

HPLC 法同时测定怀牛膝中 3 种甾酮类成分

穆海风, 李会军, 陈 君, 李 萍*

(中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

摘 要 建立怀牛膝中 3 种甾酮类成分含量测定方法, 比较不同产地牛膝的质量差异。色谱柱为 Venusil XBP C₁₈ 柱, 流动相为 0.1% 甲酸-乙腈(84:16), 检测波长为 250 nm。在所建立的方法中, β -蜕皮甾酮、*R*-牛膝甾酮和 *S*-牛膝甾酮与杂质分离良好, 线性范围分别为 3.07~1 470.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 4, n=6$), 0.52~246.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 7, n=6$), 0.47~225.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 8, n=6$), 平均回收率分别为 101.4%、101.1% 和 101.1%。本方法适用于同时测定怀牛膝中 β -蜕皮甾酮、*R*-牛膝甾酮及 *S*-牛膝甾酮的含量。

关键词 怀牛膝; 含量测定; β -蜕皮甾酮; *R*-牛膝甾酮; *S*-牛膝甾酮

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2014)02-0210-03

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140214

Simultaneous determination of three sterones in *Achyranthis bidentatae* Radix by RP-HPLC

MU Haifeng, LI Huijun, CHEN Jun, LI Ping*

State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract An HPLC method was established for the simultaneous determination of β -ecdysterone, *R*-inokosterone and *S*-inokosterone in the *Achyranthis bidentatae* Radix to compare the quality from different habitats. Three phytoecdysones were separated with a Venusil XBP C₁₈ column by isocratic elution using 0.1% formic acid in water and acetonitrile (84:16) as the mobile phase, while the UV detector wavelength was set at 250 nm. Calibration curves of β -ecdysterone, *R*-inokosterone and *S*-inokosterone were linear over the range of 3.07-1 470.00, 0.52-246.00, and 0.47-225.00 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Average recoveries were 101.4%, 101.1% and 101.1%, respectively. The established method will be helpful in the quality control of *Achyranthis bidentatae* Radix.

Key words *Achyranthis bidentatae* Radix; quantification; β -ecdysterone; *R*-inokosterone; *S*-inokosterone

This study was supported by Special Scientific Research Foundation for Traditional Chinese Medicines from State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China(No. 201307002)

牛膝为苋科植物牛膝(*Achyranthis bidentatae* B1.)的干燥根。牛膝性平, 味甘苦酸, 具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行之功效^[1], 用于治疗腰膝骨痛、四肢拘挛、淤血腹痛、跌打损伤等症。牛膝中含有甾酮、皂苷和多糖等多种成分^[1]。药理实验研究表明, 牛膝中的甾酮类物质(主要包括 β -蜕皮甾酮、*R*-牛膝甾酮和 *S*-牛膝甾酮等)有促进成骨样细

胞增殖作用^[3], 这与牛膝补肝肾、强筋骨功效吻合。2010 年版《中华人民共和国药典》即以 β -蜕皮甾酮作为怀牛膝的质量控制指标^[1]。为了提高质量评价方法的专属性, 本试验建立了同时测定怀牛膝中 3 种甾酮类成分的 HPLC 方法, 并应用该方法对所收集的不同产地怀牛膝药材样品进行了含量测定及结果分析, 以期对牛膝的质量评价提供依据。

1 材 料

1.1 药品与试剂

β -蜕皮甾酮、*R*-牛膝甾酮、*S*-牛膝甾酮对照品为本实验室自制,经 MS、NMR 鉴定结构(图 1),HPLC 测定纯度达 98% 以上。6 批药材样品(NX01-NX06)收集于药材主产地河南、河北、内蒙

古,并均由本研究组李会军教授鉴定为苋科植物牛膝(*Achyranthes bidentata* Bl.)的干燥根,凭证标本保存于天然药物活性组分与药效国家重点实验室(中国药科大学)。

乙腈(色谱纯,德国默克公司);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),水为重蒸水,其余为分析纯。

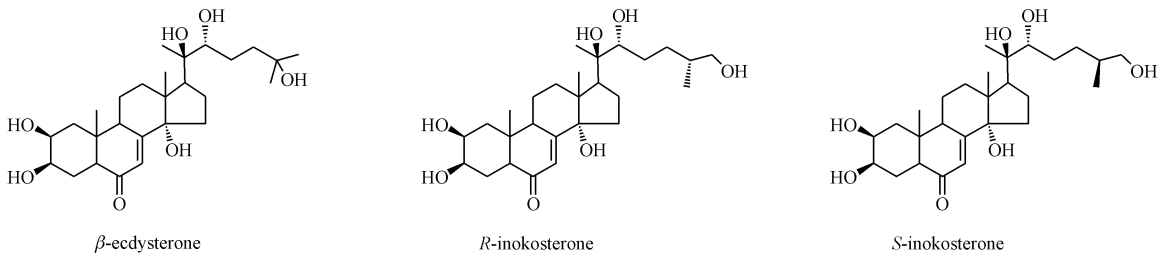


Figure 1 Chemical structures of three phytoecdysterones from *Achyranthes bidentatae* Radix

