

HPLC 测定牛膝和决津颗粒中 β -蜕皮甾酮的含量

王洪明¹, 陈炜², 刘冬洁¹, 侯晓虹¹, 梁宁^{1*}

- (1. 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016;
2. 沈阳药科大学生命科学院, 沈阳 110016)

〔摘要〕 目的:建立高效液相色谱法测定牛膝和决津颗粒中 β -蜕皮甾酮的方法。方法:分别采用回流法和超声法提取牛膝和决津颗粒中 β -蜕皮甾酮,并对提取方法进行优化;采用 HPLC 测定 β -蜕皮甾酮的含量,Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μ m) 色谱柱,乙腈-水(17:83)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 242 nm,柱温 30 ℃。结果:牛膝的最佳提取条件为加入 15 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,决津颗粒的最佳提取条件为以水为溶剂超声提取 30 min; β -蜕皮甾酮的线性范围为 10.37 ~ 103.7 mg·L⁻¹,回归方程为 $Y = 24\ 867X + 1\ 563$ ($r = 0.999\ 5$),牛膝和决津颗粒的平均回收率分别为 98.5%,98.4%,RSD 分别为 1.6%,1.4% ($n = 9$)。结论:方法准确可行,重复性好,可为评价决牛膝和决津颗粒质量提供依据。

〔关键词〕 牛膝;决津颗粒; β -蜕皮甾酮;质量控制;高效液相色谱

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)09-0122-04

Determination of Ecdysterone in Radix *Achyranthis bidentatae* and Juejin Granula by HPLC

WANG Hong-ming¹, CHEN Wei², LIU Dong-jie¹, HOU Xiao-hong¹, LIANG Ning^{1*}

- (1. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
2. School of Life Science and Biopharmceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

〔Abstract〕 Objective: To develop a HPLC method for determining the content of ecdysterone in

〔收稿日期〕 20111010(007)

〔第一作者〕 王洪明,硕士研究生,从事中药质量标准的研究,Tel:15998330626, E-mail:wanghongming123@163.com

〔通讯作者〕 * 梁宁,副教授,博士,从事中药质量标准的研究,Tel:024-23986458,13940032938, E-mail:robinln2002@hotmail.com

复性。

通过方法学实验表明加校正因子的主成分自身对照法适用于雷贝拉唑钠中杂质过氧化物砒含量的测定,本色谱条件下,不同的仪器系统中雷贝拉唑钠和过氧化物砒均能达到基线分离。

本方法省略了已知杂质对照品,却能得到使用对照品的效果,同时又省略了操作步骤,使之简便、快速、重复性好,同时可靠程度优于自身对照法和面积归一化法。

〔参考文献〕

[1] 李杰. 波力特[J]. 中国新药杂志,2001,10(8):623.

[2] 杨昭徐. 质子泵抑制剂作用机制的新见解[J]. 中国医药导刊,2008,10(2):165.

[3] 何解生. 抗溃疡药雷贝拉唑的药理与临床[J]. 实用

药物与临床,2005,8(1):42.

[4] P Sreenivasa Rao, Uttam Kumar Ray, P Badarinadh Gupta, et al. Identification, isolation and characterization of new impurity in rabeprazole sodium [J]. J Pharm Biom Analysis,2010, 52(4): 620.

[5] 裴晓丽,刘明月,张小山,等. HPLC 测定雷贝拉唑钠原料的含量及有关物质[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(8): 631.

[6] 饶伟源,兰保强,李茂,等. 康乐鼻炎胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):13.

[7] 黄鸣清,谢友良,王德杭,等. HPLC 同时测定妇炎康片中芍药苷、丹酚酸 B、小檗碱[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):68.

[8] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 29.

