

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)08-0069-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.08.016



高效液相色谱法同时测定骨松宝丸中5种成分含量

孙桐

(江苏省淮安市食品药品检验所, 江苏 淮安 223300)

摘要:目的 建立同时测定骨松宝丸中5种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为210 nm(淫羊藿苷、川续断皂苷VI、吉马酮)、233 nm(芍药苷、阿魏酸), 柱温为30℃, 进样量为10 μL。结果 淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸和吉马酮质量浓度分别在10.180~203.60 μg/mL($r=1.0000$), 0.522~10.44 μg/mL($r=0.9999$), 1.274~25.47 μg/mL($r=0.9996$), 1.260~25.20 μg/mL($r=0.9996$), 0.517~10.34 μg/mL($r=0.9998$)范围内与峰面积线性关系良好; 定量限分别为0.33, 0.44, 0.09, 0.11, 0.39 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%; 平均加样回收率分别为98.69%, 95.88%, 98.09%, 97.68%, 96.97%, RSD分别为1.66%, 3.89%, 2.14%, 2.34%, 3.36%($n=6$)。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可用于骨松宝丸的质量控制。

关键词:骨松宝丸; 淫羊藿苷; 川续断皂苷VI; 芍药苷; 阿魏酸; 吉马酮; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Five Components in Gusongbao Pills by HPLC

SUN Tong

(Huai'an Food and Drug Inspection Institute, Huai'an, Jiangsu, China 223300)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of five components in Gusongbao Pills. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 210 nm (icariin, asperosaponin VI and germacrone) and 233 nm (paeoniflorin and ferulic acid), the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of icariin, asperosaponin VI, paeoniflorin, ferulic acid and germacrone were 10.180-203.60 μg/mL ($r=1.0000$), 0.522-10.44 μg/mL ($r=0.9999$), 1.274-25.47 μg/mL ($r=0.9996$), 1.260-25.20 μg/mL ($r=0.9996$), 0.517-10.34 μg/mL ($r=0.9998$), respectively. The limits of quantitation (LOD) were 0.33, 0.44, 0.09, 0.11, 0.39 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2.0%.

第一作者: 孙桐, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)33153726@qq.com。

量不同产地、不同成因禹余粮药材样品中元素含量的分析测试。通过优化消解试剂(HCl-HNO₃-HF)和条件, 使无机酸使用量减少60%, 1 h内完成药材样品的全消解, 并基于超级微波的预加压技术, 不仅避免了传统开放式消解方式中易挥发元素的损失, 还显著提高了样品前处理效率, 值得推广。

参考文献

[1] 马瑜璐, 刘圣金, 房方, 等. 不同矿物成因禹余粮的止泻作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 21-28.
[2] 刘圣金, 吴超颖, 马瑜璐, 等. 不同矿物成因禹余粮质量评价及优质矿产资源筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 14-20.
[3] 刘圣金, 杨欢, 徐春祥, 等. 矿物药禹余粮重金属及有害元素含量的矿产资源产地评价研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(4): 948-950.
[4] 汪秋萍. 禹余粮与几种伪品的鉴别[J]. 中国药业, 2003, 12(10): 63.
[5] 刘圣金, 杨欢, 吴德康, 等. FTIR指纹图谱技术在禹余粮质量控制中的应用(英文版)[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(4): 909-913.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 273.
[7] 刘圣金, 杨欢, 林瑞超, 等. 矿物药禹余粮微波消解/ICP-AES无机元素分析及综合评价[J]. 中国现代中药, 2015, 17(9): 809-904.
[8] 周玉文, 赵生国, 马宏祥, 等. 微波消解-电感耦合等离子体发射光谱法同时测定煤飞灰中8种元素的方法研究[J]. 甘肃科技, 2015, 31(15): 31-33.
[9] 马旭红, 康华峰, 敖列哥, 等. 微波消解-硼酸络合-原子吸收光谱法测定钢中全铝[J]. 冶金分析, 2003, 23(5): 65-67.
[10] 刘圣金, 杨欢, 吴德康, 等. 矿物药禹余粮中铁元素价态及含量分析[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1088-1090.
[11] 陆毅, 韦业雄, 盛波, 等. ICP-OES测定玉米中痕量锰[J]. 中国锰业, 2017, 35(Z1): 67-68.
[12] 马瑜璐, 房方, 刘圣金, 等. 金属组学研究概况及其在矿物药研究中的应用前景[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2143-2146.
[13] 李计萍. 对矿物药研究中相关问题的思考[J]. 中国中药杂志, 2001, 31(18): 1566-1567.

