

高效液相色谱法测定抗骨增生片中淫羊藿苷含量

杨小妹¹,朱俊彦²(1.深圳蛇口人民医院,广东 深圳 518067;2.南昌市药品检验所,江西 南昌 330003)

摘要:目的 建立一种准确度和灵敏度高,重现性好的抗骨增生片中淫羊藿苷高效液相色谱测定法。方法 采用 Kromasil C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm) 为分析柱,流动相:乙腈-水(27:73),检测波长:270nm。结果:含量测定淫羊藿苷在 0.020 ~ 0.400μg 内有良好的线性关系($r=0.9991$),平均回收率 98.2%,RSD为 1.2%。结论 建立的含量测定方法简便、准确、灵敏。

关键词:抗骨增生片;淫羊藿苷;反相高效液相色谱法

中图分类号:R927.2 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)04-0314-03

Determination of icariine in kangguzengsheng tablets by HPLC

YANG Xiao-mei¹, ZHU Jun-yan² (1. People's Hospital of Shekou, Shenzhen 518067, China; 2. Nanchang Institute for Drug Control, Nanchang 330003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an accurate sensitive and reproducible method for the determination of icariine in Kangguzengsheng Tablets. **METHODS** The column was Kromasil C18 5 μ m (4.6 \times 250 mm); mobile phase was acetonitrile-water (27:73); Detection wave length was 270nm. **RESULTS** The recovery was 98.2% and linear range were 0.020 ~ 0.400 μ g, RSD 1.2%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and sensitive for the determination of icariine in Kangguzengsheng yablets. **KEY WORDS:** Kangguzengsheng tablets; icariine; HPLC

抗骨增生片系由熟地黄、鹿衔草、淫羊藿等七味中药组成。具补肾、活血、止痛之功效,用于肥大性脊椎炎、颈椎病、跟骨刺、增生性关节炎、大骨节病。该药收载于中华人民共和国卫生部部颁标准。该药的质量标准未对方中主要活性成分进行含量测定,为控制其内在质量,我们对方中主要活性成分淫羊藿苷进行含量测定,方法简便、准确,重现性好,可作为该制剂的含量测定方法。

1 仪器和试剂

高效液相色谱仪: Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪 (G1310A Iso Pump G1314A VWD)。浙江大学智能信息工程研究所 N2000 色谱工作站。柱温箱: Agilent A1-130 温度控制箱。岛津 UV-2101PC 紫外分光光度计。试剂:乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其它试剂均为分析纯。淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号为:737-200111)。

试剂:抗骨增生片、缺淫羊藿的抗骨增生片(南昌济顺制药有限公司)。

2 含量测定方法的考察

2.1 检测波长的选择

根据淫羊藿苷紫外扫描图,淫羊藿苷在 270nm 处有最大吸收峰。故选择 270nm 作为测定波长。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:十八烷基键合硅胶柱 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250mm, 5 μ m); 流动相:乙腈-水 (27:73); 检测波长:270nm; 柱温:40 $^{\circ}$ C; 流量:1 mL/min; 进样量:20 μ L。此条件下淫羊藿苷与相邻的峰达到基线分离。分离度 (R) > 2.0, 理论塔板数均在 3000 以上。

2.3 提取方法和溶剂的考察

曾比较不同方法提取样品(热回流 1h, 85 $^{\circ}$ C 温浸 1h 和超声提取 1h) 3 种方法无明显差异,超声 1h 已提取完全,并简便易行,故选用此法。文献报道中,淫羊藿苷的提取溶剂多用体积分数为 70% 乙醇或甲醇,试验结果表明提取溶剂甲醇较体积分数为 70% 乙醇提取的杂质峰少。

2.4 提取时间的考察

精密取样 3 份,用甲醇作溶剂,分别超声 0.5, 1, 1.5h, 按上述色谱条件测定其淫羊藿苷的含量。结果超声 1h 的提取液所测含量与 1.5h 的提取液结果基本一致,故超声提取 1h

认为提取完全。

2.5 对照品溶液的制备

精密称取淫羊藿苷对照品 10mg, 置 100mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释到刻度,摇匀,精密量取 10mL,置 100mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(每 1mL 含淫羊藿苷 10 μ g)。

2.6 供试品溶液的制备

取本品 20 片,精密称定,除去糖衣,碾细,精密称 0.4g 的粉末,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20mL,密塞,称定重量,超声 1h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,过滤,精密吸取续滤液 5mL,置 10mL 量瓶中,加甲醇至刻度,临进样前经 0.45 μ m 滤膜过滤。

