

HPLC 法同时测定抗骨增生丸中 毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷的含量

朱燕, 黄义纯, 严晓明*

(韶关市食品药品检验所, 韶关 512028)

摘要 目的: 建立同时测定抗骨增生丸中毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷 3 种成分含量的高效液相色谱法。方法: 应用 HPLC-梯度洗脱法, 采用 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以水为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 乙腈为流动相 C 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 25 °C。结果: 毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷测定浓度的线性范围分别为 5.08~101.6、7.56~151.2 和 5.13~102.6 μg · mL⁻¹, *r* 均大于 0.999; 平均加样回收率分别为 100.5%、99.5% 和 99.3%, RSD 均小于 1.0%。样品中毛蕊花糖苷、柚皮苷、淫羊藿苷含量分别为 1.06~1.17、1.75~1.88、1.32~1.53 mg · 丸⁻¹。结论: 该实验方法可有效地控制抗骨增生丸的质量。

关键词: 抗骨增生丸; 毛蕊花糖苷; 柚皮苷; 淫羊藿苷; 中成药含量测定; 高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 05-0917-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.05.25

Simultaneous determination of verbascoside, naringin and icariin in Kangguzengsheng pills by HPLC

ZHU Yan, HUANG Yi-chun, YAN Xiao-ming*

(Shaoguan Institutes for Food and Drug Control, Shaoguan 512028, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determining three constituents (verbascoside, naringin and icariin) in Kangguzengsheng pills. **Methods:** The separation was performed on a C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution. The mobile phase was composed of water solution (A), methanol (B) and acetonitrile (C) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 270 nm and the column temperature was 25 °C. **Results:** The linear ranges were 5.08–101.6 μg · mL⁻¹ for verbascoside, 7.56–151.2 μg · mL⁻¹ for naringin and 5.13–102.6 μg · mL⁻¹ for icariin, respectively. The correlation coefficients of all curves were above 0.999. The average recoveries of three analytes were 100.5% for verbascoside, 99.5% for naringin, and 99.3% for icariin, with RSD less than 1.0%. The contents of verbascoside, naringin and icariin in 3 samples were 1.06–1.17 mg per pill, 1.75–1.88 mg per pill and 1.32–1.53 mg per pill, respectively. **Conclusion:** The developed HPLC method can be used for the quality control of Kangguzengsheng pills.

Keywords: Kangguzengsheng pills; verbascoside; naringin; icariin; assay of traditional Chinese medicine composition; HPLC

第一作者 Tel: 15875113952; E-mail: 29711825@qq.com

抗骨增生丸为国家基本医疗保险药品目录收载品种,是由熟地黄、淫羊藿、骨碎补等9味中药制成的蜜丸,临床广泛用于增生性脊椎炎、颈椎综合症、骨刺等骨质增生症^[1]。熟地黄、淫羊藿、骨碎补均为该复方制剂的主要药味,其主要活性成分毛蕊花糖苷为苯乙醇苷类化合物,淫羊藿苷和柚皮苷为黄酮类,功能主治与该制剂功能主治相一致。该制剂现行标准^[2]仅对淫羊藿苷进行含量测定,未能全面控制其质量,且国内尚未见对抗骨增生丸中毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷3种有效成分含量同时进行质量控制的报道及文献。笔者参考相关文献^[2-7],采用HPLC法同时测定抗骨增生丸中3种成分,有利于产品质量控制和临床用药的安全有效。

1 仪器与试剂

安捷伦公司 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (VWD 检测器),安捷伦公司 LC solution 工作站,安捷伦公司 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶) 色谱柱,梅特勒-托利多仪器有限公司 AG-135 电子分析天平,山东济宁恒通超声电子设备有限公司 HT-300BQ 超声仪,岛津公司 Shimadzu UV-2450 紫外分光光度计。

对照品毛蕊花糖苷(批号 111530-201512,含量 96.7%)、柚皮苷(批号 110722-201312,含量 94.7%)、淫羊藿苷(批号 110737-201516,含量 94.2%)均购自中国食品药品检定研究院。