(收稿日期: 2022-11-14)

The average recoveries of icariin, asperosaponin VI, paeoniflorin, ferulic acid and germacrone were 98.69%, 95.88%, 98.09%, 97.68% and 96.97% with RSDs of 1.66%, 3.89%, 2.14%, 2.34% and 3.36% ($n = 6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Gusongbao Pills.

Key words: Gusongbao Pills; icariin; asperosaponin VI; paeoniflorin; ferulic acid; germacrone; HPLC; content determination

骨松宝丸由淫羊藿、续断、赤芍、川芎、莪术等9味中药制成,有补肾活血、强筋壮骨等功效,主要用于治疗骨痿(骨质疏松)引起的骨折、骨痛、骨关节炎,以及预防更年期骨质疏松。淫羊藿苷为淫羊藿主要有效成分,可促进成骨细胞生长并抑制破骨细胞生成,有显著抗骨质疏松作用^[1]。川续断皂苷VI为续断主要有效成分,可多靶点发挥抗骨质疏松作用^[2]。芍药苷是赤芍发挥消炎止痛作用的物质基础^[3]。阿魏酸为川芎的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集等作用^[4]。吉马酮为莪术的重要活性成分,生物活性显著,具有显著的抗肿瘤作用及广泛的抗炎、抗氧化、抗病毒作用^[5]。目前,国家食品药品监督管理局标准^[6]中,以淫羊藿苷作为指标成分,通过液相色谱法测定含量,且针对赤芍、川芎和莪术设置了薄层色谱鉴别项,检测项目较少,专属性较低,难以有效控制制剂质量。2020年版《中国药典(一部)》^[7]规定,淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸和吉马酮已作为对应药材含量测定的指标成分。但目前仅见其他药物中芍药苷^[8-11]、川续断皂苷VI^[12]及阿魏酸^[13-16]的含量测定。本研究中建立了同时测定骨松宝丸中淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸和吉马酮含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo U3000型液相色谱仪,配二极管阵列检测器(美国Thermo Fisher Scientific公司);XS205型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);Milli-Q超纯水机(美国Millipore公司);JM-30D型超声波清洗机(深圳洁盟设备有限公司)。

1.2 试药

骨松宝丸(吉林吉春制药股份有限公司,批号分别为210202,210204,210205);淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸和吉马酮的对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110737-202017,111685-201908,110736-202145,110773-201915,111665-201906;含量均大于98.0%);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamondsil C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~

13 min时5%A → 15%A,13 ~ 22 min时15%A → 30%A,22 ~ 36 min时30%A → 70%A,36 ~ 45 min时70%A → 30%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm(淫羊藿苷、川续断皂苷VI、吉马酮),233 nm(芍药苷、阿魏酸);柱温:30 °C;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

