,分别取淫羊

藿苷对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各20 μL ,注入色谱仪。样品色谱图中,在与淫羊藿苷对照品色谱相应的位置上,有一相同保留时间的色谱峰。而阴性对照溶液在此保留时间处无干扰,见图1。

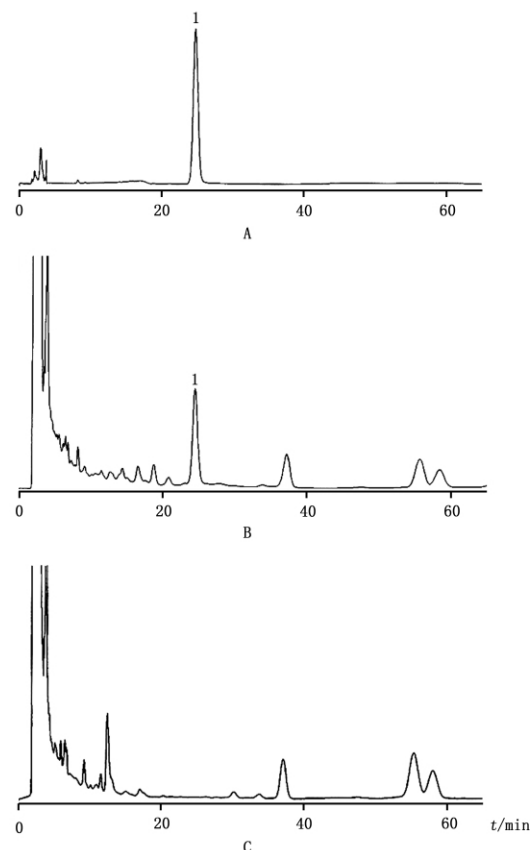


图1 淫羊藿苷高效液相色谱图

Fig 1 HPLC of Icaritin

A. 对照品(reference substance) B. 样品 (sample) C. 阴性样品 (negative)

1. 淫羊藿苷(icariin)

2.5 线性关系考察 取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 $0.500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为储备液,再分别稀释成浓度为0.01,0.02,0.03,0.04,0.05,0.06,0.07 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,分别精密吸取上述7种浓度的对照品溶液各20 μL ,注入液相色谱仪,按“2.1”色谱条件分析,测定各自峰面积,以对照品浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,峰面积值为纵坐标,求得回归方程:

$$Y = 4.27 \times 10^7 X - 4.82 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

结果表明淫羊藿苷在0.01~0.07 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好。

2.6 精密度试验 取同一对照品溶液重复进样5次,测定样品中淫羊藿苷峰面积,测定峰面积积分

值,其 RSD 为 0.52%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性考察 取同一对照品溶液,分别于 0, 4, 8, 24, 48, 72 h 进样,测定峰面积积分值, RSD 为 1.3%,表明对照品在 72 h 稳定性良好。取同一供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 24, 48, 72 h 进样,测定峰面积积分值, RSD 为 1.3%,表明供试品溶液在 72 h 稳定性良好。

2.8 重复性试验 取同一批号样品,共 6 份,研细,取约 1 g,按照“2.3.2”供试品溶液制备操作,,测定

每份样品中淫羊藿苷含量, RSD 为 0.85%,表明重复性良好。

2.9 回收率试验 取同一批号(090202)样品,研细,取约 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别加入淫羊藿苷标准储备液($0.500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5 mL,再按照“2.3.2”供试品溶液制备操作,制得供回收率用供试品溶液,按“2.1”色谱条件分析,计算回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)
Tab1 Result of sample recovery tests

样品编号 (sample No.)	样品含量 (original) /mg	加入量 (added) /mg	测得量 (measured) /mg	回收率 (recovery) /%	平均值 (mean) /%	RSD/%
1	0.2638	0.250	0.5170	101.3	99.5	1.6
2	0.2640	0.250	0.5109	98.8		
3	0.2639	0.250	0.5128	96.6		
4	0.2641	0.250	0.5137	99.8		
5	0.2642	0.250	0.5141	100.0		
6	0.2642	0.250	0.5153	100.4		

2.10 样品测定 取 3 个批号的样品,按照“2.3.2”供试品溶液制备操作,按“2.1”色谱条件测定样品中淫羊藿苷含量。结果见表 2。

表 2 3 批样品测定结果($n=3$)
Tab 2 Content determination results of samples

样品编号 (sample No.)	批号 (Lot No.)	含量(content) /mg · 袋 ⁻¹ (mg per sack)
1	090902	5.30
2	090317	8.50
3	090905	5.25

3 讨论

淫羊藿苷流动相文献报道较多,但因处方组成的差异均并不能排除阴性样品成分的干扰。在药典方法^[5]的基础上对流动相的比例进行了调整,新的色谱方法专属性强。经过对提取条件较为详尽的考察,发现所确定条件操作简便,结果准确可靠,可作为本制剂的质量控制方法。

参考文献

- 1 WANG Ting(王婷), ZHANG Da-wei(张大威), ZHANG Jin-chao(张金超), *et al.* Isolation and identification of flavonoids from epimedium koreanum and their effects on proliferation of RAW 264.7 cell line(淫羊藿黄酮的分离鉴定及其对前破骨细胞株增殖的影响). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37(10): 1458
- 2 HUANG Jian(黄健), ZHANG Jin-chao(张金超), ZHANG Tian-lan(张天蓝), *et al.* Effect of icariine on osteoclastic bone resorption and its mechanism(淫羊藿苷对破骨细胞骨吸收功能的影响及其作用机制). *Chin Sci Bull*(科学通报), 2006, 51(24): 2851
- 3 YIN Xiao-xue(殷晓雪), CHEN Zhong-qiang(陈仲强), DANG Geng-ting(党耕町), *et al.* Effects of epimedium pubescens icariine on proliferation and differentiation of human osteoblasts(淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005, 30(4): 289
- 4 BAO Jia-rong(鲍加荣), YANG Ji-wen(杨继文), LI Shu-feng(李树峰), *et al.* Effects of icariin on ovariectomized osteoporotic rats(淫羊藿苷对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响). *J Hygiene Res*(卫生研究), 2005, 34(2): 191
- 5 ChP(中国药典). 2010. Vol I(一部): 306

(本文于 2010 年 4 月 24 日收到)