

抗骨增生丸定性定量方法研究

陈英红*, 黄恩喜, 高 阳, 姜瑞芝
(吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 建立抗骨增生丸质量标准。方法: 采用 TLC 法对制剂中鸡血藤和骨碎补进行了鉴别; 其中鸡血藤的薄层色谱鉴别采用鸡血藤为对照药材, 以三氯甲烷-丙酮(15: 1)为展开剂; 骨碎补的薄层色谱鉴别采用柚皮苷为对照品, 以苯-醋酸乙酯-甲酸-水(1: 12: 2.5: 3)为展开剂。采用 HPLC 法测定制剂中淫羊藿苷和松果菊苷含量。流动相分别为乙腈-水(30: 70)和甲醇-0.1% 甲酸(28.5: 71.5)。结果: 淫羊藿苷平均回收率为 97.7%, RSD 为 1.2% ($n=5$); 松果菊苷平均回收率为 97.9%, RSD 为 0.8% ($n=5$)。结论: 鉴别方法专属性强, 定量方法准确, 稳定, 重现性好, 可作为抗骨增生丸的质量控制标准。

[关键词] 抗骨增生丸; 柚皮苷; 鸡血藤; 淫羊藿苷; 松果菊苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)07-0020-04

Studies on Qualitative and Quantitative Methods of Kangguzengsheng Pills

CHEN Ying-hong*, HUANG En-xi, GAO Yang, JIANG Rui-zhi

(Academy of Traditional Chinese Medicine and Material Medical of Jilin Province Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the quality control standards for Kangguzengsheng Pills. **Methods:** Caulis Spatholobi and Rhizoma Drynariae in Pills were identified by TLC. Chloroform-acetone(15: 1) was used as developing solvent for Caulis Spatholobi with reference drug. Benzene-ethyl acetate-formic acid-water(1: 12: 2.5: 3) was used for Rhizoma Drynariae with naringin as chemical reference substance. The content of icariin and echinacoside were determined by HPLC with external standard method. The mobile phases were acetonitrile-water(30: 70) and methanol-0.1% formic acid(28.5: 71.5) respectively. **Results:** The average recovery of icariin 97.7% and RSD was 1.2% ($n=5$). The average recovery of echinacoside was 97.9% and RSD was 0.8% ($n=5$). **Conclusion:** These methods are simple, accurate and specific and can be used for the quality control of Kangguzengsheng Pills.

[Key words] Kangguzengsheng Pills; Naringin; Caulis Spatholobi; Icariin; Echinacosid

抗骨增生丸由熟地、鹿衔草、骨碎补、鸡血藤、淫羊藿、肉苁蓉、莱菔子七味药组成。原制剂为片剂, 载于中药部颁标准(编号: WS3-B-01338-93), 原标准无薄层鉴别及含量测定。因本品具有补肾, 活血, 止痛之功效, 用于肥大性脊椎炎, 颈椎病, 跟骨刺, 增生性关节炎, 大骨节病, 临床效果较好, 现将剂型改为水丸。为了进一步控制该制剂的质量, 采用 TLC 法对制剂中鸡血藤和骨碎补进行了鉴别^[1]; 用 HPLC 法测定制剂中主要药物淫羊藿和肉苁蓉的有效成分

淫羊藿苷和松果菊苷含量^[2~5], 为该制剂的质量标准提供了定性和定量的检测方法。

1 仪器、试剂和供试样品

LC-2010 高效液相色谱仪; SPD-M10A_{VP} 二极管阵列检测器; CLASS-VP 工作站(日本岛津)。紫外光灯(上海安亭仪器厂), 硅胶 G(青岛海洋化工厂), 淫羊藿苷、松果菊苷和柚皮苷对照品, 鸡血藤对照药材(中国药品生物制品检定所提供), 抗骨增生丸(吉林中研药业, 批号: 050101, 050102, 050103 三批); 阴性对照(按处方药味除去被测药材, 其余药味按成药的生产工艺制备的模拟样品)。