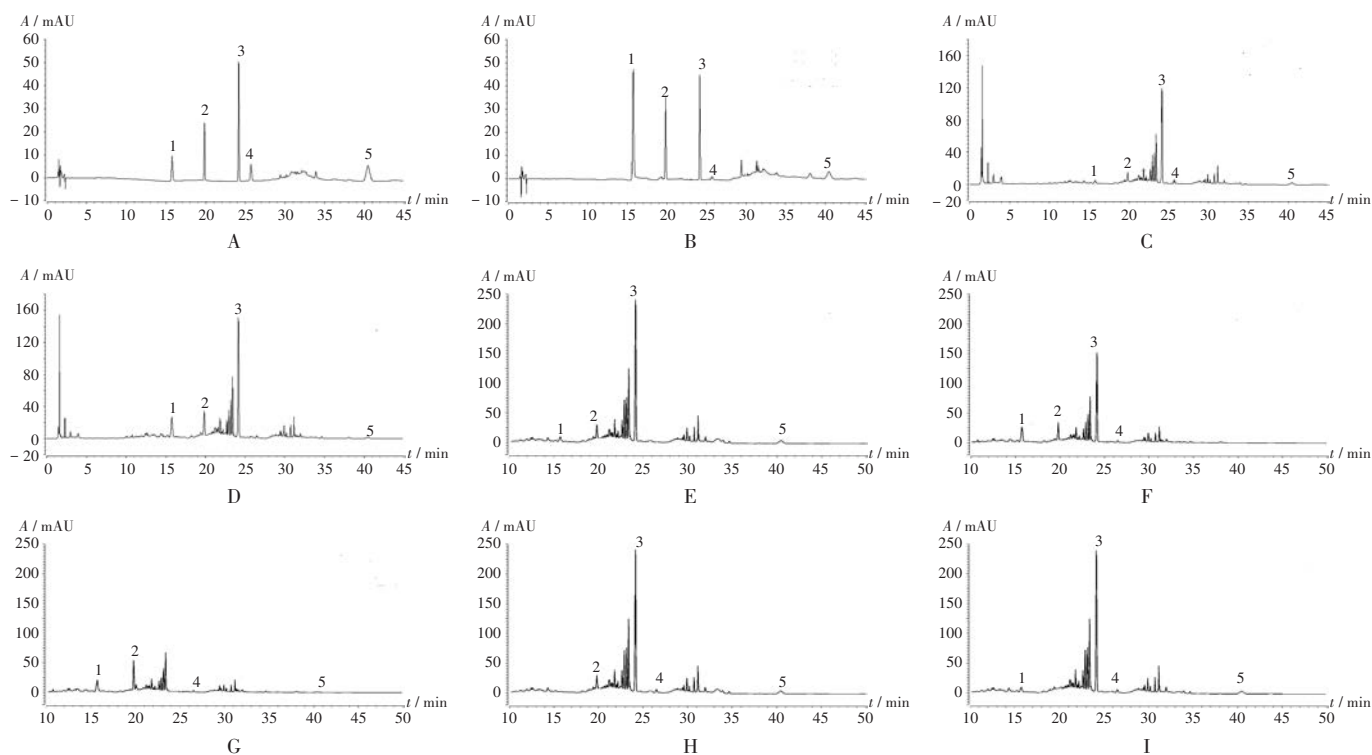
取淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸和吉马酮的对照品各适量,精密称定,分别置50 mL容量瓶中,加80%甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度分别为2.036 0,0.521 7,0.509 4,0.503 9,0.516 8 mg/mL的单一对照品贮备液,各精密量取适量,加80%甲醇制成质量浓度分别为407.20,20.87,50.94,50.39,20.67 μg/mL的混合对照品贮备液;精密量取适量,加80%甲醇制成淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸和吉马酮质量浓度均约为10 μg/mL的混合对照品溶液。取样品适量,研细,取约0.2 g,精密称定,置20 mL容量瓶中,加80%甲醇约15 mL,超声(功率500 W、频率33 kHz,下文同)处理40 min,放冷,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。按骨松宝丸处方比例和制备工艺,分别制备缺淫羊藿、续断、赤芍、川芎、莪术的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验及专属性试验:分别取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相应位置有吸收峰,且阴性对照无干扰。分离度均大于2.0,理论板数按各成分峰计均应大于7 000。详见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品贮备液5 mL,分别置10,20,50,100,200 mL容量瓶中,加80%甲醇溶解并定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以待测成分质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

定量限考察:取2.2项下混合对照品溶液适量,用水逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以各待测成分的仪器信噪比(S/N)约为10:1时溶液的质量浓度为定量限。结果淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸、吉马酮的定量限分别为0.33,0.44,0.09,0.11,



