

替代对照品法测定淫羊藿中淫羊藿苷的含量^{*}

李莉, 郝小燕^{**}, 刘昌福, 肖海涛

(贵阳医学院药学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 替代对照品法测定淫羊藿中淫羊藿苷的含量。方法: 选取芦丁作为淫羊藿中淫羊藿苷的替代对照品, 在不同的条件下测定替代对照品相对对照品的校正因子, 利用校正因子和替代对照品芦丁进行淫羊藿中淫羊藿苷的含量测定。结果: 淫羊藿苷和芦丁进样量分别在 0.13 ~ 3.20 μg ($r=0.9996$) 和 0.34 ~ 8.50 μg ($r=0.9997$) 内与峰面积呈良好的线性关系 ($n=6$), 测得校正因子 $f=2.5861$, 用替代对照品测定法测得回收率为 96.01% ($n=9$), RSD=1.42%。结论: 在高效液相色谱仪上用替代对照品测定淫羊藿中淫羊藿苷的含量是可行的、实用的。

[关键词] 替代对照品; 校正因子; 芦丁; 淫羊藿

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)03-0246-05

Determination of Icariin Contents in *Epimedium brevicornum* Maxim. with Substitute Reference Substance

LI Li, HAO Xiaoyan, LIU Changfu, XIAO Haitao

(College of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) substitute reference method for determination of icariin in *Epimedium brevicornum* Maxim. **Methods:** Rutin was chosen as substitute reference substance. Correction factor was obtained by measuring icariin and rutin contents in *Epimedium brevicornum*, reference substance, and substitute reference substance respectively under different conditions. Icariin contents of *Epimedium brevicornum* was determined with substitute reference substance and the correction factor. **Results:** The calibration curve for icariin and rutin were linear in the range of 0.13 ~ 3.20 μg ($r=0.9996$) and 0.34 ~ 8.50 μg ($r=0.9997$) respectively. The correction factor (f) was 2.5861. The average recovery was 96.01% ($n=9$), and RSD was 1.42%. **Conclusions:** This method is feasible and pragmatic.

[Key words] substitute reference substance; correction factor; rutin; epimedium

对照品是药品质量控制中的重要物质,而在实际工作中,有些对照品从植物中提取率低,分离困难,导致了它的价格昂贵,检验成本高。因此,探索用一种易得而又便宜的对照品来替代价格高的对照品进行含量测定研究,是解决这一困难的重要途径之一^[1~4]。淫羊藿为小檗科植物,具有补肾壮阳、祛风除湿、强筋健骨的功效,适用于肾虚阳痿、

腰膝痠软、肢冷畏寒等症,具有很高的药用价值。《中国药典》2010 版已有高效液相色谱的含量测定方法^[5],但淫羊藿苷对照品价贵,分析成本高。本文运用替代对照品芦丁测定淫羊藿中淫羊藿苷的含量,并分析用芦丁作为替代对照品进行淫羊藿药材质量控制的可行性。

* [基金项目] 贵州省科学技术基金项目(合同号:20082153),贵阳市科技局“产学研”技术项目(合同号:2008-24-2)。

** 通讯作者 E-mail: haoxiaoyan@vip.163.com

1 仪器与药材

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,色谱仪 1),岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津公司,色谱仪 2),Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,色谱仪 3);色谱柱:依利特 Betasil C₁₈(200 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱号: E1716553,批号 6560(色谱柱 1);依利特 Hypersil BDS C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱号: E17151048,批号 5/120/7737(色谱柱 2);Agilent Eclipse XDB-C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) PN: 993967-902,SN,USKH016698(色谱柱 3)。旋转蒸发仪 EYELA SB-2000(上海爱朗仪器有限公司),水浴锅(上海爱朗仪器有限公司),分析天平(上海台衡仪器仪表有限公司)。

1.2 试药 芦丁对照品(批号 100416-200707,中国药品生物制品检定所),淫羊藿苷对照品(批号 110737-200312,中国药品生物制品检定所);淫羊藿药材购于贵阳市三桥药材批发市场,经贵阳医学院龙庆德老师鉴定;乙腈和甲醇为色谱醇,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定波长的选择