抗骨增生丸(大蜜丸,每丸重 3 g)为吉林龙泰制药股份有限公司产品,批号 150804、151102、151104。

甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相 A 为水,流动相 B 为甲醇,流动相 C 为乙腈,按表 1 程序进行线性梯度洗脱,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 270 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别取毛蕊花糖苷、柚皮苷、淫羊藿苷的对照品适量,精密称定,用 50% 甲醇水溶液溶解并定量稀释制成质量浓度分别为 0.508、

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间 (time)/min	流动相 (mobile phase)		
	A/%	B/%	C/%
0	80	0	20
13	80	0	20
14	70	5	25
26	70	5	25
28	80	0	20
38	80	0	20

0.756、0.513 mg · mL⁻¹ 的混合溶液,作为混合对照品储备溶液;精密量取混合对照品储备溶液 2 mL 置 20 mL 量瓶中,加 50% 甲醇水溶液稀释至刻度,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 样品剪碎,取约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇水溶液 50 mL,称量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz) 45 min,放冷,用 50% 乙醇水溶液补足减失的量,摇匀,滤过,续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方量制备缺熟地黄、淫羊藿和骨碎补的样品,同供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

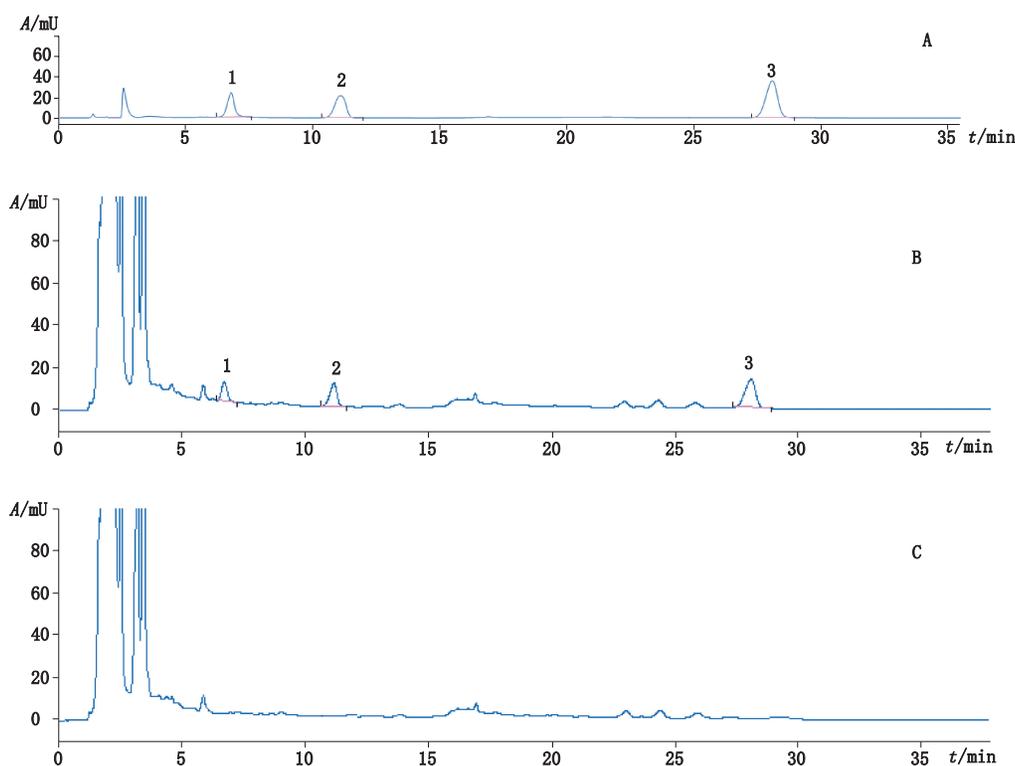
2.3 系统适用性试验

精密量取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL,分别注入色谱仪,记录色谱图,见图 1。结果理论塔板数按毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷计算均不低于 3 000,3 种成分色谱峰与相邻峰之间分离度均大于 1.5,对称因子在 0.95~1.05 内,样品中其他成分不干扰待测成分的测定。