1.2 仪 器

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪及附件(美国 Agilent 公司);Sartorius BT224S 型(万分之一)及 BT25S 型(十万分之一)电子天平(德国 Sartorius 公司);MUL-9000Series 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Venusil XBP C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m),北京吉瑞森科技有限公司;流动相为 0.1% 甲酸-乙腈(84:16),体积流量 1.0 mL/min;检测波长 250 nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L。在上述色谱条件下, β -蜕皮甾酮、*R*-牛膝甾酮、*S*-牛膝甾酮与样品中其他成分均能达到完全分离,分离度大于 1.5,理论板数不小于 4 000。色谱分离图见图 2。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取 β -蜕皮甾酮对照品 4.90 mg、*R*-牛膝甾酮 0.82 mg、*S*-牛膝甾酮 0.75 mg 置于 2 mL 量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 毫升含 β -蜕皮甾酮 2.450 mg、*R*-牛膝甾酮 0.410 mg、*S*-牛膝甾酮 0.375 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 3 号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加水饱和和正丁醇 45 mL,密塞,称定,浸泡过夜,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)30 min,补足失重量,滤过,滤渣和滤器用甲醇

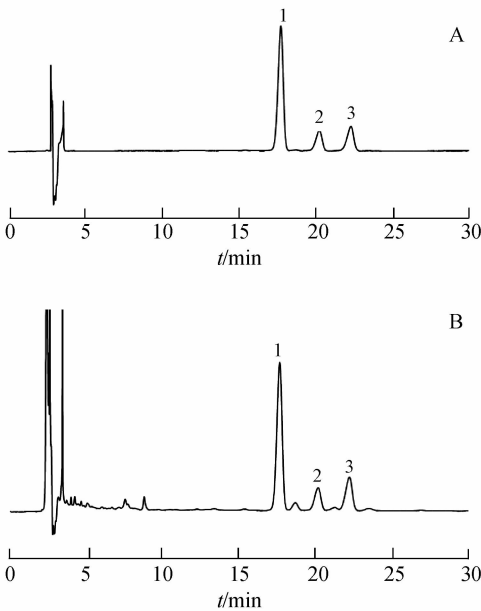
1: β -ecdysterone;2:*R*-inokosterone;3:*S*-inokosterone

Figure 2 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample solution (B)

10 mL 分数次洗涤,合并滤液和洗液,蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察

取“2.2”项下制得的对照品溶液,依次稀释到混合对照品溶液的 3/5、1/5、1/20、1/80、1/320、1/800,进样 10 μ L,按“2.1”项测定 β -蜕皮甾酮、*R*-牛膝甾酮、*S*-牛膝甾酮的色谱峰峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),进样浓度(μ g/mL)为横坐标(X),进



行线性回归,得回归方程分别为:蜕皮甾酮 $Y = 7.032 X + 52.233, r = 0.999\ 4 (n = 6)$; R -牛膝甾酮 $Y = 7.448 X + 13.884, r = 0.999\ 7 (n = 6)$, S -牛膝甾酮 $Y = 11.424 X + 1.641\ 8, r = 0.999\ 8 (n = 6)$ 。结果表明,三者线性范围分别为 $3.07 \sim 1\ 470.00$ 、 $0.52 \sim 246.00$ 和 $0.47 \sim 225.00\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.5 精密度

精密吸取“2.2”项下制得的对照品溶液,稀释到原浓度的 $1/8$,进样 $10\ \mu\text{L}$,于 $1\ \text{d}$ 连续重复进样 6 次,测定峰面积,得到 β -蜕皮甾酮、 R -牛膝甾酮和 S -牛膝甾酮面积的 $\text{RSD} (n = 6)$ 分别为 0.52% 、 0.61% 、 0.19% ;连续进样 $3\ \text{d}$,每天进样 3 次,测定峰面积,计算 β -蜕皮甾酮、 R -牛膝甾酮和 S -牛膝甾酮峰面积的 $\text{RSD} (n = 9)$ 分别为 0.83% 、 2.16% 和 1.36% 。

