

骨松灵颗粒质量标准研究

范晓楠¹ 刘梅¹ 胡凯莉¹ 苏佳灿² 奉建芳¹

(1 上海中医药大学穆拉德中药现代化研究中心, 上海, 201203; 2 第二军医大学长海医院, 上海, 200433)

摘要 目的: 建立骨松灵颗粒的质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对复方中淫羊藿、骨碎补、补骨脂、熟地黄、黄芪、当归、盐杜仲、醋龟甲进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法(HPLC)对淫羊藿中淫羊藿苷、骨碎补中柚皮苷、熟地黄中毛蕊花糖苷、黄芪中黄芪甲苷进行含量测定。结果: 八味药材薄层色谱图斑点清晰, 具有专属性; 淫羊藿苷在 0.031 5 ~ 1.712 0 μg 范围内线性关系良好, $r=0.999\ 7$, 平均回收率为 100.23%, RSD 为 2.23%; 柚皮苷在 0.056 8 ~ 1.817 5 μg 范围内线性关系良好, $r=0.999\ 6$, 平均回收率为 99.97%, RSD 为 1.22%; 毛蕊花糖苷在 0.060 8 ~ 1.945 6 μg 范围内线性关系良好, $r=0.999\ 8$, 平均回收率为 99.94%, RSD 为 1.24%; 黄芪甲苷在 0.467 6 ~ 11.220 0 μg 范围内线性关系良好, $r=0.999\ 1$, 平均回收率为 99.84%, RSD 为 3.35%。结论: 该方法能准确可靠地进行定性、定量检测, 能有效地控制骨松灵颗粒的质量。

关键词 骨松灵颗粒; 淫羊藿苷; 柚皮苷; 毛蕊花糖苷; 黄芪甲苷; 薄层色谱; 高效液相色谱

The Study of the Quality Standard of Gusongling Granules

Fan Xiaonan¹, Liu Mei¹, Hu Kaili¹, Su Jiakan², Feng Jianfang¹

(1 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Murad Research Center of Modernized Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2 The Second Military Medical University for Changhai Hospital, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective: To establish the quality standard for Gusongling Granules. **Methods:** TLC was performed to identify the qualification of Epimedium Folium (Yinyanghuo), Drynaria Rhizoma (Gusuibu), Psoraleae Fructus (Buguzhi), Rehmanniae Radix Praeparata (Shudihuang), Astragali Radix (Huangqi), Angelicae Sinensis Radix (Danggui), Eucommiae Cortex (Yanduzhong), Testudinis Carapax Et Plastrum (Cuguigua). Besides, a HPLC method was established for the determination of icariine, naringin, acteoside, and astragaloside. **Results:** The spots on TLC plates were clear with specificity. Icariin showed a good linear relationship at a range between 0.0315 and 1.7120 μg , $r=0.9997$, the average recovery was 100.23%, and RSD was 2.23%. Naringin showed a good linear relationship at a range between 0.0568 and 1.8175 μg , $r=0.9996$, the average recovery was 99.97%, and RSD was 1.22%. Acteoside showed a good linear relationship at a range between 0.0608 and 1.9456 μg , $r=0.9998$, the average recovery was 99.94%, and RSD was 1.24%. Astragaloside showed a good linear relationship at a range between 0.4676 and 11.2200 μg , $r=0.9998$, the average recovery was 99.84%, and RSD was 3.35%. **Conclusion:** This method can be accurate and reliable in qualitative and quantitative detection, and can control the drug quality effectively.

Key Words Gusongling Granules; Icariine; Naringin; Acteoside; Astragaloside; TLC; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.10.038

骨松灵颗粒是由淫羊藿、骨碎补、补骨脂、熟地黄、黄芪、当归、杜仲、龟甲八味药材制成的中药复方制剂, 临床主要用于治疗骨质疏松症。为有效地控制该制剂的质量, 本实验对制剂的质量标准通过薄层鉴别和含量测定进行了研究, 分别采用 TLC 法对颗粒中的八味药材进行了薄层鉴别和 HPLC 法分别对淫羊藿苷、柚皮苷、毛蕊花糖苷和黄芪甲苷进行定量测定。