2 鉴别

[收稿日期] 2005-09-22

[通讯作者] 陈英红, Tel: (0431) 6816839

2.1 鸡血藤 TLC 鉴别 取抗骨增生丸 20 丸, 研细, 取粉末 3g, 加乙醇 100mL, 加热回流 1h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10mL 使溶解, 用三氯甲烷 20mL 振摇提取 1 次, 分取三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加甲醇 0.5mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取除鸡血藤的阴性样品, 同法制备阴性对照品溶液。另取鸡血藤对照药材 2g, 同法制成对照药材溶液。吸取上述三种溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-丙酮(15:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显 1 个相同颜色的荧光斑点。阴性对照在相应位置上无斑点, 说明所建立的方法成立。

2.2 骨碎补 TLC 鉴别 取抗骨增生丸 20 丸, 研细, 取粉末 5g, 加甲醇 50mL, 加热回流 1h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30mL 使溶解, 加乙酸乙酯 30mL 萃取 1 次, 分取乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 2mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取除骨碎补的阴性样品, 同法制备阴性对照品溶液。另取柚皮苷对照品, 加甲醇制成每 1mL 含 0.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯-乙酸乙酯-甲酸-水(1:12:2.5:3)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。阴性对照在相应位置上无斑点, 说明所建立的方法成立。

3 含量测定

3.1 淫羊藿苷的测定

3.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Diamonsil C₁₈(4.6 \times 250mm); 乙腈-水(30:70)为流动相; 检测波长为 270nm。流速 1.0mL \cdot min⁻¹, 进样量 20 μ L。

3.1.2 淫羊藿苷对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品 12.2mg, 加甲醇溶解并稀释至 50mL 量瓶中, 取 2mL 加甲醇稀释至 10mL。制成每 1mL 含 48.8 μ g 的对照品溶液。

3.1.3 供试品溶液的制备 取抗骨增生丸 20 丸, 研细, 取约 1g, 精密称定, 置 100mL 具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇(取乙醇 529mL, 加水稀释至 1000mL) 50mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 60min, 放冷, 用稀乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤

液, 用微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

3.1.4 测定法 分别精密吸取对照品溶液 10 μ L 与供试品溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪, 以上述色谱条件测定, 根据淫羊藿苷峰面积值, 以外标法计算供试品中淫羊藿苷含量。

3.1.5 标准曲线与线性范围 精密吸取上述对照品溶液 3, 6, 9, 12, 15, 20 μ L 注入液相色谱仪测定, 以进样量(μ g)对峰面积绘制标准曲线。淫羊藿苷回归方程为 $Y = -7.116 \times 10^3 + 2.137 \times 10^6 X$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 在上述色谱条件下, 淫羊藿苷进样量在 0.15~0.98 μ g 范围内, 峰面积与浓度成良好的线性关系。

