

HPLC法测定益肾蠲痹丸(浓缩)中淫羊藿苷的含量

庄旭琴*,朱文燕(南京医科大学附属淮安第一医院,江苏淮安 223300)

中图分类号 R283.64;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2949-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.25

摘要 目的:建立测定益肾蠲痹丸中淫羊藿苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(30:70, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为35℃,检测波长为270 nm。结果:淫羊藿苷的进样量在0.081 3~1.219 2 μg范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999 5$);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为100.66%,RSD=1.92%($n=9$)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可有效控制益肾蠲痹丸的质量。

关键词 益肾蠲痹丸;淫羊藿苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Icaritin in Yishen Juanbi (Concentrated) Pills by HPLC

ZHUANG Xu-qin,ZHU Wen-yan(Huaian First Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Huaian 223300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of icaritin in Yishen juanbi pills. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (30:70, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 35℃, and the detection wavelength was set at 270 nm. RESULTS: The linear range of icaritin were 0.081 3-1.219 2 μg($r=0.999 5$) with an average recovery of 100.66% (RSD=1.92%, $n=9$). The RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and it can be used for the quality control of Yishen juanbi pills.

KEY WORDS Yishen juanbi pills; Icaritin; HPLC; Content determination

益肾蠲痹丸(浓缩)系根据益肾蠲痹水丸重新改剂型研制而成的八类中药新药。在原益肾蠲痹水丸标准中,仅以采用薄层扫描法测定延胡索乙素作为控制本品质量的定量指标,但该方法操作烦琐、重复性差。为提高其质量监控水平,本试验拟增加其含量测定项。淫羊藿为方中君药之一,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用,与本品功能主治相对应,而淫羊藿苷为淫羊藿中的主要有效成分之一。因此,本试验增加淫羊藿苷为控制本品质量的定量指标成分,在参考文献^[1-4]基础上,采用高效液相色谱(HPLC)法对其进行测定。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,含四元梯度泵、紫外-可见检测器、化学工作站等(美国惠普公司);CP124S型电子分析天平(德国Sartorius公司);KH-300 DE型数控超声波提取仪(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

益肾蠲痹丸(浓缩)(江苏正大清江药业有限公司制剂室提供,批号:20110405、20110408、20110411);淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110737-200415,供含量测定用);甲醇、乙腈均为色谱纯,石油醚(60~90℃)、氨水、醋酸铵、冰醋酸均为分析纯,水为天磁纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙

腈-水(30:70, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:35℃;检测波长:270 nm。在该色谱条件下,分别取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各20 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,阴性对照在淫羊藿苷色谱峰位置处无相应峰出现;供试品中主峰与其相邻色谱峰均能达到基线分离;理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于20 000。色谱见图1。

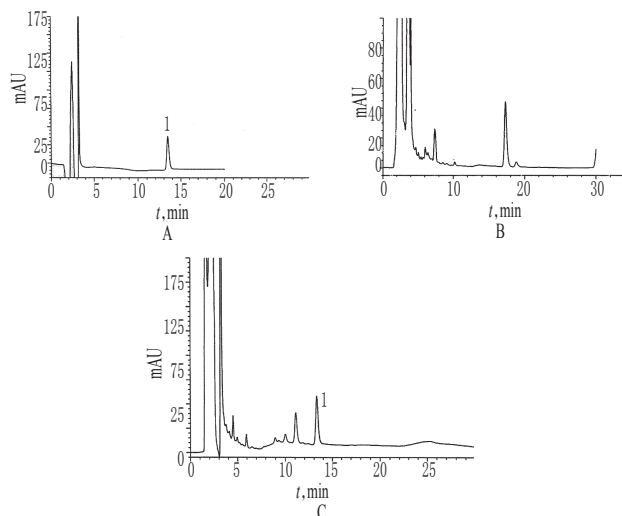


图1 高效液相色谱图

A.淫羊藿苷对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. icaritin control; B. test sample; C. negative control; 1. icaritin

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品10.16

* 副主任药师。研究方向:中药学、医院药学。电话:0517-80850218。E-mail:zhuang6512@163.com

mg, 置 50 ml 量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液 (0.203 2 mg/ml)。精密吸取该对照品贮备液 1 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 (20.32 μg/ml)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品研细, 取约 0.3 g, 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 加入 70% 甲醇适量, 超声处理 20 min, 取出, 放至室温, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按本品处方及工艺制备淫羊藿缺味样品, 照“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密量取对照品贮备液 (0.203 2 mg/ml) 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 ml, 置 10 ml 量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成系列标准溶液, 按上述色谱条件分别进样 20 μl 测定, 记录峰面积。以对照品的质量浓度 (x) 为横坐标, 峰面积积分值 (y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $y = 2.839 2 \times 10^3 x + 1.931 4 \times 10^4$ ($r = 0.999 5, n = 5$)。结果表明, 淫羊藿苷的进样量在 0.081 3~1.219 2 μg 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密量取对照品贮备液 (0.203 2 mg/ml) 适量, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 每次 20 μl, 记录峰面积。结果, RSD = 1.83% ($n = 6$)。表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取本品 0.3 g, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。取对照品溶液 (20.32 μg/ml) 和供试品溶液各 20 μl, 分别于 0、2、4、6、8、15 h 按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 对照品的平均峰面积积分为 932.1, RSD = 1.31% ($n = 6$); 供试品的平均峰面积积分为 900.0, RSD = 1.79% ($n = 6$), 表明对照品溶液和供试品溶液在室温放置 15 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取本品 (批号: 20110405) 研细, 精密称取 6 份, 每份 0.3 g, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 每 1 g 样品中平均含淫羊藿苷 1.612 0 mg, RSD = 1.67% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取本品 (批号: 20110405) 约 0.15 g, 置 25 ml 量瓶中, 共 9 份, 每 3 份为一组, 分别加入质量浓度为 0.203 2 mg/ml 的对照品贮备液 1.0、1.2、1.5 ml, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.8 样品含量测定

