

HPLC同时测定芪骨胶囊中5种成分的含量

杨成梓¹, 范兴², 包侠萍³, 南淑华³, 姜志宏⁴

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2. 福建医科大学孟超肝胆医院, 福州 350025;
3. 厦门中药厂股份有限公司, 厦门 361100; 4. 澳门科技大学, 澳门 999078)

[摘要] 目的:建立芪骨胶囊的多成分指标定量方法。方法:采用高效液相色谱法同时测定芪骨胶囊中松果菊苷、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷和柚皮苷的含量,Platisil-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以甲醇-乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,流速1 mL·min⁻¹,检测波长270 nm,柱温30℃。结果:松果菊苷,柚皮苷,朝藿定B,朝藿定C,淫羊藿苷分别在91~3 094 ng($r=0.999\ 8$),19~646 ng($r=0.999\ 7$),11~374 ng($r=0.999\ 5$),25~850 ng($r=0.999\ 5$),29~986 ng($r=0.999\ 6$)与峰面积呈良好的线性关系;平均回收率分别为98.9%(RSD 1.2%),99.1%(RSD 1.3%),99.1%(RSD 1.5%),99.4%(RSD 1.5%),99.3%(RSD 1.5%)。结论:所建立的方法简便、准确、重复性好,可用于芪骨胶囊的质量控制。

[关键词] 芪骨胶囊; 高效液相色谱法; 松果菊苷; 朝藿定B; 朝藿定C; 淫羊藿苷; 柚皮苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160060

Content Determination of Five Components in Qigu Capsules by HPLC YANG Cheng-zi¹, FAN Xing², BAO Xia-ping³, NAN Shu-hua³, JIANG Zhi-hong⁴ (1. *Pharmacy Collage, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China*; 2. *Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China*; 3. *Xiamen Traditional Chinese Medicine Co. Ltd., Xiamen 361100, China*; 4. *Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China*)

[Abstract] **Objective:** To establish the multi-index quantitative method for Qigu capsules. **Method:** The contents of echinacoside, naringin, epimedin B, epimedin C and icariin were determined simultaneously by HPLC. Platisil-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used and eluted with the mobile phase of acetonitrile-methanol-water in a gradient mode at the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 270 nm, and the column temperature was 30℃. **Result:** Echinacoside, naringin, epimedin B, epimedin C, icariin showed a good linear relationship in the ranges of 91-3 094 ng ($r=0.999\ 8$), 19-646 ng ($r=0.999\ 7$), 11-374 ng ($r=0.999\ 5$), 25-850 ng ($r=0.999\ 5$), 29-986 ng ($r=0.999\ 6$), respectively. The average recoveries were 98.9% (RSD 1.2%), 99.1% (RSD 1.3%), 99.1% (RSD 1.5%), 99.4% (RSD 1.5%), 99.3% (RSD 1.5%), respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and highly reproducible, and so can be used to control the quality of Qigu capsules.

[Key words] Qigu capsules; HPLC; echinacoside; naringin; epimedin B; epimedin C; icariin

芪骨胶囊是上海名中医石印玉教授在长期的临床实践中摸索出来的经验方,由淫羊藿、黄芪、肉苁蓉、骨碎补、制何首乌、石斛、菊花7味中药组成,具有补肾壮骨的功效,主要适用于原发性骨质疏松(肝肾不足证型)^[1]。芪骨胶囊现行的质量标准只对成品中所含有的淫羊藿苷进行了HPLC含量测

定^[2],为进一步有效控制产品内在质量,本实验采用HPLC同时测定芪骨胶囊中松果菊苷、柚皮苷、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷含量,为全面控制芪骨胶囊的质量提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT型高效液相色谱分析仪(日

[收稿日期] 20150221(003)

[基金项目] 福建省科技厅对外合作重点项目(201210004)