2.7 阴性对照溶液的制备

取缺淫羊藿的抗骨增生片,依照供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.8 可行性试验

取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照品溶液分别在确定的色谱条件下进样分析,阴性样品在样品相应位置上没有干扰存在,说明抗骨增生片中其他药味对淫羊藿中的淫羊藿苷的定量测定没有干扰。

2.9 线性关系的考查

精密称取淫羊藿苷对照品 10mg, 置 100mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液,分别吸取对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20mL, 置 100mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成 5 种不同浓度的对照溶液,按照前述的色谱条件分别进样 20 μ L, 测定其峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品进样量为横坐标,以最小二乘法计算回归方程为 $Y = 333890X - 5106.43$, 相关系数 $r = 0.9995$ 。结果表明淫羊藿苷进样量在 0.020 ~ 0.400 μ g 内有良好的线性关系。

2.10 进样精密度试验

精密吸取淫羊藿苷浓度为 9.134 μ g/mL 对照溶液各 20 μ L, 连续进样 5 次,测得对照品保留时间与峰面积的 RSD 分别为 0.78%。结果证明精密度良好。

2.11 重现性试验

取同一批号供试品一式 5 份,分别按供试品测定方法在给定的色谱条件下进行测定,5 份样品淫羊藿苷含量的 RSD 为 1.2% ($n = 5$),表明本法重现性好。

2.12 稳定性试验

精密吸取同一批号供试品溶液,在5h内每隔1h连续进样2次,每次20 μ L,记录色谱图并计算,结果平均含量为0.19mg/片,RSD=1.09%(n=6)。试验结果表明供试品溶液至少在5h内稳定。

2.13 样品的测定

取各批号的样品按“2.6”项下制备供试溶液,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各20 μ L,按上述色谱条件测定,以外标法计算样品中淫羊藿苷的含量。测定结果见表1,计算方法如下所示:

$$\text{含量} = \frac{A_r \times C_s \times 20 \times 10 \times \text{平均片重}}{W \times A_s \times 5} \quad (\text{mg/片})$$

式中:Cs:对照品溶液的浓度 Ar:供试品溶液的峰面积

As:对照品溶液的峰面积。

表1 样品含量测定结果

Tab 1 The results of sample determination

批号	峰面积	淫羊藿苷(mg/片)	RSD(%)
030201	169846.786	0.195	4.4%
	172940.797		
030202	174562.781	0.207	4.4%
	178945.035		
030203	159676.504	0.190	
	168543.244		

2.14 加样回收率试验

回收率测定方法采用加样回收法。取已知含量的同一批样品粉末9份,精密称定,精密加入淫羊藿苷对照品,依“2.4”项下制备成供试品溶液,按上述色谱条件测定,记录色谱图并计算回收率,见表2。

$$\text{回收率} = \frac{\text{实测出淫羊藿苷的量} - \text{样品含淫羊藿苷的量}}{\text{加入淫羊藿苷的量}}$$

$\times 100\%$

表2 回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery test

批次	样品量(mg)	加入量(mg)	测量值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.195	0.1426	0.3335	98.8%	98.9%	1.1%
2	0.201	0.1426	0.3405	99.1%		
3	0.186	0.1426	0.3279	99.8%		
4	0.215	0.1426	0.3490	97.6%		
5	0.178	0.1426	0.3187	99.4%		
6	0.217	0.1426	0.3571	99.3%		
7	0.169	0.1426	0.3119	100.1%		
8	0.198	0.1426	0.3297	96.8%		
9	0.208	0.1426	0.3492	99.6%		

结果表明该供试品提取方法可行。

4 结论

4.1 采用RP-HPLC法测定抗骨增生片中淫羊藿苷含量,方法简便、准确、灵敏,重现性,回收率均符合要求,可作为该剂的质量控制方法。

4.2 该制剂中另含柚皮苷、生物碱等成分较多,极易发生干扰,含糖最多,因此在比较了多种提取方法后,我们最后采用甲醇提取,结果表明,在超声提取1h后不仅可提取完全,而且减少了糖的干扰。

4.3 流动相的选择:考虑到淫羊藿的柱效和分离情况,曾选择甲醇-水(70:30)、甲醇-水-冰乙酸(60:40:0.5)、乙腈-水(27:73)为流动相,结果乙腈-水(27:73)为流动相分离效果满意。