以流动相为溶剂在 200~500 nm 范围内扫描,测得淫羊藿苷对照品和替代对照品芦丁的紫外吸收图谱(图 1)。可以看出,淫羊藿苷对照品的最大吸收波长为 270 nm,替代对照品芦丁的最大吸收波长为 257 nm,因此选择这两个波长作为检测波长。

2.2 色谱条件和系统适用性试验

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,淫羊藿苷检测波长为 270 nm,芦丁检测波长为 257 nm,流动相为甲醇-1%醋酸(45:55),流速为 1 ml/min,柱温 30 ℃;进样量为 15 μl。淫羊藿苷峰形对称性好,分离度高,理论塔板数按淫羊藿苷或芦丁峰面积计算均不低于 2 000。

2.3 溶液的配制

对照品溶液的配制:精密称取适量淫羊藿苷对照品,用甲醇溶解并稀释制成 0.128 g/L 的对照品溶液;精密称取适量芦丁对照品,用甲醇溶解并稀

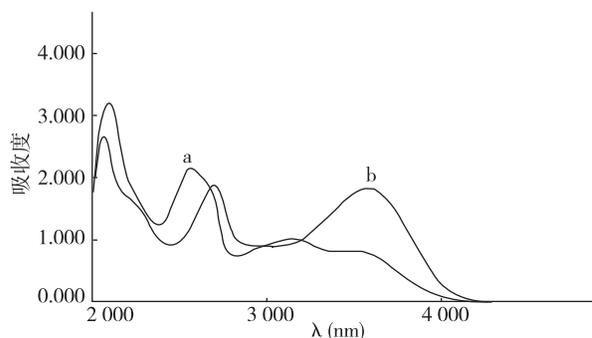


图 1 淫羊藿苷对照品和替代对照品芦丁的紫外吸收图谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of rutin(a) and icariin(b)

释成 0.340 g/L 的替代对照品溶液。供试品溶液制备:取淫羊藿药材约 1.0 g,精密称定,用 30 ml 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,回收乙醇至干,用甲醇溶解并转移至 25 ml 的容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,续滤液即为供试品溶液。

2.4 *f* 值测定方法

按“2.2”项下的色谱条件,取淫羊藿苷对照品溶液或芦丁对照品溶液分别进样 1, 5, 10, 15, 20 及 25 μl,以绝对进样量(X)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标,分别绘制对照品和替代对照品的标准曲线,将标准曲线的截距校正为 0 后,得到各自标准曲线的斜率 K 值,替代对照品与对照品 K 值之比即得校正因子 f 。

2.5 *f* 值测定方法耐用性的考察

2.5.1 仪器柱温对 f 值测定的影响 为考察 HPLC 的柱温箱温度变化对 f 值的影响,分别在 28、29、30、31 及 32 ℃ 时测定淫羊藿苷对照品和替代对照品芦丁标准曲线的斜率 K ,计算校正因子 f 。结果显示,在同一台高效液相色谱仪上,柱温变化 ± 2 ℃ 对淫羊藿苷对照品的校正因子 f 影响不大, RSD 为 1.0%。

2.5.2 仪器流速对 f 值测定的影响 分别设定流速为 0.96、0.98、1.0、1.02 及 1.04 ml/min 时测定对照品淫羊藿苷和替代对照品芦丁标准曲线的斜率 K ,计算 f 值。结果显示,在同一台高效液相色谱仪上,流速变化 0.02 ml/min 对淫羊藿苷对照品的校正因子 f 影响不大, RSD 为 1.1%。

2.5.3 仪器波长对 f 值测定的影响 在同一台高效液相色谱仪上分别于 266、268、270、272 及 274 nm 处测定对照品淫羊藿苷的斜率 K ; 在 253、

255、257、259及261 nm处测定替代对照品芦丁的斜率K,计算*f*值。结果显示,测定波长在规定波长处变化±4 nm,对淫羊藿苷对照品的校正因子*f*影响不大,RSD为1.2%。