1 资料与方法

1.1 仪器资料 Agilent-1100 型高效液相色谱仪 (Agilent Corporation); 岛津 SIL-20AC 型高效液相色谱

仪 (SHIMADZU Corporation); HH-6 数显恒温水浴锅 (上海千载科技有限公司); DP-8K 数显恒温水浴锅 (上海帝魄科学仪器有限公司); SG5200HE 超声波清洗器 (上海冠特超声仪器有限公司); AL-204 电子天平 (METTLER-TOLEDO Corporation); JP5001 电子天平 (上海良平仪器仪表有限公司); TLC VISUALIZER (CAMAG Corporation); 薄层色谱硅胶预制板 (烟台市化学工业研究院; 鲁 Q/YT257-85)。

1.2 受试药物 淫羊藿苷对照品、柚皮苷对照品、毛蕊花糖苷对照品、黄芪甲苷对照品、异补骨脂素对照品、补骨脂素对照品、当归对照药材 (批号分别为:

基金项目: 上海市科委中药现代化专项 (编号: 12401900703)

作者简介: 范晓楠 (1988.9—), 女, 硕士, 研究方向: 中药新型给药系统研究, E-mail: fanxn2007@163.com

通信作者: 奉建芳 (1966.4—), 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药新型给药系统研究, E-mail: fengjianfang@vip.tom.com

110737-200415、110722-201111、111530-201309、110781-200613、110739-201115、110738-201313、120927-201315,中国食品药品检定研究院);杜仲对照药材、龟甲对照药材、胆固醇对照品(批号:121202-200502、121494-200401、111618-200301,中国药品生物制品检定所);骨松灵颗粒样品(自制,批号20140718);甲醇、正丁醇、氨水、磷酸、冰醋酸、95%乙醇、无水乙醇、乙酸乙酯、乙醚、丁酮、甲酸98%、正己烷、甲苯、浓硫酸、三氯甲烷、氯化铝、氢氧化钾等试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);甲醇、乙腈均为色谱纯(Honey well B&J);水为纯水、超纯水(上海中医药大学穆拉德中药现代化研究中心自制)

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 淫羊藿^[1] 取本品0.5 g,研细,加入10 mL 95%乙醇,水浴温浸(50℃)30 min,提取液滤过,得到滤液,在水浴锅上蒸干所得的滤液,滤液蒸干后所得的残渣中加入1 mL 95%乙醇使残渣溶解,此时所得的溶液即为供试品溶液。与制备淫羊藿供试品溶液的方法相同,将缺少淫羊藿药材的药粉制成阴性对照溶液。用电子分析天平精密称定淫羊藿苷对照品适量,置于容量瓶中,加入甲醇溶解,制成浓度为0.1 mg/mL的对照品溶液。用玻璃点样管分别吸取制备好的淫羊藿供试品溶液10 μL、缺淫羊藿药材的阴性对照溶液10 μL、淫羊藿苷对照品溶液10 μL,将样品溶液点样于同一硅胶G薄层板上,以水-丁酮-甲酸-乙酸乙酯(1-1-1-10)作为展开剂,将点样后的薄层板放置在展开缸中进行展开,取出展开好的薄层板,于通风橱中平放晾干挥去溶剂,并喷以AlCl₃试液,于105℃加热(15~20 min)至斑点清晰,置紫外366 nm下检视。结果见图1。