[第一作者] 杨成梓,副教授,硕士,从事中药资源与品质评价研究, E-mail: tiebaojin@163.com

本岛津公司), KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), BSA224S-CW 型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 试药 柚皮苷(批号 20120221), 松果菊苷(批号 20121125), 朝藿定 B(批号 20120928), 朝藿定 C(批号 20120618), 淫羊藿苷(批号 20120706) 对照品, 均购自上海源叶生物科技有限公司, 含量测定用; 15 批芪骨胶囊(S1 ~ S15, 批号 110101-1, 110701, 111101, 120301, 120401, 120501, 120503, 120505, 120701, 121101, 121201, 130101, 130102, 130301, 130302) 及阴性药, 均由厦门中药厂有限公司提供。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为纯化水。其余试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 色谱条件 Platisil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-乙腈-水, 按表 1 程序进行梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 270 nm, 进样量 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions for flow phase

t/min	甲醇/%	乙腈/%	水/%
0 ~ 10	4 ~ 11	1 ~ 7	95 ~ 82
10 ~ 33	11 ~ 13	7 ~ 19	82 ~ 68
33 ~ 37	13	19 ~ 22	68 ~ 65
37 ~ 47	13 ~ 17	22 ~ 26	65 ~ 57
47 ~ 57	17 ~ 25	26 ~ 34	57 ~ 41
57 ~ 67	25 ~ 50	34 ~ 33	41 ~ 17
0 ~ 10	4 ~ 11	1 ~ 7	95 ~ 82

2.2 溶液的制备

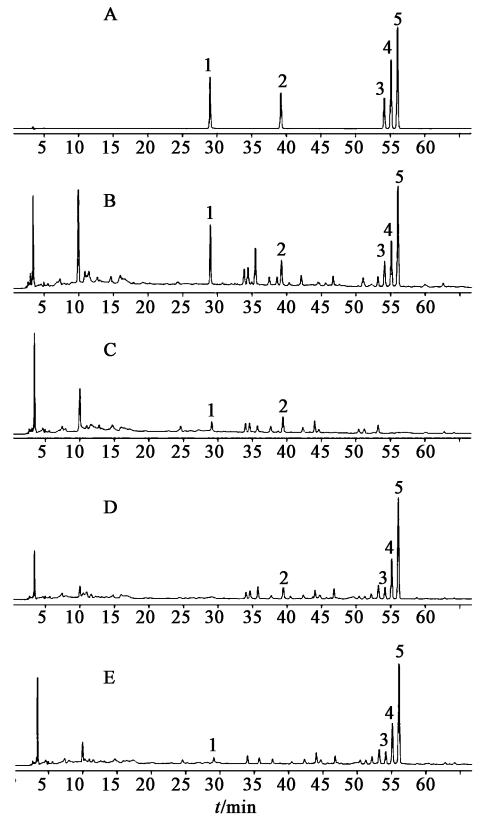
2.2.1 对照品溶液的制备 取对照品松果菊苷, 柚皮苷, 朝藿定 B, 朝藿定 C, 淫羊藿苷适量, 精密称定, 加甲醇配成质量浓度分别为 0.91, 0.19, 0.11, 0.25, 0.29 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为混合对照品溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取芪骨胶囊内容物约 0.55 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 密塞, 称定质量, 加入甲醇 30 mL, 超声 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 备用。

2.2.3 阴性供试液的制备 取芪骨胶囊阴性样品, 按 2.2.2 项下的方法处理, 即得阴性供试液。

2.3 专属性试验 精密吸取上述混合对照品、样品溶液及阴性供试液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上

述色谱条件进行分析。结果样品溶液在与对照品相同的保留时间位置上有色谱峰, 而阴性样品溶液在此位置无色谱峰, 表明样品中其他成分对松果菊苷、柚皮苷、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的测定无干扰, 见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品; C. 缺淫羊藿阴性样品; D. 缺肉苁蓉阴性样品; E. 缺骨碎补阴性样品; 1. 松果菊苷; 2. 柚皮苷; 3. 朝藿定 B; 4. 朝藿定 C; 5. 淫羊藿苷

