

HPLC 法测定痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量

王志宏, 李雪婷, 王沛*, 王继彦, 贾天宝
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 建立痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法测定痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量。色谱法分析条件为 Agilenttc-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水溶液(10:90), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 17 °C, 检测波长 203 nm。结果: 薯蓣皂苷元量在 1.000 ~ 5.000 μg 与峰面积呈良好的线性关系 $r = 0.9997$, 平均回收率 101.95%, RSD 0.08%。结论: 本方法简便可行、结果准确可靠, 重复性好, 可作为痛风宁微丸中薯蓣皂苷元的含量测定方法。

[关键词] 高效液相色谱法; 痛风宁微丸; 薯蓣皂苷元; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0071-03

Content Determination of Diosgenin in Tongfengning Mini-pill by HPLC

WANG Zhi-hong, LI Xue-ting, WANG Pei*, WANG Ji-yan, JIA Tian-bao
(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining diosgenin in Tongfengning mini-pill. **Method:** HPLC determination of Diosgenin in Tongfengning mini-pill. Column: Agilenttc SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile-water (10:90), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature: 17 °C, detection wavelength was 203 nm. **Result:** Diosgenin in 1.000-5.000 μg range and peak area was linear regression, $r = 0.9997$, the average recovery was 101.95%, RSD 0.08%. **Conclusion:** The method is simple and reproducible for the determination of diosgenin in decoction of Tongfengning mini-pill by HPLC.

[Key words] HPLC; Tongfengning mini-pill; diosgenin; determination

[收稿日期] 20110709(001)

[基金项目] 吉林省科技厅课题(20090926)

[第一作者] 王志宏, 副教授, 从事中药及生化药物与质量监控工作, Tel:0431-86172366, E-mail:wzh1965@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 王沛, 教授, 研究生导师, 从事药物新剂型及新药开发工作, Tel:0431-82225672, E-mail:wapa1988@163.com

- 中黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1545.
- [4] 王小龙, 叶红. 高效液相色谱法测定黄连上清片中栀子苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(1): 7.
- [5] 汪霞. 反相 HPLC 法测定黄连上清片中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8): 1310.
- [6] 黄海燕, 钟建理, 薛漓. 黄连上清片中黄连的鉴别及含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(3): 412.
- [7] 李小娜, 张兰桐, 殷玮. 中药复方药效物质基础研究途径与方法[J]. 中草药, 2006, 37(6): 801.
- [8] 郑晓珂, 魏悦, 冯卫生. 不同采收期连翘的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3): 1.
- [9] 任军, 方国民. 黄连上清片提取工艺研究[J]. 安徽医药, 2003, 7(6): 470.
- [10] 倪永年, 彭韵燕. 化学计量学用于解析黄连上清片的高效液相色谱指纹图谱[J]. 计算机与应用化学, 2007, 24(1): 113.
- [11] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2410.

[责任编辑 蔡仲德]

痛风病是长期嘌呤代谢障碍,尿酸持续增高导致尿酸盐结晶沉积,引起组织损伤的一组临床综合征。临床至今尚无十分满意的治疗药物,对于该病大多采用秋水仙碱、非甾体类抗炎药、糖皮质激素、促尿酸排泄药等,它们在发挥疗效的同时,其副作用也很大。痛风宁作为中药复方治疗痛风病,属于被中医临床作为协定处方应用多年的药物,疗效确切。因此,我们课题组对其质控标准^[1-2]进行研究。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(600 泵,2487 检测器,Millennium³²工作站)Waters 公司;AL204 型电子天平梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-S 型水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂);SK3200H 超声清洗器(上海科导仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 薯蓣皂苷元对照品,(中国药品生物制品检定所,批号 1539-200001)。痛风宁微丸是由本研究室自制(由萆薢、土茯苓、乌药、甘草等 8 味药经提取后,加入适当辅料,制成微丸(批号分别为 100702, 100703, 100804, 100805, 100806, 100808)。阴性对照品,由本研究室自制;

乙腈(色谱纯,Merck 公司),水(杭州娃哈哈纯净水),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

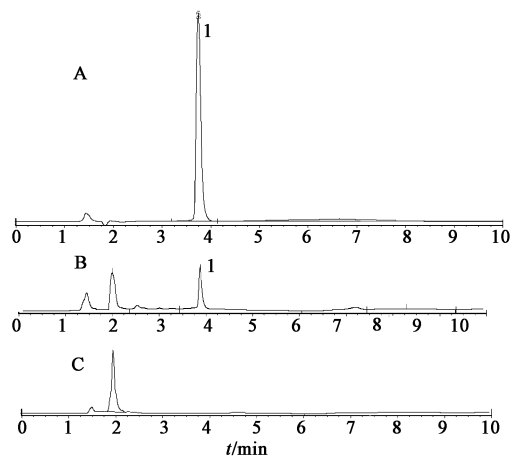
2.1 色谱条件 Autanlit C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水溶液(10:90),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 17 °C。

2.2 对照品溶液的制备 取经 80 °C 干燥至恒重的薯蓣皂苷元对照品 6.25 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,用色谱纯乙腈溶解,并加至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含薯蓣皂苷元 0.25 mg)。