〔责任编辑 蔡仲德〕

Achyranthis bidentatae and Juejin Granula. **Method:** Ecdysterone was extracted from Radix *Achyranthis bidentatae* and Juejin Granula using reflux and ultrasonic extraction and optimizing the extraction condition. Determining the content of ecdysterone was determined by HPLC, the chromatography was performed on a Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) at 30 $^{\circ}$ C with acetonitrile-water (17:83) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and UV detection wavelength was at 242 nm. **Result:** The optimal extraction condition of Radix *Achyranthis bidentatae*: reflux extracting two times by adding 15 times of 70% ethanol and once for 1 hour, the optimal extraction condition of Juejin Granula: ultrasonic extracting with water as solvent for 30 min. The linear range of ecdysterone was 10.37-103.7 mg · L⁻¹ ($r=0.9995$), the regress equation was $Y=24867X+1563$ ($r=0.9995$), the recoveries were 97.8% and 97.9%, RSDs were 1.8% and 1.4% ($n=9$). **Conclusion:** The method is accurate, available and reduplicate, and providing the basis for evaluating the quality of Radix *Achyranthis bidentatae* and Juejin Granula.

[**Key words**] Radix *Achyranthis bidentatae*; Juejin granula; ecdysterone; quality control; HPLC

牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根,味苦、酸,性平,归肝、肾经,具有补肝肾,强筋骨,逐瘀通经,引血下行等功效^[1-2]。决津颗粒由当归、牛膝、熟地、肉桂、乌药和泽泻 6 味中药组成,具有活血调经、补血、理气和温里之功效,用于妇人血虚经滞、不能流畅而痛极者。有关牛膝中蜕皮甾酮的定量分析研究,大多采用薄层色谱法^[3]。决津颗粒为本实验室自制,是决津煎的现代剂型,已对决津颗粒中当归、肉桂和熟地中指标性成分进行了定量分析,尚未测定牛膝中的相关成分。 β -蜕皮甾酮,具有促进蛋白质的合成、抑制由于药物引起的血糖升高、降低血浆胆固醇作用、免疫调节作用、使受损的细胞再生等作用^[4]。 β -蜕皮甾酮为牛膝的主要有效成分^[5-7]。本实验采用 HPLC 对牛膝和决津颗粒中的 β -蜕皮甾酮进行了测定,可用于牛膝和决津颗粒的质量控制。

1 材料

高效液相色谱仪(LC-20 AT 泵,SPD-20A 紫外检测器,日本 Shimadzu 公司),AUW120D 型电子分析天平(日本 Shimadzu 公司)。牛膝购自安国市弘发中药材饮片有限公司, β -蜕皮甾酮对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111638-200402);决津颗粒(本实验室自行研制,批号 20110506,20110510,20110516)。乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈-水(17:83),体积流量 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 242 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 β -蜕皮甾酮

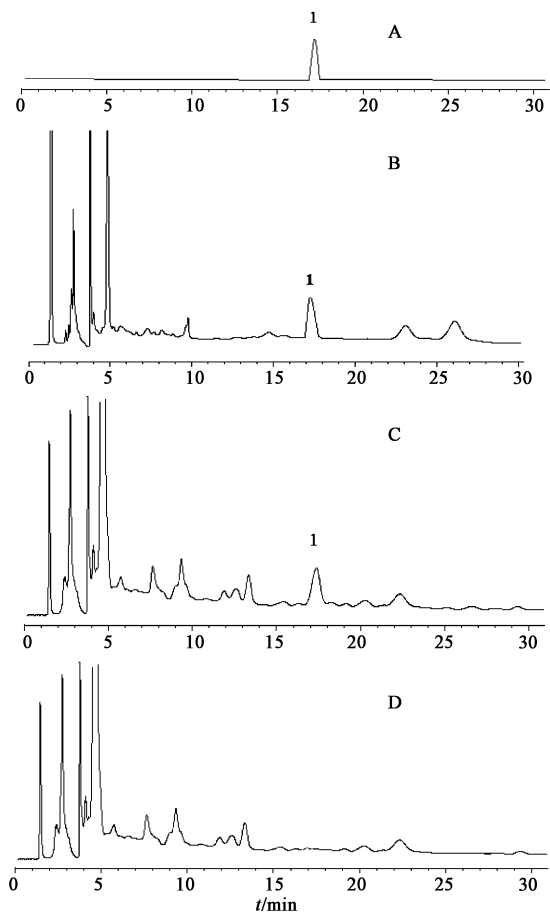
对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液 5 mL 置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 103.7 mg · L⁻¹ β -蜕皮甾酮对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 牛膝样品的制备 取牛膝粉末(过 40 目筛) 0.6 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入 15 倍量 70% 乙醇,回流提取,过滤,重复提取 2 次,每次 1 h。合并滤液,减压回收溶剂至无醇味。将其转移至分液漏斗中,用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,弃去水层;合并正丁醇;将正丁醇挥干后得残渣。残渣用甲醇溶解、转移至 10 mL 量瓶中并稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液,即得。

