

HPLC法测定抗骨质增生片中淫羊藿苷的含量

张桂林*,马慧萍#,李兰茹,董志臣,何 蕾,贾正平(兰州军区兰州总医院药材科,兰州 730050)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4291-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.37

摘要 目的:建立测定抗骨质增生片中淫羊藿苷含量的方法,以期完善该制剂的质量标准提供依据。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈,流动相为乙腈-水(27:73, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为270 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:淫羊藿苷检测质量浓度线性范围为3~60 μg/ml($r=0.999\ 9$);定量限为11.2 μg/ml,检测限为4.3 μg/ml;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为99.00%~100.67%(RSD=0.63%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于测定抗骨质增生片中淫羊藿苷的含量。
关键词 抗骨质增生片;淫羊藿苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Icaritin in Kangguzhi Zengsheng Tablet by HPLC

ZHANG Guilin, MA Huiping, LI lanru, DONG Zhichen, HE Lei, JIA Zhengping (Dept. of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of icaritin in Kangguzhi zengsheng tablet, and provide a basis for improving the quality standard. METHODS: HPLC was performed on the column of Hypersil ODS2 C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - water (27:73, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 270 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of icaritin was 3-60 μg/ml ($r=0.999\ 9$); limit of quantitation was 11.2 μg/ml, limit of detection 4.3 μg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 99.00%-100.67% (RSD=0.63%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the content determination of icaritin in Kangguzhi zengsheng tablet.

KEYWORDS Kangguzhi zengsheng tablet; Icaritin; HPLC; Content determination

抗骨质增生片是兰州军区总医院自制的纯中药制剂[批准文号:兰制字(2012)F00020号],其是由熟地黄、鸡血藤、肉苁蓉、淫羊藿等多味中药材经提取加工而制成,具有滋补肝肾、强壮筋骨、益精养血、活血通络的作用^[1];临床主要用于治疗骨质增生及骨退行性病变等症。淫羊藿为方中君药,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效,其主要有效成分是黄酮类化合物淫羊藿苷^[2]。现代药理学研究发现,淫羊藿苷具有多种生物活性^[3-7],并有抗缺氧、抗氧化等多种生物学功效^[8-10]。由于目前尚未有测定抗骨质增生片中淫羊藿苷含量的报道,因此笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定抗骨质增生片中淫羊藿苷含量的方法,以期为进一步完善该制剂的质量标准提供依据。

1 材料

1.1 仪器

U-3000型HPLC仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);3300LH型超声提取仪(上海科导超声仪器有限公司,功率:220 W,频率:40 kHz);AE200型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

抗骨质增生片(兰州军区兰州总医院自制,批号:100618、100622、100624、101118、101125,规格:0.3 g/片);淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110737-200415,纯度:

*主管药师。研究方向:药物分析。电话:0931-8994665。E-mail:13639366065@163.com

#通信作者:副主任药师,博士。研究方向:药物分析。电话:0931-8994671。E-mail:mahuipingcxi@aliyun.com

98.5%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2 C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(27:73, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:270 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含淫羊藿苷300 μg的对照品贮备液。精密吸取上述贮备液1 ml,置于10 ml棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品10片,除去薄膜衣,研细,取样品细粉约0.2 g,精密称定,置于10 ml具塞锥形瓶中,加甲醇10 ml,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液;再置于10 ml棕色量瓶中备用。

2.2.3 阴性对照溶液 取除淫羊藿的其他药材适量,按样品的制备工艺和配方比例制备阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以淫羊藿苷峰计≥3 000,保留时间为11 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

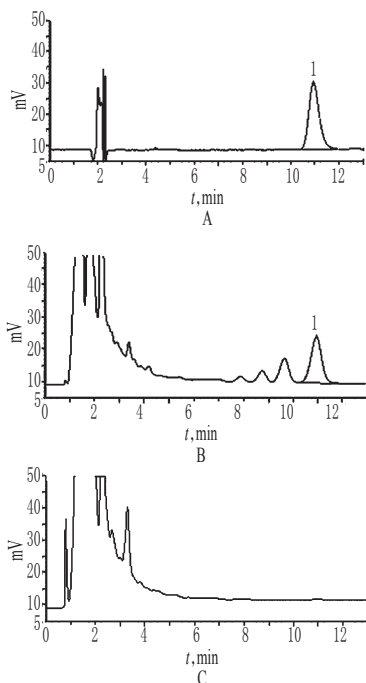


图1 高效液相色谱图
A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance;B.test sample;C.negative control;1.icariin