2.4 线性关系考察及检测限测定

2.4.1 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备溶液 0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、5.00 mL,分别置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,即得系列混合对照品溶液;照上述色谱条件进样测定,记录色谱图;以峰面积 *Y* 对质量浓度 *X* (μg · mL⁻¹) 进行线性回归,得到 3 种待测物的回归方程、相关系数,结果见表 2。

2.4.2 检测限 以“2.4.1”项下浓度最低的混合对照品溶液逐级稀释,依法进行测定,当信噪比为 3:1 时,计算毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷检测限分别为 0.21、0.31 和 0.14 ng。



1. 毛蕊花糖苷 (verbascoside) 2. 柚皮苷 (naringin) 3. 淫羊藿苷 (icariin)

图1 混合对照品(A)、样品(B)和阴性样品(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), sample (B), and negative sample without *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Epimedii Folium* and *Drynariae Rhizoma* (C)

表2 3种成分的回归方程及线性范围

Tab. 2 Regression equations and linear ranges of three constituents

化合物 (compound)	线性方程 (linear equation)	r	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
毛蕊花糖苷 (verbascoside)	$Y=8.415X+11.68886$	0.9990	5.08~101.6
柚皮苷 (naringin)	$Y=8.797X+18.47477$	0.9995	7.56~151.2
淫羊藿苷 (icariin)	$Y=21.711X+36.67811$	0.9996	5.13~102.6

2.5 精密度试验和重复性试验

取样品批号为 150804 的供试品溶液连续进样 6 次,记录色谱图,毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.54%、0.69% 和 0.96%,表明本法精密度良好。取样品 (批号 150804),制备供试品溶液 6 份,进样分析,以外标法计算含量,毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷平均含量分别为 1.18、1.82 和 $1.41 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$, RSD 分别为 1.0%、0.8% 和 0.6%

2.6 稳定性试验

取样品 (批号 150804),依法制成供试品溶液,每隔 4 h 进样 1 次,共 7 次,记录色谱图,毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为

0.78%、0.55% 和 0.81%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率

取用本法已测知含量的样品 (批号 150804) 剪碎,取约 2.0 g 共 9 份,精密称定;每 3 份为一组,分别精密加入混合对照品储备溶液 4、5、6 mL,按供试品溶液制备方法处理,按上述色谱条件测定,计算回收率。结果见表 3,表明本方法准确度良好。

2.8 样品测定

取 3 批样品 (批号 150804, 151102, 151104) 各 3 份,按照本文方法制备供试品溶液并测定,以外标法计算含量,结果见表 4。

表 3 回收试验结果

Tab. 3 Results of recovery test

化合物 (compound)	浓度水平 (concentration level)	回收率 (recovery)/ % (n=3)	RSD/ %	平均回收率 (average recovery)/ % (n=9)
毛蕊花糖苷 (verbascoside)	低 (low)	100.7	0.98	100.5
	中 (medium)	100.5	1.0	
	高 (high)	100.2	0.93	
柚皮苷 (naringin)	低 (low)	99.3	0.72	99.5
	中 (medium)	99.2	0.65	
	高 (high)	100.1	0.80	
淫羊藿苷 (icariin)	低 (low)	98.9	0.80	99.3
	中 (medium)	99.4	0.76	
	高 (high)	99.6	0.83	

表 4 3 种成分的含量测定结果 (mg·丸⁻¹, n=3)Tab. 4 Determination results of three components
(mg per pill, n=3)

批号 (lot No.)	毛蕊花糖苷 (verbascoside)	柚皮苷 (naringin)	淫羊藿苷 (icariin)
150804	1.08	1.81	1.41
151102	1.17	1.75	1.32
151104	1.06	1.88	1.53