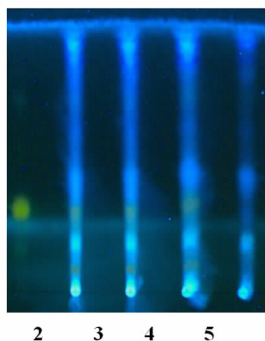


图1 骨松灵颗粒淫羊藿薄层色谱图

注:1 淫羊藿苷对照品 2,3,4 骨松灵颗粒 5 阴性对照品

2.1.2 骨碎补^[1-2] 取本品约0.5 g,研细,置于圆

底烧瓶中,加入甲醇30 mL,水浴(80℃)回流提取1 h,溶液冷却至室温后,提取液用滤纸进行滤过,得到滤液,在水浴锅上蒸干所得的滤液,在滤液蒸干后所得的残渣中加入1 mL 甲醇,使残渣溶解,此时所得的溶液即为供试品溶液。参照骨碎补供试品溶液的制备方法,将缺少骨碎补药材的药粉制成阴性对照溶液。用电子分析天平精密称定柚皮苷对照品适量,置于容量瓶中,加入甲醇溶解,制成浓度为0.5 mg/mL的对照品溶液。用玻璃点样管分别吸取制备好的骨碎补供试品溶液10 μL,柚皮苷对照品溶液6 μL、阴性对照品溶液10 μL,将上述3种样品溶液点样于同一硅胶G薄层板上,水-甲醇-丁酮-乙酸乙酯(1-3-6-10)作为展开剂,在展开缸中展开,展开后取出薄层板,晾干挥去溶剂,并喷以AlCl₃试液,于烘箱中105℃加热(15 min)至斑点清晰,紫外366 nm下检视。结果见图2。

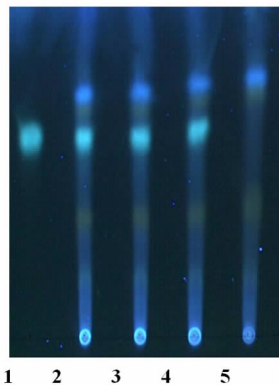


图2 骨松灵颗粒骨碎补薄层色谱图

注:1 柚皮苷对照品 2,3,4 骨松灵颗粒 5 阴性对照品

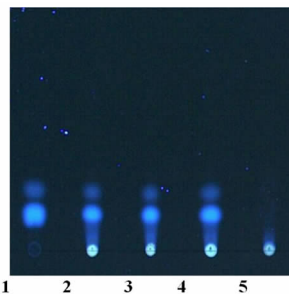


图3 骨松灵颗粒补骨脂薄层色谱图

注:1 补骨脂素、异补骨脂素对照品 2,3,4 骨松灵颗粒 5 阴性对照品

2.1.3 补骨脂^[3] 取本品约5.0 g,研细,加95%乙醇30 mL,超声处理15 min,滤过,水浴蒸干滤液,残渣中加入0.5 mL 甲醇使溶解,即得供试品溶液。精密称定异补骨脂素对照品、补骨脂素对照品各1 mg,加入甲醇制成每1 mL 各含1 mg 的混合对照品溶液。同法制成缺补骨脂药材的阴性对照品溶液。用

玻璃点样管分别吸取补骨脂供试品溶液 4 μL , 异补骨脂素与补骨脂素的混合对照品溶液 2 μL , 阴性对照品溶液 4 μL , 将样品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-正己烷(1-6)作为展开剂, 在展开缸中展开, 展开后取出薄层板, 晾干挥去溶剂, 并喷以 10% 氢氧化钾甲醇试液(显色剂), 置紫外 366 nm 下观察。结果见图 3。

2.1.4 黄芪^[1] 取本品约 8.0 g, 研细, 置于圆底烧瓶中, 加入甲醇 25 mL, 水浴 80 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 1 h, 将提取液过滤, 收集滤液, 水浴挥去甲醇, 残渣中加入热水 20 mL 使之溶解, 冷却至室温后, 将残渣溶解后的水溶液中加入用纯水饱和过的正丁醇, 一共萃取 4 次, 每次均为 40 mL, 萃取完后, 合并水饱和正丁醇提取液, 然后, 用氨试液一共萃取 2 次, 每次均为 40 mL, 弃去氨试液, 合并正丁醇萃取液, 并在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上挥去溶剂, 残渣中加入甲醇使之溶解, 最后定容至 5 mL 容量瓶中, 所得溶液即为供试品溶液。与制备黄芪供试品溶液的方法相同, 将缺少黄芪药材的药粉制成阴性对照溶液。用电子分析天平精密称定黄芪甲苷对照品适量, 置于容量瓶中, 加入甲醇溶解, 制成浓度为 2.0 mg/mL 的对照品溶液。用玻璃点样毛细管分别吸取黄芪供试品溶液 6 μL , 黄芪甲苷对照品溶液 2 μL , 缺少黄芪的阴性对照品溶液 6 μL , 将上述 3 种样品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板上, 以水-三氯甲烷-甲醇(0.3-10-3)作为展开剂, 将点样后的薄层板放在展开缸中展开, 取出展开好的薄层板, 于通风橱中平放晾干挥去溶剂, 并喷以 10% 硫酸乙醇试液(显色剂), 于烘箱中 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热(15~20 min)至斑点清晰, 最后日光灯下观察斑点。结果见图 4。