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液贮备液50、100、200、400、1 000、2 000 μl ,分别置于10 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以淫羊藿苷质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得淫羊藿苷的回归方程为 $y=24\,537.59x-3\,740.01(r=0.999\,9)$ 。结果表明,淫羊藿苷检测质量浓度线性范围为3~60 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限为11.2 $\mu\text{g/ml}$;当信噪比为3:1时,得检测限为4.3 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,淫羊藿苷峰面积的RSD=0.97%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:100618)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,淫羊藿苷峰面积的RSD=1.37%($n=6$),表明供试品溶液在室温下8 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:100618)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果,淫羊藿苷的平均含量为1.18 mg/g, RSD=0.31%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:100618)适量,共6份,每份约0.1 g,分别置于10 ml棕色量瓶中,加入一定质量的淫羊藿苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项

下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Recovery test results($n=6$)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.100 4	0.118 5	0.120 0	0.237 6	99.25	99.44	0.63
0.099 8	0.117 8	0.120 0	0.236 9	99.25		
0.101 2	0.119 4	0.120 0	0.238 2	99.00		
0.100 6	0.118 7	0.120 0	0.239 5	100.67		
0.102 9	0.121 4	0.120 0	0.240 8	99.50		
0.102 5	0.121 0	0.120 0	0.239 8	99.00		

2.10 样品含量测定

取5批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算淫羊藿苷的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=3$)

样品批号	淫羊藿苷,mg / 片	平均含量,mg / 片	RSD,%
100618	0.354	0.324	1.02
100622	0.321		1.36
100624	0.297		1.55
101118	0.333		1.22
101125	0.316		1.41

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

笔者参考2015年版《中国药典》(一部)^[11]和相关文献^[3,12-14]中的溶剂,选择甲醇、50%甲醇、50%乙醇作为提取溶剂。结果,甲醇作为提取溶剂时淫羊藿苷含量最高,提取效果最好。因此,本试验选择甲醇为提取溶剂。

3.2 提取时间的考察

笔者考察了3个不同的超声提取时间(20、30、40 min)。结果,超声处理20 min时,样品中的淫羊藿苷提取不完全,超声处理30和40 min时淫羊藿苷提取量相当,且可将样品中的淫羊藿苷提取完全。因此,为了节约试验时间,本试验的超声处理时间选择为30 min。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于测定抗骨质增生片中淫羊藿苷的含量。

参考文献

- [1] 邹文孝,田维君,张春.抗骨增生片联合骨肽片治疗骨质增生症60例[J].中国药师,2012,21(8):93.
- [2] 冯晶.淫羊藿的研究进展[J].湖北中医杂志,2012,34(9):74.
- [3] 范梅娟.强力健身胶囊定性定量方法的研究[J].药物分析杂志,2012,32(4):697.
- [4] 范永春.乳欣安胶囊质量标准研究[J].中成药,2010,32(5):786.
- [5] 万婷,熊富良,高文天,等.骨康胶囊的质量控制研究[J].中成药,2012,34(6):1 096.
- [6] 张伏军,尹小玲,李卿,等.高效液相色谱法测定穿龙骨刺片中薯蓣皂苷和淫羊藿[J].中成药,2011,33(7):1 182.
- [7] 马晓星,韩翠艳,朱丹,等.益康药酒的质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):101.
- [8] 翟宏颖,于林楠.淫羊藿苷对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心肌组织的保护作用[J].中国药房,2015,26(16):2 192.

藏药绿萝花的化学成分研究

朱海雯*,高 蝶,张永兰,张起辉,夏之宁[#](重庆大学化学化工学院,重庆 400044)

中图分类号 R282.1;R282.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4293-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.38

摘 要 目的:研究藏药绿萝花的化学成分。方法:采用多种柱色谱对绿萝花乙酸乙酯粗提物进行分离纯化,根据理化性质和波谱数据分析鉴定化合物结构。结果:从绿萝花乙酸乙酯粗提物中分离得到10个化合物,分别鉴定为Rutamontine(1)、结香苷C(2)、结香素(3)、银锻苷(4)、Helichrysoside(5)、山柰酚(6)、2,4-Dihydroxypheny-2-hydroxy-4-methoxybenzyl-ketone(7)、咖啡酸乙酯(8)、Phthalic acid bis-(2-ethyl-hexyl) ester(9)、去甲基丁香色原酮(10)。结论:化合物7为首次从植物来源分离得到,化合物5、8和9为首次从瑞香科植物分离得到,化合物6为首次从结香属分离得到,化合物2、10为首次从绿萝花分离得到。本研究为绿萝花质量评价奠定了一定基础。
关键词 结香属;绿萝花;化学成分