1. 芍药苷 2. 阿魏酸 3. 淫羊藿苷 4. 川续断皂苷VI 5. 吉马酮

A, B. 混合对照品溶液(210,233 nm) C, D. 供试品溶液(210,233 nm) E-I. 阴性对照品溶液(210 nm, 分别缺续断、莪术、淫羊藿、赤芍、川芎)

图1 骨松宝丸高效液相色谱图

1. Paeoniflorin 2. Ferulic acid 3. Icaritin 4. Asperosaponin VI 5. Germacrone

A, B. Mixed reference solution(210,233 nm) C, D. Test solution(210,233 nm) E-I. Negative reference solution (210 nm, without Dipsaci Radix, Curcumae Rhizoma, Epimedii Folium, Paconiae Radix Rubra or Chuanxiong Rhizoma)

Fig. 1 HPLC chromatograms of Gusongbao Pills

表1 线性关系考察结果(n=5)

Tab. 1 Results of the linear relation test (n=5)

待测成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)
淫羊藿苷	$Y_1 = 21.241X_1 - 0.049$	1.000 0	10.180~203.60
川续断皂苷VI	$Y_2 = 17.473X_2 - 50.372$	0.999 9	0.522~10.44
芍药苷	$Y_3 = 93.302X_3 + 1.519$	0.999 6	1.274~25.47
阿魏酸	$Y_4 = 44.295X_4 + 1.025$	0.999 6	1.260~25.20
吉马酮	$Y_5 = 52.393X_5 - 2.007$	0.999 8	0.517~10.34

0.39 μg/mL。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸、吉马酮峰面积的RSD分别为0.37%,0.93%,0.09%,0.89%,0.81%(n=6),表明仪器精密良好。

稳定性试验:取同一批(批号为210202)供试品溶液适量,室温下分别于0,1,4,8,12,24 h时进样测定,记录峰面积。结果淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸、吉马酮峰面积的RSD分别为1.07%,0.81%,0.89%,1.36%,0.64%(n=6),表明供试品溶液室温放

置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为210202)样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果淫羊藿苷、川续断皂苷VI、芍药苷、阿魏酸、吉马酮平均含量的RSD分别为0.72%,1.33%,0.69%,1.21%,1.17%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为210202)细粉约0.2 g,各6份,精密称定,分别置20 mL容量瓶中,分别精密加入混合对照品贮备液2 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取3批样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行3份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录各待测成分的峰面积,并计算含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

检测波长:预试验中取混合对照品溶液,以DAD检

表2 加样回收试验结果 (n = 6)

Tab. 2 Results of the recovery test (n = 6)

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
淫羊藿苷	0.790 1	0.814 4	1.598 3	99.24	98.69	1.66
	0.772 5	0.814 4	1.574 1	98.43		
	0.807 7	0.814 4	1.592 3	96.34		
	0.799 7	0.814 4	1.601 1	98.40		
	0.779 0	0.814 4	1.604 7	101.39		
	0.785 9	0.814 4	1.586 6	98.32		
川续断皂苷Ⅵ	0.028 9	0.041 7	0.071 5	102.16	95.88	3.89
	0.028 2	0.041 7	0.067 9	95.20		
	0.029 5	0.041 7	0.069 1	94.96		
	0.029 2	0.041 7	0.070 1	98.08		
	0.028 5	0.041 7	0.066 9	92.09		
	0.028 7	0.041 7	0.067 4	92.81		
芍药苷	0.094 9	0.101 9	0.194 6	97.84	98.09	2.14
	0.092 8	0.101 9	0.196 1	101.37		
	0.097 0	0.101 9	0.194 7	95.88		
	0.096 0	0.101 9	0.197 7	99.80		
	0.093 6	0.101 9	0.192 5	97.06		
	0.094 4	0.101 9	0.192 8	96.57		
阿魏酸	0.107 3	0.104 3	0.210 2	98.66	97.68	2.34
	0.104 9	0.104 3	0.209 4	100.19		
	0.109 7	0.104 3	0.207 8	94.06		
	0.108 6	0.104 3	0.208 9	96.16		
	0.105 8	0.104 3	0.209 6	99.52		
	0.106 7	0.104 3	0.208 4	97.51		
吉马酮	0.043 3	0.041 3	0.084 1	98.79	96.97	3.36
	0.042 4	0.041 3	0.081 5	94.67		
	0.044 3	0.041 3	0.086 4	101.94		
	0.043 8	0.041 3	0.084 2	97.82		
	0.042 7	0.041 3	0.082 3	95.88		
	0.043 1	0.041 3	0.081 4	92.74		