3 讨论

3.1 流动相选择

由于各成分性质差异较大,为了使毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷 3 个成分都达到良好的分离,笔者分别考察了不同比例的乙腈-水、乙腈-0.1% 醋酸水溶液等流动相系统^[8-11],结果分离效果均不甚理想。如以乙腈-水(20:80)两相系统为流动相时,毛蕊花糖苷、柚皮苷出峰好,但淫羊藿苷保留时间过长,而且杂质分离效果差,峰形较差;经过进一步的对比研究,最终选择甲醇-乙腈-水三相系统为流动相梯度洗脱,可消除杂质对被测成分的干扰,各成分的色谱峰峰形对称,理论塔板数高,分离度好,缩短了多成分检测的分析时间。

3.2 检测波长选择

取毛蕊花糖苷、柚皮苷、淫羊藿苷对照品溶液,以初始比例流动相为空白,在 200~400 nm 进行紫外扫描,兼顾多种成分的最大吸收,重点考察 334、283、270 nm 波长。实验发现,在 283 nm 波长处,毛蕊花

糖苷吸收较低,334 nm 波长处,柚皮苷吸收较低,而在 270 nm 波长处,3 种成分都有较强吸收,因此,选择淫羊藿苷的最大吸收波长 270 nm 作为检测波长,可同时得到较好的色谱峰,并能满足定量测定的要求。

3.3 提取方法的选择

笔者分别对回流提取法、冷浸法、超声法进行了考察^[12-14]。结果显示,回流提取 1 h 基本提取完全,但提取温度较高,可能对其活性成分产生较大的影响,活性成分含量均有不同程度的降低^[15];而冷浸法提取时,为获得较好的效果,需不定期振摇,且浸泡时间长,提取效率较低;超声法可在 30 min 内基本提取完全,具有提取时间短,提取温度低,提取率高等特点。综合提取方法及各检测成分的特点,最终选用超声提取法提取。对超声处理时间 15、30、45、60 min 进行考察,结果表明,超声处理 30 min 后各成分含量不再增加,考虑到样品的差异性,选择超声处理 45 min。在提取溶剂方面,分别考察了乙醇、50% 甲醇水溶液、50% 乙醇水溶液、甲醇,结果表明 50% 甲醇水溶液和 50% 乙醇水溶液超声提取完全且杂质干扰峰较少,结果差异不大,但甲醇毒性较乙醇大,且从经济实用的角度,故提取溶剂选择 50% 乙醇水溶液。

3.4 小结

本实验通过 HPLC 法梯度洗脱,能快速、准确地对抗骨增生丸中毛蕊花糖苷、柚皮苷和淫羊藿苷同时进行定量测定,可为抗骨增生丸质量标准进一步完善提供参考。

参考文献

- [1] 陈英红,黄恩喜,高阳,等. 抗骨增生丸定性定量方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7): 20
CHEN YH, HUANG EX, GAO Y, et al. Studies on qualitative and quantitative methods for the analysis of Kangguzhengsheng pills [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2006, 12(7): 20
- [2] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 777, 256, 124
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 777, 256, 124
- [3] 韩丽萍,陈行榆,刘志刚. HPLC 法同时测定抗骨质疏松中成药中柚皮苷及淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(43): 4083
HAN LP, CHEN HY, LIU ZG. Simultaneous determination of naringin and icariin in anti osteoporosis Chinese patent medicine by HPLC [J]. China Pharm, 2010, 21(43): 4083
- [4] 韩丽萍,陈行榆,邓伟民. HPLC 法同时测定补肾壮骨颗粒中淫羊藿苷及柚皮苷含量[J]. 中成药, 2011, 33(1): 184