决津颗粒样品的制备 取装量差异下的决津颗粒 5.0 g,研细,取粉末约 2.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 10 倍量蒸馏水,超声 30 min,滤过,合并滤液。将其转移至分液漏斗中,用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,弃去水层;合并正丁醇,用氨试液萃取 2 次,每次 20 mL,弃去氨试液层;用正丁醇饱和的水洗 3 次,每次 20 mL,弃去水层;将正丁醇挥干后得残渣。残渣用甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中并稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按决津颗粒处方比例准确称取处方中除牛膝以外的其他各味药材,模拟本品的制备工艺和供试品溶液的制备方法,制成缺牛膝的阴性对照溶液。按上述色谱条件进行测定,在 β -蜕皮甾酮保留时间处,无其他成分干扰,见图 1。

2.3 线性关系考察 精密量取 103.7 mg · L⁻¹ β -蜕皮甾酮对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0



A. 对照品;B. 牛膝样品;C. 决津颗粒样品;
D. 阴性样品;1. β -蜕皮甾酮

图 1 牛膝和决津颗粒 HPLC

mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,进样 20 μ L,测定。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 24\,867X + 1\,563$ ($r = 0.999\,5$)。结果表明 β -蜕皮甾酮在 10.37 ~ 103.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4 精密度试验 取 β -蜕皮甾酮对照品溶液 ($41.48\,\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 20 μ L,按色谱条件进样测定,重复 6 次,记录色谱峰,计算得色谱峰面积的 RSD 分别为 1.7%。

2.5 重复性试验 取牛膝粉末和批号 20110510 的决津颗粒样品,分别称取 6 份,制备供试品溶液,进样测定,计算得 β -蜕皮甾酮平均质量分数分别为 0.92, 0.16 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.7% ,1.9%。

2.6 稳定性试验 取牛膝粉末和批号 20110510 的决津颗粒样品,制备供试品溶液,分别放置 0,2,4,6,8,12,24 h 后进样测定,记录色谱图,结果 β -蜕皮甾酮含量的 RSD 分别为 1.8% ,2.0% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 回收率试验 取牛膝粉末和批号 20110510 的决津颗粒样品 9 份,每份分别 0.3,1.4 g,精密称定,按高、中、低 3 个浓度分别精密加入 β -蜕皮甾酮对照品适量,每一浓度平行 3 样本,制备供试品溶液,进样测定,计算得 β -蜕皮甾酮的平均回收率分别为 98.5% ,98.4% ,RSD 分别为 1.6% ,1.4%。见表 1。

表 1 β -蜕皮甾酮加样回收试验

样品	取样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
牛膝	0.301 5	0.277 6	0.217 7	0.492 1	98.5	98.5	1.6
	0.312 6	0.287 8	0.217 7	0.509 6	101.9		
	0.302 5	0.278 5	0.217 7	0.493 1	98.6		
	0.314 8	0.289 9	0.269 5	0.549 6	96.4		
	0.315 6	0.290 6	0.269 5	0.559 6	99.8		
	0.308 9	0.284 4	0.269 5	0.549 4	98.3		
	0.314 8	0.289 9	0.321 3	0.604 1	97.8		
	0.315 6	0.290 6	0.321 3	0.603 6	97.4		
	0.308 9	0.284 4	0.321 3	0.599 9	98.2		
决津颗粒	1.398 1	0.229 3	0.269 5	0.496 6	99.2	98.4	1.4
	1.398 4	0.229 3	0.269 5	0.492 6	97.7		
	1.400 1	0.229 6	0.269 5	0.499 9	100.3		
	1.399 1	0.229 5	0.228 0	0.458 0	100.2		
	1.400 4	0.229 7	0.228 0	0.450 7	96.9		
	1.401 6	0.229 9	0.228 3	0.453 8	98.2		
	1.403 2	0.230 1	0.186 6	0.413 1	98.0		
	1.397 4	0.229 2	0.186 6	0.409 1	96.4		
	1.401 6	0.229 9	0.186 6	0.413 8	98.6		