图 1 芪骨胶囊 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Qigu capsules

2.4 线性关系考察 精密移取 2.2.1 项下混合对照品溶液 0.02, 0.12, 0.22, 0.32, 0.42, 0.68 mL 置 2 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度。精密吸取 10 μL, 依次注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以对照品峰面积(Y)为纵坐标, 以对照品溶液的进样量(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y_{\text{松果菊苷}} = 397.6X - 23\ 152$ ($r = 0.999\ 8$), $Y_{\text{柚皮苷}} = 1\ 621.5X - 2$ ($r = 0.999\ 7$), $Y_{\text{朝藿定 B}} = 2\ 402.0X - 5\ 287$ ($r = 0.999\ 5$), $Y_{\text{朝藿定 C}} = 2\ 315.3X - 21\ 905$ ($r = 0.999\ 5$), $Y_{\text{淫羊藿苷}} = 2\ 937.1X - 10\ 400$ ($r = 0.999\ 6$)。结果表明松果菊苷, 柚皮苷, 朝藿定 B, 朝藿定 C, 淫羊藿苷进样量在 91 ~ 3 094, 19 ~ 646, 11 ~ 374, 25 ~ 850, 29 ~ 986 ng 与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取同一质量浓度混合对照品溶

液,按上述色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,计算得松果菊苷,柚皮苷,朝藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷峰面积的 RSD 分别为 0.1%, 0.2%, 0.2%, 0.2%, 0.2%, 0.2%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, 按 2.1 项下条件进样分析,测得松果菊苷,柚皮苷,朝藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.4%, 0.4%, 0.5%, 0.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称定芪骨胶囊内容物(批号 130102)约 0.55 g,按 2.2.2 项下分别制备供试品 6 份,按 2.1 项下条件进样分析,测得松果菊苷,柚皮苷,朝藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷平均质量分数分别为 5.58, 1.43, 0.41, 1.52, 1.92 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.1%, 1.2%, 1.4%, 1.3%, 1.4%, 表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量同一批次供试品 9 份(批号 130102),每份 0.28 g,精密称定。平均分为 3 组,以 80%, 100%, 120% 3 水平浓度分别精密加入 5 种对照品溶液:松果菊苷(0.48 g·L⁻¹) 2.5, 3.2, 3.8 mL,柚皮苷(0.62 g·L⁻¹) 0.5, 0.6, 0.8 mL,朝藿定 B(0.45 g·L⁻¹) 0.2, 0.25, 0.3 mL,朝藿定 C(0.22 g·L⁻¹) 1.5, 1.9, 2.3 mL,淫羊藿苷(0.25 g·L⁻¹) 1.7, 2.1, 2.5 mL;按 2.2.2 项方法制备成供试品溶液,按 2.1 项色谱条件测定松果菊苷,柚皮苷,朝藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷的含量,计算回收率,结果见表 2。

2.9 样品测定 取不同批次批芪骨胶囊,按 2.2.2 项同法制备 15 批供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,记录峰面积,按外标法计算,结果见表 3。

3 讨论

3.1 含量测定指标成分的选择 芪骨胶囊是由淫羊藿、黄芪、肉苁蓉、骨碎补等 7 味中药组成。淫羊藿作为处方中的君药,有效成分主要为黄酮类化合物,其所含的朝藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷含量相对较高,且具有类似的药理活性^[3-5],能增强性腺功能、促进骨生长。随着对淫羊藿药材研究的深入,已把朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷同时作为淫羊藿药材及相关复方制剂的质量控制指标^[6-7]。复方中佐药肉苁蓉具有补肾阳、益精血的作用,所含的松果菊苷是其活性成分之一;使药骨碎补能够补肾强骨、续伤止痛,其主要有效成分之一为柚皮苷。因此,同时选取朝藿定 B,朝藿定 C,淫羊藿苷,松果菊苷和柚皮苷为芪骨胶囊的质量控制指标性成分。由

表 2 芪骨胶囊中 5 种成分的加样回收率试验(n=3)

Table 2 Experiment for recovery rate of five components in Qigu capsules(n=3)