- HAN LP, CHEN HY, DENG WM. Simultaneous determination of naringin and icariin in kidney and bone granules by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2011, 33(1): 184
- [5] 薛标强, 袁洁丽. HPLC 法测定抗骨增生片中柚皮苷的含量 [J]. *轻工科技* 2014, 1(1): 105
- XUE BQ, YUAN JL. Determination of naringin in Kangguzengsheng tablets by HPLC [J]. *Light Ind Sci Technol*, 2014, 1(1): 105
- [6] 徐灿辉, 何维为, 何云飞. HPLC 法测定六味地黄胶囊中的毛蕊花糖苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚 [J]. *药物评价研究*, 2014, 37(3): 257
- XU CH, HE WW, HE YF. Simultaneous determination of four constituents in Liuwei Dihuang capsule by HPLC [J]. *Drug Eval Res*, 2014, 37(3): 257
- [7] 张智军, 崔华, 马久太. HPLC 法测定抗骨增生片中柚皮苷含量 [J]. *世界中医药*, 2012, 7(4): 360
- ZHANG ZJ, CUI H, MA JT. Content determination of naringin in Kanggu Zengsheng tablets by HPLC [J]. *World Chin Med*, 2012, 7(4): 360
- [8] 何培根, 刘菁, 李志浩. 补益地黄丸中毛蕊花糖苷的含量分析 [J]. *现代中药研究与实践*, 2015, 29(3): 56
- HE PG, LIU J, LI ZH. Determination of verbascosidin in Buyi Dihuang Wan [J]. *Res Pract Chin Med*, 2015, 29(3): 56
- [9] 李文斌. HPLC 法测定麦味地黄丸中毛蕊花糖苷的含量 [J]. *中国药房*, 2014, 25(28): 2665
- LI WB. Content determination of verbascoside in Maiwei Dihuang pills by HPLC [J]. *China Pharm*, 2014, 25(28): 2665
- [10] 任春萍, 王鸽, 赵怀清, 等. HPLC 法同时测定抗骨增生片中麦角甾苷、柚皮苷和淫羊藿苷的含量 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2011, 28(3): 211
- REN CP, WANG G, ZHAO HQ, *et al.* Simultaneous determination of acteoside, naringin and icariine in Kangguzengsheng tablets by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2011, 28(3): 211
- [11] 朱静, 杨青青. 抗骨增生胶囊中柚皮苷的 HPLC 法测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(8): 795
- ZHU J, YANG QQ. Determination of naringin in Kanggu Zengsheng capsules by HPLC [J]. *Chin J Pharm*, 2013, 44(8): 795
- [12] 欧阳露, 夏勇, 夏鹏, 等. 高效液相色谱法同时测定补肾化瘀浸膏中淫羊藿苷及柚皮苷含量 [J]. *医药导报*, 2014, 33(9): 1224
- OUYANG L, XIA Y, XIA P, *et al.* Simultaneous determination of icariin and naringin in Bushen Huayu extract by HPLC [J]. *Her Med*, 2014, 33(9): 1224
- [13] 陈天朝, 翟来超. HPLC 同时测定地黄中梓醇与毛蕊花糖苷的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5): 105
- CHEN TC, ZHAI LC. Simultaneous content determination of catalpol and verbascoside in Rehmannia by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2011, 17(5): 105
- [14] 刘淑姝, 张妮瑜, 辛秀, 等. 抗骨增生片定性定量方法研究 [J]. *中南药学*, 2014, 12(6): 574
- LIU SF, ZHANG NY, XIN XQ, *et al.* Qualitative and quantitative method for the analysis of Kanggu Zengsheng tablet [J]. *Cent South Pharm*, 2014, 12(6): 574
- [15] 王亮, 张巧艳, 年华, 等. 用 HPLC 法测定地黄叶中毛蕊花糖苷的含量 [J]. *药学服务与研究*, 2015, 15(1): 26
- WANG L, ZHANG QY, NIAN H, *et al.* Content determination of verbascoside in Rehmannia leaf by HPLC [J]. *Pharm Care Res*, 2015, 15(1): 26

(本文于 2016 年 5 月 20 日收到)