2.3 样品溶液的制备 取痛风宁微丸适量,除去衣层,研细,取约 1.2 g,精密称定,加甲醇 40 mL,加热回流 1 h,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加 3 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 25 mL 溶解,水浴中加热水解 1 h。取出,放冷,加氯仿 30 mL,加热回流 20 min,放冷,滤过,取氯仿液,水浴蒸干,残渣加色谱乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中约含原料样品 10 mg 的溶液,摇匀,用 0.45 μm 微膜滤过,取滤液,作为制剂样品供试品。

2.4 阴性对照品溶液制备 按处方比例称取除萆薢外的其他药物,按痛风宁微丸制法制成的阴性对照品微丸,再按 2.3 项下方法制备阴性对照品。

2.5 系统适应性试验 分别取标准品溶液、样品溶液、阴性对照品溶液在 2.1 项下色谱条件下进行分析,理论塔板数不低于 8 000,阴性对照对供试品测定无干扰。色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品液; C. 阴性对照; 1. 薯蓣皂苷元

图 1 薯蓣皂苷元 HPLC

2.6 标准曲线的制备 精密吸取 2.2 项下的薯蓣皂苷元对照品(标准品)溶液,进样量为 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 18.0, 20.0 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,数据分别为 24 519, 48 975, 73 431, 97 887, 112 004, 122 343。以进样量为横坐标,相应的峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 24\ 655 X - 258.4 (r = 0.9997)$ 。表明薯蓣皂苷元进样量在 1.000 ~ 5.000 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取 2.2 项下的对照品溶液 6 份,每份 5.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别精密吸取 10 μL 进样,测定色谱峰面积为 61 281, 62 353, 61 979, 62 770, 60 282, 60 805。计算得精密度试验 RSD 1.54%,表明实验仪器有良好的精密度。

2.8 稳定性试验 取供试品适量,精密称定,依照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,室温下放置分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 内待测组分峰面积。计算得平均峰面积为 61 241.67, RSD 0.22%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的样品,精密称定,分别加入一定量的薯蓣皂苷元对照品,按供试品溶液的制备方法制备溶液,按上述测定方法进行测定,计算回收率,结果见表 1。

表1 薯蓣皂苷元回收率试验(n=6)

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	10.02	12.44	6.02	18.33	100.7		
2	10.23	13.29	6.02	18.93	102.0		
3	8.65	9.43	4.31	13.44	102.2	101.95	0.08
4	8.89	9.88	4.31	13.82	102.6		
5	6.32	6.72	2.56	9.21	100.7		
6	6.32	6.98	2.56	9.21	103.5		

2.10 样品测定 分别取批号为100702,100703,100804,100805,100806,100808的6批样品,按2.3项下方法,制备制剂样品供试品溶液,精密吸取20μL,手动进样,含量偏差及RSD,见表2。

表2 6批痛风宁微丸样品测定(n=8)

No.	1/mg	2/mg	3/mg	平均含量 /mg	标示含量 /mg	实测含量 /%	RSD /%
1	14.65	14.75	14.59	14.66	15.00	97.70	0.45
2	15.54	15.78	16.54	15.95	15.00	106.3	0.26
3	16.33	16.58	16.23	16.38	15.00	109.2	0.08
4	15.98	15.98	15.32	15.76	15.00	105.0	1.90
5	16.12	16.25	16.32	16.23	15.00	108.2	0.51
6	14.99	14.86	15.01	14.95	15.00	99.68	0.44

3 讨论

3.1 供试品溶液制备的溶剂选择 由于本制剂属于中药复方制剂,成分比较复杂,考虑到在含量测定时杂质的干扰,对样品的溶解度进行了测定试验。按《中国药典》2010年版一部凡例的标准规定,对样品和薯蓣皂苷元对照品进行了溶解测定考察,通过使用甲醇、乙醇、醋酸乙酯、苯、氯仿等试剂进行比较,结果使用氯仿溶解的效果最佳。

3.2 色谱条件的选择 色谱条件根据上述样品的溶解性并参考有关文献^[3-5],确定薯蓣皂苷元分子中存在一双键,考虑到在紫外末端有弱的吸收,结合我们实验的结果,最终采用了Agilenttc-C₁₈柱,乙腈-水溶液(10:90)为流动相,流速1.0 mL·min⁻¹,收到了较好的实验结果。

[参考文献]

[1] 黄嗣航. 高效液相色谱法测定金刚藤浸膏中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中医药导报, 2008, 2(2): 69.

[2] 左宏笛, HPLC法测定萆薢分清丸中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国药房, 2008, 8(9): 692.

[3] S B Mahato, N P Sahu, S K Roy, et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of diosgenin in plants[J]. Chromatography, 1981, 206: 169.

[4] 沈娟, 武向峰, 朱臻宇, 等. RP-HPLC法测定金刚藤软胶囊中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国新药与临床药理, 2005, 16(6): 438.

[5] 付辉政, 万凯化, 刘敏. HPLC-ELSD法测定抗病毒分散片中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国新药与临床药理, 2008, 19(5): 380.

[责任编辑 蔡仲德]