2.5.6 不同液相色谱仪对*f*值测定的影响 依利特 Hypersil BDS C18(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱在 Agilent1100 高效液相色谱仪、岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪、Agilent1100 高效液相色谱仪进行测定,结果显示,用3台不同高效液相色谱仪测定,对淫羊藿苷对照品的校正因子*f*影响不大,RSD为1.4%。

2.5.7 不同品牌或不同批号的同类型色谱柱对*f*值测定的影响 用同一台高效液相色谱仪,分别用3根不同品牌的同类型色谱柱测定淫羊藿苷对照品的校正因子*f*,结果显示,更换色谱柱,对淫羊藿苷对照品的校正因子*f*影响不大,RSD为1.6%。

2.5.8 流动相pH值对*f*值测定的影响 HPLC的流动相的pH值可能在配制过程中出现偏差,用同一台高效液相色谱仪,分别用不同浓度的醋酸(0.9%,1.0%和1.1%)配制的流动相测定淫羊藿苷对照品的校正因子*f*,结果显示,流动相醋酸浓度变化0.1%对淫羊藿苷对照品的校正因子*f*影响不大,RSD为1.2%。

2.5.9 流动相的组成比例对*f*值测定的影响 用同一台高效液相色谱仪,分别在流动相为甲醇-1%醋酸在40:60,45:55和50:50比例下测定淫羊藿苷对照品的校正因子*f*,结果显示,流动相比比例变化5%对淫羊藿苷对照品的校正因子*f*影响不大,RSD为1.1%。

2.5.10 *f*值的测定 在实际检测工作中,不同仪器和不同色谱柱是主要变化因素,因此用此两项下求得的*f*值计算, $f = (2.6075 + 2.5647)/2 = 2.5861$ 。

2.6 线性关系考察

将配好的对照品淫羊藿苷和替代对照品芦丁溶液,在“1.2.2”项的色谱条件下,按“1.2.4”项*f*值测定方法进行测定,得淫羊藿苷的线性回归方程为 $Y = 169.91X + 46.42$ $r = 0.9996$,在0.13~3.20 μg之间有良好的线性关系;芦丁的线性回归方程为 $Y = 445.94X + 107.44$ $r = 0.9997$,在0.34~8.50 μg之间有良好的线性关系。

2.7 精密度实验

取“2.3”项下配制好的对照品淫羊藿苷和替代对照品芦丁溶液,按“2.2”项下的色谱条件,重

复进样6次,记录对照品淫羊藿苷和替代对照品芦丁的峰面积,并计算各自的RSD值,RSD值分别为0.66%和0.20%,仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

照“2.3”项下制备供试品溶液,分别于即刻4、8、12、16及20 h精密吸取供试品溶液15 μl进样,记录淫羊藿苷的峰面积,进行20 h稳定性考察,RSD=0.95%,表明样品在20 h内稳定。

2.9 重复性试验

照“2.3”项下制备供试品溶液5份(批号20091201),按“2.11”项下操作,计算得出淫羊藿药材中淫羊藿苷的含量0.82%,RSD=1.0%。

2.10 回收率试验

称取0.5 g的淫羊藿药材粉末(含量0.82%)9份,精密称定,三份一组,每组分别精密加入淫羊藿苷对照品(每1 ml含1 mg淫羊藿苷)2、4及6 ml,照“2.3”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,分别精密吸取对照品及供试品溶液各15 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图,计算淫羊藿苷的总量,进而计算回收率,结果按外标法计算回收率为96.44%,RSD=1.41%。按替代对照品法计算回收率为96.01%,RSD=1.42%。见表1、表2。

表1 对照品法回收率实验

Tab.1 Results of recovery test of reference substance method

样品中淫羊藿苷的量(mg)	加入淫羊藿苷量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均(%)	RSD(%)
4.01	2.00	5.98	98.50		
4.11	2.00	6.01	95.00		
4.06	2.00	5.95	94.50		
4.11	4.00	7.95	96.00		
4.07	4.00	7.92	96.25	96.44	1.41
4.06	4.00	7.94	97.00		
4.07	6.00	9.95	98.00		
4.05	6.00	9.88	97.17		
4.02	6.00	9.75	95.50		