3.1.6 阴性对照试验 取淫羊藿阴性样品按 3.1.3 操作制得阴性供试品, 用与样品相同的条件测定, 阴性试验在淫羊藿苷的位置无干扰峰。见图 1 2 3。

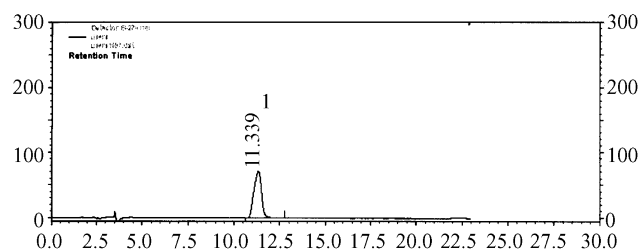


图 1 对照品淫羊藿苷

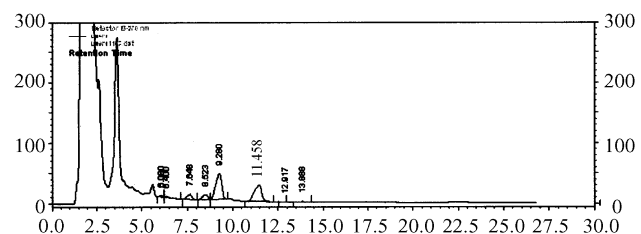


图 2 样品淫羊藿苷

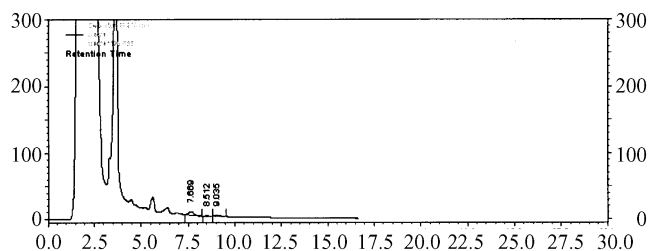


图 3 阴性样品

3.1.7 精密度试验 精密吸取同 1 批号样品溶液 20 μ L, 重复 5 次测定淫羊藿苷, 其 RSD 为 0.7%。

3.1.8 重复性试验 取同一批号样品 5 份, 分别按供试品溶液制备法制备, 测定其淫羊藿苷峰面积值, 其结果样品中淫羊藿苷平均含量为 0.753mg \cdot g⁻¹, 其 RSD 为 0.6%。

3.1.9 加样回收率试验 取已知含量的样品 5 份。

分别精密加入淫羊藿苷对照品溶液,按含量测定方法操作制备供试品溶液,并按上述色谱条件测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

编号	取样量 (g)	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.5014	0.3781	0.3660	0.7344	97.3		
2	0.5113	0.3855	0.3660	0.7385	96.4		
3	0.4958	0.3738	0.3660	0.7347	98.6	97.7	1.3
4	0.5126	0.3865	0.3660	0.7410	96.8		
5	0.5002	0.3772	0.3660	0.7411	99.4		

3.2 松果菊苷的测定

3.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Diamonsil C₁₈(4.6 × 250mm); 甲醇-0.1% 甲酸(28.5:71.5) 为流动相; 检测波长为 330nm。流速 1.0mL·min⁻¹, 进样量 20μL。

3.2.2 松果菊苷对照品溶液的制备 精密称取松果菊苷对照品 9.8mg, 加 60% 甲醇溶解并稀释至 50mL 量瓶中, 精密吸取 4mL 加 60% 甲醇稀释至 10mL。制成每 1mL 含 78.4μg 的对照品溶液。

3.2.3 供试品溶液的制备 取抗骨增生丸 20 丸, 研细, 取约 2g, 精密称定, 置 100mL 棕色量瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50mL, 密塞, 称定重量, 浸泡 30min 后, 超声处理(50℃以下) 60min, 放冷, 用 50% 甲醇补足缺失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜滤过, 即得供试品。

3.2.4 测定法 分别精密吸取对照品溶液 10μL 与供试品溶液 20μL, 注入液相色谱仪, 以上述色谱条件测定, 根据松果菊苷峰面积值, 以外标法计算供试品中松果菊苷含量。

3.2.5 标准曲线与线性范围 精密吸取对照品溶液 3, 6, 9, 12, 15, 20μL 注入液相色谱仪测定, 以进样量(μg) 对峰面积绘制标准曲线。松果菊苷回归方程为 $Y = -23.917 + 1.469 \times 10^6 X$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 在上述色谱条件下, 松果菊苷进样量在 0.24~1.57μg 范围内, 峰面积与浓度成良好的线性关系。