Study on the Chemical Constituents of the Flower of *Epipremnum aureum*
ZHU Haiwen,GAO Die,ZHANG Yonglan,ZHANG Qihui,XIA Zhining(College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the chemical constituents of the flower of Zang *Epipremnum aureum*. METHODS: The constituents of ethyl acetate extract of the flower of *E. aureum* were separated and purified with varied chromatographic techniques, and the structures were identified based on spectral data and chemical properties. RESULTS: Ten compounds were isolated from ethyl acetate extract of the flower of *E. aureum*, they were identified as rutamontine (1), edgeworoside C (2), edgeworin (3), tiliroside (4), helichrysoside (5), kaempferol (6), 2,4-dihydroxypheny-2-hydroxy-4-methoxybenzyl-ketone (7), ethyl caffeate (8), phthalic acid bis-(2-ethyl-hexyl) ester (9) and noreugenin (10). CONCLUSIONS: Compound 7 is firstly isolated from natural source, compounds 5, 8 and 9 is firstly isolated from the family Thymelaeaceae, compound 6 is firstly isolated from *Edgeworthia* and compound 2 and 10 are firstly isolated from the flowers of *E. aureum*. The study lays certain foundation for the quality evaluation of *E. aureum*.
KEYWORDS *Edgeworthia*; The flower of *Epipremnum aureum*; Chemical constituents

绿萝花为瑞香科结香属植物滇结香的花蕾,主要分布于我国西藏地区及云南西北部。民间常通过绿萝花泡水饮用的方式来治疗糖尿病、高血压、高脂血症、血管炎及脉管炎等疾病^[1-3]。有文献报道,绿萝花粗提物具有多种药理活性,如降糖及抑制 α -葡萄糖苷酶的活性^[4-5]。前期本院研究发现,绿萝花乙酸乙酯粗提物具有非常好的激活过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) γ 和PPAR β 的作用。此外,笔者根据PPARs活性对绿萝花进行了化学成分研究,发现该植物中含有双香豆素类、黄

酮类、脂肪酸和三萜等化合物。有研究表明,绿萝花中伞形花内酯和十五烷酸均具有良好的PPAR γ 激动活性^[6-7]。而PPARs在糖尿病研究中处于十分重要的位置,其参与的生物学效应包括调节血脂激活基因转录、脂质代谢、胰岛素敏感、炎症反应、细胞增殖等重要生化反应及生物调节过程,并与人类的慢性疾病密切相关,包括肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化及癌症等代谢疾病,它同糖尿病、肥胖症及炎症都有密切的关系^[8-11]。因此,绿萝花具有开发成为治疗糖尿病药物的潜力。为明确其

[9] Zhai YK, Guo XY, Ge BF, *et al.* Icariin stimulates the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells via activating the PI3K-AKT-eNOS-NO-cGMP-PKG [J]. *Bone*, 2014, 66(9):189.
[10] Ma HP, Ma XN, Ge BF, *et al.* Icariin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in osteoblasts and preserves their osteogenic differentiation potential in vitro [J]. *Cell Prolif.* 2014, 47(6):527.
[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:327.
[12] 焦守国,许学丽.HPLC法测定金乌骨通胶囊中淫羊藿苷的含量[J].*解放军药学报*, 2009, 25(6):547.
[13] 赵明宏,韩镌竹,王常丽,等.高效液相色谱法同时测定复方仙灵脾颗粒中淫羊藿苷和丹参酮Ⅱ_A的含量[J].*解放军药学报*, 2011, 27(1):63.
[14] 许红涛,李媛,何勇静,等. HPLC法测定二仙汤提取物中抗骨质疏松有效成分的含量[J]. *中国药房*, 2015, 26(15):2122.

* 硕士研究生。研究方向:植物化学。E-mail: zhuhaiwen19891206@163.com
[#] 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析。电话: 023-65106615, E-mail: tcm_anal_cqu@163.com

(收稿日期:2015-11-02 修回日期:2016-08-18)
(编辑:刘 柳)