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
松果菊苷	0.281 1	1.536	1.215	2.721	97.5	98.9	1.2
	0.280 3	1.529	1.519	3.045	99.8		
	0.279 5	1.527	1.823	3.338	99.3		
柚皮苷	0.281 1	0.407	0.322	0.728	99.7	99.1	1.3
	0.280 3	0.403	0.402	0.795	97.7		
	0.279 5	0.401	0.482	0.883	100.0		
朝藿定 B	0.281 1	0.113	0.088	0.202	100.8	99.1	1.5
	0.280 3	0.112	0.112	0.222	98.5		
	0.279 5	0.108	0.132	0.237	98.0		
朝藿定 C	0.281 1	0.431	0.339	0.762	97.6	99.4	1.5
	0.280 3	0.427	0.423	0.853	100.6		
	0.279 5	0.422	0.508	0.929	99.8		
淫羊藿苷	0.281 1	0.541	0.425	0.967	100.2	99.3	1.5
	0.280 3	0.532	0.531	1.051	97.7		
	0.279 5	0.527	0.637	1.165	100.1		

表 3 芪骨胶囊样品含量测定(n=3)

Table 3 Determination results of Qigu capsules (n=3) mg·g⁻¹

No.	松果菊苷	柚皮苷	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷
S1	11.31	1.20	0.85	1.98	3.45
S2	11.32	1.44	0.92	1.76	3.01
S3	11.83	1.09	0.45	3.73	2.66
S4	6.96	1.51	1.21	1.83	3.76
S5	9.56	0.85	1.11	1.94	3.38
S6	10.14	1.08	1.07	2.07	3.50
S7	7.29	1.11	0.67	1.47	2.47
S8	8.70	1.16	0.69	2.29	3.93
S9	10.03	1.26	1.37	0.83	2.32
S10	5.89	1.70	0.34	1.79	1.44
S11	7.27	1.28	0.51	1.60	1.85
S12	7.59	1.31	0.50	1.61	1.89
S13	5.52	1.46	0.40	1.54	1.93
S14	5.24	1.44	0.40	1.55	1.93
S15	5.33	1.45	0.41	1.53	1.92

于臣药黄芪的指标成分黄芪甲苷在近紫外区只在末端 200 nm 有吸收,用 HPLC-PDA 干扰严重,已使用 HPLC-ELSD 测定芪骨胶囊中黄芪甲苷含量(另文报道)。

3.2 提取条件的优化 通过对不同溶媒的考察,结果以甲醇溶液提取,效果最佳。在提取方法上,

对回流、超声与索氏提取3种方法进行考察,结果显示甲醇超声提取所得待测成分的含量较高,提取效率较高,故采取甲醇超声作为供试品溶液的制备方法。在提取时间上,对超声时间20,30,40,50 min进行考察,结果发现超声处理30 min各目标成分提取完全,且随着超声时间延长对结果无显著影响。

3.3 色谱条件的优化 在关于流动相的选择,本实验分别考察了甲醇-乙腈与水、磷酸、冰乙酸及甲酸溶液等组合,结果以甲醇-乙腈-水进行的梯度洗脱效果最好,可使各待测成分得到理想的分离。在确定检测波长时同时关注各目标成分,松果菊苷紫外最大吸收波长约为332 nm,柚皮苷约为283 nm,朝藿定B、朝藿定C及淫羊藿苷约为270 nm。结果显示,在270 nm波长下松果菊苷、柚皮苷、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷5种成分均能得到较好的响应,且色谱峰达到基线分离,故确定270 nm为检测波长,效果良好。

[参考文献]

- [1] 王和鸣,葛继荣,朱汉民,等. 芪骨胶囊治疗原发性骨质疏松症临床试验总结[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(8):12-15.
- [2] 包侠萍. 密骨胶囊的研发[Z]. 福建省:厦门中药厂有限公司, 2009-01-12.
- [3] Meng F H, Li Y B, Xiong Z L, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(3):193.
- [4] 孟繁浩. 中药精选小复方骨疏丹促成骨细胞骨形成作用的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2004.
- [5] 詹扬,韦英杰,王长梅,等. 基于斑马鱼模型评价微量淫羊藿苷和朝藿定B的抗骨质疏松活性[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(1):30-35.
- [6] 张华峰,高翔,卢大炎,等. HPLC法同时测定淫羊藿中朝藿定A、B、C与淫羊藿苷的含量[J]. 分析测试学报, 2007, 26(2):198-201.
- [7] 李晓龙,梁光义,曹佩雪,等. HPLC同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5):891-893.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

②<http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。