3.2.6 阴性对照试验 取肉苁蓉阴性样品按 3.2.3 操作制得阴性供试品, 用与样品相同的条件测定, 阴性试验在松果菊苷的位置无干扰峰。见图 4 5 6。

3.2.7 精密度试验 精密吸取同一批号样品溶液 20μL 重复 5 次测定松果菊苷, 其 RSD 为 0.7%。

3.2.8 重复性试验 取同 1 批号样品 5 份, 分别按

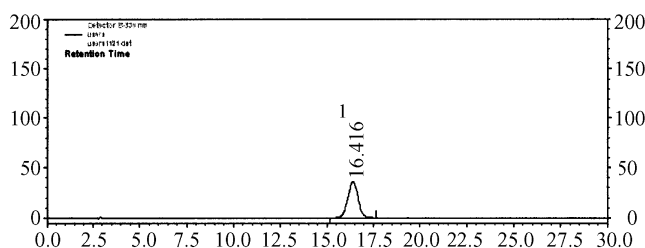


图 4 对照品松果菊苷

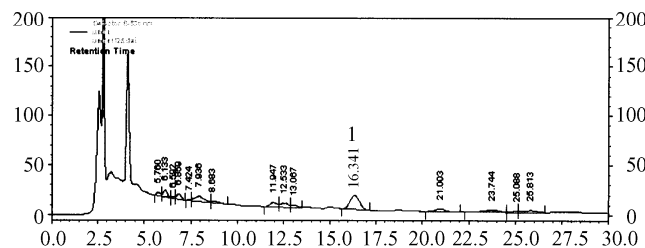


图 5 样品松果菊苷

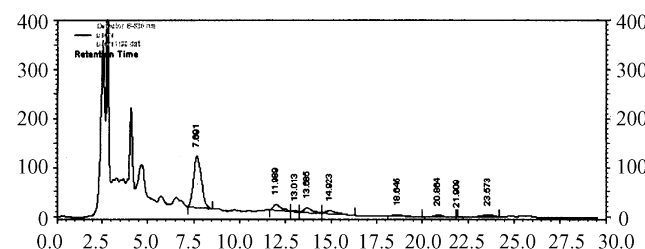


图 6 阴性样品

样品溶液制备法制备, 测定其松果菊苷峰面积值, 其结果样品中松果菊苷平均含量为 0.350mg·g⁻¹, 其 RSD 为 1.5%。

3.2.9 加样回收率试验 取已知含量的样品 5 份。分别精密加入松果菊苷对照品溶液, 按含量测定方法操作制备供试品溶液, 并按上述色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收率试验

编号	取样量 (g)	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	1.0012	0.3504	0.3920	0.7339	97.8		
2	1.0456	0.3660	0.3920	0.7505	98.1		
3	1.0113	0.3540	0.3920	0.7337	96.9	97.9	0.8
4	1.0008	0.3503	0.3920	0.7389	99.1		
5	1.1023	0.3858	0.3920	0.7685	97.6		

3.3 样品含量测定 取 3 批样品制备供试品溶液在选定的色谱条件下进样 20μL, 外标法计算其淫羊藿苷和松果菊苷的含量, 结果见表 3。

表 3 3 批样品含量测定结果

样品批号	淫羊藿苷含量(mg·g ⁻¹)	松果菊苷含量(mg·g ⁻¹)
050101	0.754	0.350
050102	0.785	0.325
050103	0.706	0.365

4 讨论

选用高效液相色谱法测定制剂中淫羊藿苷和松果菊苷的含量,以达到控制“抗骨增生丸”质量的目的。该含量测定方法具有简便易行、定量准确等特点。为建立制剂质量标准提供了依据。

[参考文献]

[1] 邓晓梅,孙亦群.薄层色谱法鉴别通痹合剂中的鸡血藤及南蛇藤[J].广东药学,2004,14(5):7-8.

- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部,北京:化学工业出版社,2005.134,179,229.
- [3] 吕东.高效液相色谱法测定复方锁阳补肾胶囊中淫羊藿苷的含量[J].药物分析杂志,2003,23(4):339.
- [4] 雷丽,屠鹏飞.反相高效液相色谱法测定苁蓉酒中松果菊苷的含量[J].色谱,2002,20(6):582.
- [5] 张思巨,刘丽.HPLC同时测定肉苁蓉药材中松果菊苷和毛蕊花苷的含量[J].中国药学杂志,2004,39(10):740-741.