2.11 样品含量测定

分别称取批号为20091011、20091201、20091202的淫羊藿药材粉末(过三号筛),照“2.3”项下供试品溶液的制备方法制备供试品,分别精密吸取芦丁的对照品溶液及供试品溶液,在“2.2”项下相应的色谱条件下进行测定,记录色谱图,按外标法计算,所得结果乘以校正因子2.5861得淫羊藿苷含量。在用替代对照品测定样品含量的同时,

取淫羊藿苷对照品适量,用流动相溶解并稀释成浓度为 0.35 g/L 的溶液,作为对照品溶液,精密量取 15 μ l,注入液相色谱仪,在 270 nm 检测,记录色谱图,见图 2。按外标法进行计算,得淫羊藿苷含量。结果见表 3。

表 2 替代对照品法回收率实验

Tab. 2 Results of recovery test of substitute reference substance

样品中淫羊藿苷的量(mg)	加入淫羊藿苷量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均(%)	RSD(%)
4.02	2.00	5.93	95.50		
4.09	2.00	5.98	94.50		
4.13	2.00	6.01	94.00		
4.11	4.00	7.97	96.50		
4.10	4.00	8.02	98.00	96.01	1.42
4.06	4.00	7.94	97.12		
4.03	6.00	9.75	95.33		
4.09	6.00	9.94	97.50		
4.11	6.00	9.85	95.67		

表 3 三批药材的含量测定($n=3$)

Tab. 3 Icraiin contents tested in 3 batches of samples

批号	对照品法(%)	替代对照品法(%)	相对偏差(%)
20091011	0.65	0.67	0.64
20091201	0.82	0.81	0.61
20091202	0.75	0.78	0.76

3 讨论

测定替代对照品相对于对照品的“相对校正因子”,用替代对照品结合校正因子进行药品质量控制。校正因子(f) = $(A_i/C_i)/(A_r/C_r)$,式中 A_i 为替代对照品的峰面积, A_r 为对照品的峰面积, C_i 为替代对照品的浓度, C_r 为对照品的浓度。在一定的色谱条件下,配置一定浓度的对照品和替代对照品溶液,分别以进样量为横坐标,以峰面积为纵坐标,分别测定对照品和替代对照品的标准曲线,将标准曲线的截距校正为 0 后,用两条标准曲线斜率 K 的比值求得校正因子(f)^[6,7]。测定样品时,用对照品进行测定,被测样品浓度 $C_x = A_x/(A_r/C_r)$;同时用替代对照品进行测定,被测样品浓度 $C_x = f \times A_x/(A_i/C_i)$,式中 A_x 为被测样品峰面积。

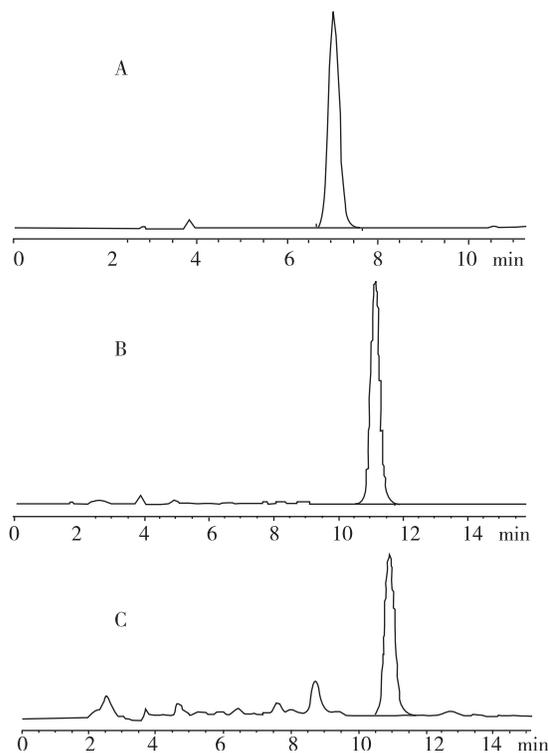


图 2 替代对照品芦丁(A)、对照品淫羊藿苷(B)和淫羊藿药材(C)的色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of substitute reference substance (A), reference substance (B) and *Epimedium* herbs (C)