表3 样品含量测定结果 (mg/g, n = 3)

Tab. 3 Results of the content determination of five components in samples (mg/g, n = 3)

批号	淫羊藿苷	川续断皂苷Ⅵ	芍药苷	阿魏酸	吉马酮
210202	3.83	0.14	0.46	0.52	0.21
210204	3.55	0.13	0.56	0.49	0.27
210205	3.91	0.22	0.33	0.65	0.35

测器在190~400 nm波长范围扫描,综合分析各成分的最大吸收波长,同时参考2020年版《中国药典(一部)》各成分的检测波长,选定在210 nm波长下测定淫羊藿苷、川续断皂苷Ⅵ和吉马酮。芍药苷与阿魏酸在233 nm附近均有最大吸收,由于阿魏酸最强紫外吸收波长在322 nm处,其附近的杂质峰响应也较强,而在233 nm波长处阿魏酸附近杂质峰干扰较小,同时能满足含量测定

要求,最终选定在233 nm波长处测定芍药苷和阿魏酸。

流动相:预试验中,首先考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液等为流动相进行等度洗脱,各组分均未能完全分离。流动相中引入一定量的酸有助于提高分离度和改善色谱峰拖尾,采用梯度洗脱,着重考察了甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液系统,结果有机相使用乙腈时的分离效果更佳。

色谱柱及色谱仪:分别采用Diamonsil C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)与Agilent TC-C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)进行分析,结果表明,在该色谱条件下,各组分均分离良好。随后对不同液相色谱仪也进行了考察,用Thermo U3000型、Waters 2695型分别进样分析,结果不同仪器得到的色谱图有良好的相似度,分离情况亦良好。

3.2 提取条件选择

提取方法:预试验中比较了回流提取法与超声提取法,超声(功率500 W,频率33 kHz)处理40 min与加热回流60 min提取量相当,超声处理更简便,最终选择超声提取法。比较发现,超声处理40, 50, 60 min时各成分提取量无明显变化,因此选择超声处理40 min。

提取溶剂:5种待测成分均易溶于甲醇,预试验中主要比较了50%甲醇、80%甲醇和纯甲醇溶液作为提取溶剂的提取效果,在超声处理40 min条件下,用80%甲醇提取,结果的杂质峰较少,5个指标成分提取效率最高。

3.3 与国标方法^[6]的比较

国家食品药品监督管理局标准规定,每克含淫羊藿苷不得低于3.50 mg,同时用本法与国标方法测定3批骨松宝丸中淫羊藿苷的含量,结果基本一致。

3.4 方法评价

本研究中建立的HPLC法操作简便,分离效能高,准确性和稳定性良好,并为骨松宝丸质量标准的提高提供了参考,可用于同时测定骨松宝丸中活性成分淫羊藿苷、川续断皂苷Ⅵ、芍药苷、阿魏酸和吉马酮含量。

参考文献

- [1] 秦伟瀚,刘翔,张军,等.不同产地15个品种淫羊藿的质量评价[J].中成药,2017,39(9):1889-1895.
- [2] 田欢,赵锋,李晔,等.川续断皂苷Ⅵ的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(5):226-234.
- [3] 吴修红,孙晓兰,胡妮娜,等.赤芍功效物质基础研究进展[J].中医药信息,2017,34(2):120-122.
- [4] 李丹,李彦文,王俊文,等.基于文献计量分析川芎有效成分药理作用研究[J].世界中医药,2017,12(5):1161-1165.
- [5] 李泽宇,郝二伟,杜正彩,等.吉马酮的药理作用及其作用机制的研究进展[J].现代药物与临床,2022,12(3):644-652.
- [6] YBZ05092018,骨松宝丸[S].
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020:42,165,286,340,343.