2.6 重复性

取同一批次牛膝干燥粉末 6 份,精密称定,按“2.3”项下制备样品溶液,在上述色谱条件下进样,进样量为 $10\ \mu\text{L}$,得到 β -蜕皮甾酮、 R -牛膝甾酮和 S -牛膝甾酮的平均质量分数分别为 $0.057\ 6\%$ 、 $0.007\ 9\%$ 和 0.011 , $\text{RSD} (n = 6)$ 分别为 0.38% 、 1.61% 和 1.15% 。表明该方法的

重复性良好。

2.7 稳定性

精密吸取同一供试品溶液进样 $10\ \mu\text{L}$,分别于 $0, 2, 4, 8, 12, 24\ \text{h}$ 进样分析,记录峰面积,测得 β -蜕皮甾酮、 R -牛膝甾酮和 S -牛膝甾酮峰面积的 $\text{RSD} (n = 6)$ 分别为 0.93% 、 0.88% 和 1.29% 。结果表明供试品溶液在 $24\ \text{h}$ 内稳定。

2.8 加样回收率

精密称定含量已知的牛膝药材粉末 9 份,每份约 $0.5\ \text{g}$,置锥形瓶中。每组分别精密加入 β -蜕皮甾酮、 R -牛膝甾酮和 S -牛膝甾酮对照品适量,制成低、中、高质量浓度的溶液,按“2.3”项下制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行分析,进样量为 $10\ \mu\text{L}$ 。计算加样回收率和 RSD 。 β -蜕皮甾酮、 R -牛膝甾酮和 S -牛膝甾酮平均加样回收率 $(n = 9)$ 分别为 101.40% 、 101.15% 和 101.10% , RSD 分别为 1.60% 、 1.30% 和 1.10% 。

2.9 样品测定

购自不同产地的怀牛膝药材,分别按“2.3”项下制备样品溶液,按上述色谱条件进行分析,每份溶液进样 3 次,按外标法计算 β -蜕皮甾酮、 R -牛膝甾酮和 S -牛膝甾酮的含量,结果见表 1。

Table 1 Results of sterone contents of Achyranthis bidentatae Radix from different origin by RP-HPLC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Sample	Province	β -ecdysterone/%	R -inokosterone/%	S -inokosterone/%	Sterones/%
NX-01	Inner Mongolia	$0.102\ 9 \pm 0.000\ 2$	$0.014\ 8 \pm 0.000\ 2$	$0.017\ 4 \pm 0.000\ 3$	$0.135\ 1 \pm 0.000\ 6$
NX-02	Hebei	$0.067\ 6 \pm 0.000\ 1$	$0.011\ 0 \pm 0.000\ 1$	$0.013\ 2 \pm 0.000\ 1$	$0.091\ 7 \pm 0.000\ 1$
NX-03	Henan	$0.040\ 9 \pm 0.000\ 1$	$0.004\ 5 \pm 0.000\ 1$	$0.007\ 7 \pm 0.000\ 0$	$0.053\ 1 \pm 0.000\ 0$
NX-04	Henan	$0.050\ 9 \pm 0.000\ 1$	$0.007\ 1 \pm 0.000\ 1$	$0.009\ 9 \pm 0.000\ 0$	$0.067\ 9 \pm 0.000\ 0$
NX-05	Henan	$0.059\ 5 \pm 0.000\ 1$	$0.009\ 1 \pm 0.000\ 1$	$0.011\ 2 \pm 0.000\ 0$	$0.079\ 8 \pm 0.000\ 1$
NX-06	Henan	$0.030\ 8 \pm 0.001\ 1$	$0.004\ 9 \pm 0.000\ 1$	$0.006\ 3 \pm 0.000\ 1$	$0.041\ 9 \pm 0.000\ 0$

3 讨 论

利用建立的方法对不同来源的牛膝样品进行测定,从含量测定结果可知,6 批样品中 β -蜕皮甾酮的含量均大于 0.030% ,均符合 2010 年版《中华人民共和国药典》含量测定项要求。但从甾酮类成分的含量测定结果看,在收集的所有样品中,河南道地产区的药材中甾酮类成分的含量总体上略低于内蒙和河北两个产地。因此,以甾酮类成分为指标来评估不同产地牛膝药材质量值得商榷。另外, β -蜕皮甾酮的平均含量偏低 (仅约为 0.060%),在后期实验中将考虑增添牛膝中其他

含量高的化学成分作为含量测定评价指标,以更好地控制牛膝的质量。

参 考 文 献

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia; part 1 (中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 67.
[2] Shen S, Wang Q, Li YB. Studies on chemical constituents an pharmaceuticals activity of Achyranthes bidentata Bl [J]. Strait Pharma J (海峡药学), 2011, 23 (11): 1-6.
[3] Sun FY, Pan QH, Hong A. The Effect of promotion osteoblast proliferation and mechanism research of Achyranthes [J]. J Chin Mater Med (中药材), 2004, 27 (4): 264-265.