取 3 批样品 (批号: 20110405、20110408、20110411) 各适量, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 记录峰面积, 以峰面积计算样品中淫羊藿苷的含量, 结果见表 2。

3 批放大样品所用淫羊藿药材中淫羊藿苷的平均质量分数为 1.06%, 样品平均含量为 1.766 0 mg/g, 由此计算可得本品中淫羊藿苷的提取率约为 80%。根据 2010 年版《中国药典》(一部) 对淫羊藿药材中淫羊藿苷含量限度 (按干燥品计, 不得少于 0.50%) 的规定, 将 3 批样品的淫羊藿苷提取转移率以 80% 计算, 暂定本品中含淫羊藿以淫羊藿苷计不得少于 0.800 0 mg/g。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取淫羊藿苷对照品溶液, 在 200~400 nm 波长范围内进行

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 9$)

称样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
144.94	0.233 6	0.203 2	0.432 9	98.03		
150.38	0.242 4	0.203 2	0.443 1	98.75		
152.38	0.245 6	0.203 2	0.454 3	102.68		
146.26	0.235 8	0.243 8	0.475 4	98.28		
153.25	0.247 0	0.243 8	0.493 8	101.20	100.66	1.92
153.25	0.247 0	0.243 8	0.494 8	101.62		
150.05	0.241 9	0.304 8	0.552 3	101.84		
150.55	0.242 7	0.304 8	0.548 3	100.26		
156.61	0.252 5	0.304 8	0.567 2	103.26		

表 2 样品含量测定结果 ($n = 3$)

批号	含量, mg/g				\bar{x} , mg/g
	1	2	3	平均值	
20110405	1.772 3	1.796 0	1.784 3	1.784 2	
20110408	1.747 5	1.763 7	1.755 6	1.755 6	1.766 0
20110411	1.741 9	1.774 5	1.758 2	1.758 2	

紫外吸收光谱扫描, 发现其在 270 nm 波长处有最大吸收峰。因此, 选择 270 nm 作为检测波长。经过测试, 流动相的吸光度为 0.05, 符合 2010 年版《中国药典》(一部) 附录 V A^[1] 的要求。

3.2 提取溶剂的考察

分别取 75% 乙醇、95% 乙醇、甲醇、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇作为提取溶剂提取样品, 考察提取结果。结果发现, 95% 乙醇超声提取不完全; 甲醇、30% 甲醇的提取量较少; 70% 甲醇、50% 甲醇、75% 乙醇超声提取 20 min 的含量无明显差异, 但 50% 甲醇溶液颜色较深, 所含杂质较多。综合考虑, 选择 70% 甲醇作为提取溶剂。

3.3 色谱条件的考察

通过预试验初步确定了色谱条件——流动相: 乙腈-水 (30:70, V/V); 检测波长: 270 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35 ℃。在此基础上, 分别考察了流动相配比、色谱柱类型、柱温、流速及检测波长小有变动时对测量结果的影响程度。结果, 柱温为 37、35、32 ℃ 时, 淫羊藿苷的含量 (mg/g) 分别为 1.730 2、1.628 4、1.779 8; 流速为 0.9、1.1 ml/min 时, 淫羊藿苷的含量 (mg/g) 分别为 1.696 8、1.694 7; 检测波长为 273、268 nm 时, 淫羊藿苷的含量 (mg/g) 分别为 1.705 5、1.715 4; 流动相配比为乙腈-水 (30:70, V/V)、乙腈-水 (29:71, V/V)、乙腈-水 (28:72, V/V) 时, 淫羊藿苷的含量 (mg/g) 分别为 1.841 1、1.815 1、1.799 1。试验结果表明, 流动相为乙腈-水 (30:70, V/V)、流速为 1.0 ml/min、检测波长为 270 nm、柱温控制在 35 ℃, 色谱图基线平稳, 淫羊藿苷主峰峰面积较大且与杂质峰能达到完全分离。综上所述, 本方法具有分离效果好、简便、准确、重复性好等优点, 可有效控制益肾蠲痹丸 (浓缩) 的质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 36、附录 30.
- [2] 郭洁, 黄伟. HPLC 法测定调经促孕微丸中淫羊藿苷含量[J]. 光明中医, 2011, 26(9): 1 794.
- [3] 蒋华科, 陈纯, 陈仲新. 高效液相法测定抗骨增生胶囊中淫羊藿苷的含量[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(12): 1.
- [4] 王秀云. 柱层析-HPLC 法测定阳强保肾丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(15): 1 179.

(收稿日期: 2013-04-25 修回日期: 2013-07-07)