在本实验供试品溶液制备过程中,分别对提取液剂量、提取次数、提取时间进行了考察,结果显示,采用 30 ml 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h 的方法提取更加完全。

用对照品测定淫羊藿中淫羊藿苷含量和用替代对照品法测定淫羊藿中淫羊藿苷含量,这两种方法比较,后者引入了相对校正因子(f),也就引入新的误差。用对照品测定淫羊藿中淫羊藿苷的回收率和采用替代对照品测定淫羊藿中淫羊藿苷的回收率,所得计算结果接近,两种方法测得的含量结果接近。因此认为用替代对照品法对淫羊藿苷进行药品质量控制是可行的。实验建立了在 HPLC 色谱中,应用替代对照品法测定淫羊藿中淫羊藿苷的含量的方法,方法简便、准确、快速、重现性好,为一些对照品稀少而且价格昂贵的中药材及药品的质量控制提供一定的参考价值。

4 参考文献

[1] 谢元超,金少鸿. 替代对照品法用于丹参和复方丹参

- 片含量测定的研究[J]. 药物分析杂志,2007(4):497-520.
- [2] 魏锋,李启艳,马玲云,等. 对照品替代法同时测定中药和保健食品中6种大豆异黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2009(5):725-730.
- [3] 袁耀佐,顾洁,杭太俊,等. 用替代对照品羟苯乙酯高效液相色谱方法测定大蒜辣素[J]. 分析化学,2008(8):1083-1088.
- [4] 何欢,马双成,张启明,等. HPLC 替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中6种成分的含量[J]. 药物分析杂志,2009(11):1892-1899.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:306-308.
- [6] 叶磊,曹进,徐燕,等. 胆酸类成分 HPLC /ELSD 单一标准品替代法含量测定研究[J]. 中成药,2004(9):750.
- [7] 刘敏,胡昌勤. 力达霉素标准量值传递方法的研究[J]. 药物分析杂志,2004(4):380.
(2011-01-14 收稿,2011-03-31 修回)

(上接第 245 页)

4 参考文献

- [1] Greer BE, Koh WJ, Abu-Rustum NR, et al. Cervical cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw,2010(12):1388-1416.
- [2] 刘兰芳,孙海燕. 831 例 35 岁以下妇女宫颈癌的临床病理特点和预后[J]. 中国癌症杂志,2008(4):298-301.
- [3] 温旺荣,李莉,钟玉婷,等. 应用改良导流杂交法检测 103 例妇女 HPV 基因型[J]. 暨南大学学报(医学版),2007(6):595-601.
- [4] Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MG, et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil [J]. BMC Res Notes,2010(1):96.
- [5] Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, et al. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer [J]. J Natl Cancer Inst. 2011(5):368-383.
- [6] 周明书,余兰,任国庆,等. 应用表面等离子共振生物传感器分型检测 HPV 及其应用评价[J]. 中国优生与遗传杂志,2010(1):19-22.
- [7] 徐华林,卞美璐,陈庆云,等. 多聚酶链反应方法与杂交捕获 II 代在人乳头瘤病毒感染检测及宫颈病变诊断中的应用价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2010(6):455-458.
- [8] Li C, Wu M, Wang J, et al. A population-based study on the risks of cervical lesion and human papillomavirus infection among women in Beijing, People's Republic of China [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010(10):2655-2664.
- [9] de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study [J]. Lancet Oncol,2010(11):1048-1056.
- [10] Bruni L, Diaz M, Castellsague X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings[J]. J Infect Dis,2010(12):1789-1799.
- [11] Kay P, Soeters R, Nevin J, et al. High prevalence of HPV 16 in South African women with cancer of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia [J]. J Med Virol, 2003(2):265-273.
- [12] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Cervical Cancer Screening// www. nccn. org.
- [13] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. Clin Microbiol Rev,2003(1):1-17.
- [14] Lee SA, Kang D, Seo SS, et al. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA chip [J]. Cancer Lett,2003(2):187-192.
- [15] Kjaer SK, Brule AJ t, Paull G, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study [J]. BMJ,2002(7364):572.
- [16] Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B, et al. Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions [J]. Gynecol Oncol,2009(1):115-119.
(2011-04-06 收稿)