2.8 样品测定 3 批牛膝样品和决津颗粒样品,每批取样 3 份,按上述方法,分别测定牛膝和决津颗粒中 β -蜕皮甾酮的含量,结果见表 2。

表 2 牛膝和决津颗粒中 β -蜕皮甾酮的测定 ($n=3$)

规格	批号/编号	β -蜕皮甾酮 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD /%
牛膝	1	0.95	0.9
	2	0.92	1.3
	3	0.84	1.6
决津颗粒	20110506	0.19	2.1
	20110510	0.15	0.9
	20110516	0.17	2.0

3 讨论

3.1 牛膝提取方法的考察 以 β -蜕皮甾酮的质量分数为指标,考察了超声提取和回流提取,回流提取方法提取效率较高 ($0.82\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$);采用回流提取法,考察了提取溶剂(不同体积分数的乙醇)、溶剂用量、提取次数、提取时间,结果 15 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 1 h 为佳,提取率为 $0.95\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3.2 决津颗粒提取方法的考察 以 β -蜕皮甾酮的质量分数为指标,考察了超声提取和回流提取方法,超声提取方法提取效率较高 ($0.12\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$);采用超声提取法,考察了水、不同体积分数的甲醇、乙醇为提取溶剂,结果水的提取效率较高 ($0.15\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$);选择水超声提取 15,30,45,60 min 进行研究,以 β -蜕皮甾酮的质量分数作为考察指标,结果表明提取时间为 30 min 时 β -蜕皮甾酮的量高,提取率为 $0.19\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。故可以确定提取溶剂为水,提取时间为 30 min。

3.3 供试品溶液的制备方法 2010 年版《中国药典》,牛膝中 β -蜕皮甾酮的测定中,供试品的制备采用水饱和的正丁醇浸泡过夜再超声处理的方法。作者曾使用药典方法和本实验方法进行比较,发现牛膝中 β -蜕皮甾酮的提取率两方法接近;而使用药典方法时,决津颗粒中 β -蜕皮甾酮的提取率较低,且

干扰峰较多;本实验采用的水超声溶解颗粒后用正丁醇萃取再用氨试液洗去杂质的方法能较完全地将 β -蜕皮甾酮提取出来,且基本无干扰。为保证牛膝和决津颗粒供试品制备的一致性,故均采用提取后再用正丁醇萃取的方法。

3.4 萃取条件考察 为了除去色谱测定时大部分强极性物质的干扰,分别考察了乙酸乙酯、氯仿、乙醚和正丁醇作为萃取溶剂时对 β -蜕皮甾酮的萃取率,结果表明正丁醇萃取率最高,其他成分对 β -蜕皮甾酮的测定干扰少;用氨试液反洗正丁醇层,可以除去糖类以及水溶性色素。

3.5 流动相的考察 本试验考察了甲醇-醋酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-乙腈-水、乙腈-水 4 种流动相系统,发现前 3 个流动相系统下, β -蜕皮甾酮与杂质难以分离,且分析时间较长,最后选择乙腈-水溶液作为流动相系统。

[参考文献]

[1] 刘学湘,陈建伟.牛膝中齐墩果酸的提取工艺研究[J].中国实验方剂学,2001,7(2):5.
[2] 张振凌,吴国学,李君丽.不同种类酒炮炙对牛膝饮片齐墩果酸含量的影响[J].中国实验方剂学,2010,16(6):39.
[3] 张启伟.牛膝中齐墩果酸薄层扫描测定方法的研究[J].中国药学杂志,1995,30:592.
[4] 李金亭,滕红梅,胡正海.牛膝营养器官中蜕皮甾酮的积累动态研究[J].中草药,2007,38(10):1570.
[5] 刘志刚,邓伟杰,孙维峰,等.HPLC 测定泄浊除痹方中薯蓣皂苷元、蜕皮甾酮含量[J].中成药,2010,32(2):243.
[6] 李金亭,滕红梅,胡正海.牛膝营养器官中蜕皮甾酮的积累动态研究[J].中草药,2007,38(10):1570.
[7] 刘姣,周亚球,彭超.怀牛膝蜕皮甾酮的含量测定[J].安徽中医学院学报,2005,24(3):43.

[责任编辑 蔡仲德]