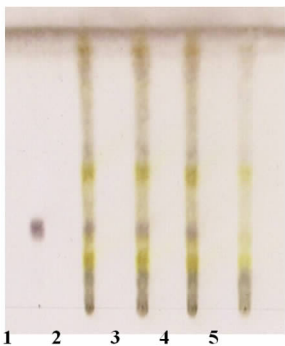


图4 骨松灵颗粒黄芪薄层色谱图

注:1 黄芪甲苷对照品 2,3,4 骨松灵颗粒 5 阴性对照品

2.1.5 熟地黄^[1,4] 取本品约 10.0 g, 研细, 加入 50 mL 80% 甲醇, 静置 30 min, 超声处理 30 min, 溶液滤过, 水浴蒸干滤液, 残渣中加入 5 mL 纯水使溶

解, 用纯水饱和过的正丁醇, 一共萃取 4 次, 每次均为 10 mL, 合并四次水饱和的正丁醇提取液, 将提取液在水浴锅上蒸干溶剂, 在蒸干溶剂后的残渣中加入 2 mL 甲醇溶解, 所得溶液即为供试品溶液。精密称定毛蕊花糖苷适量, 置于容量瓶中, 加入甲醇溶解, 制成浓度 1 mg/mL 的对照品溶液。同法制成缺熟地黄药材的阴性对照品溶液。用玻璃点样管分别吸取上述的熟地黄供试品溶液 3 μL 、毛蕊花糖苷对照品溶液 3 μL 、缺少熟地黄的阴性对照溶液 3 μL , 将上述 3 种样品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲醇-三氯甲烷(3-7)作为展开剂, 将点样后的薄层板放在展开缸中展开, 取出展开好的薄层板, 于通风橱中平放晾干挥去溶剂, 并在薄层板上均匀喷以 10% 硫酸乙醇试液(显色剂), 将喷好后的薄层板放置于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加热(15 min), 至斑点清晰后取出, 在日光下观察薄层板上的斑点。结果见图 5。

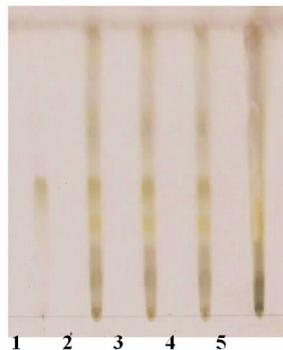


图5 骨松灵颗粒熟地黄薄层色谱图

注:1 毛蕊花糖苷对照品 2,3,4 骨松灵颗粒 5 阴性对照品

2.1.6 当归^[5-6] 取本品约 8.0 g, 研细, 加入 30 mL 乙醚, 超声 15 min, 将超声所得的溶液滤过, 水浴锅上蒸干溶剂, 将蒸干溶剂所得的残渣中加入 0.5 mL 甲醇溶解, 残渣溶解所得的溶液即为供试品溶液。用电子天平称取当归对照药材 1.0 g, 加入 10 mL 乙醚, 参照当归供试品溶液的制备方法, 将当归对照药材制备为对照药材溶液。将缺少当归药材的药粉参照当归供试品溶液的制备方法制备成阴性对照溶液。用玻璃点样毛细管分别吸取当归供试品溶液 10 μL , 当归对照药材溶液 5 μL , 阴性对照溶液 10 μL , 将样品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板上, 用乙酸乙酯-正己烷(1:4)作为展开剂, 将点样后的薄层板放在展开缸中展开, 取出展开好的薄层板, 于通风橱中平放晾干挥去溶剂, 置紫外 366 nm 观察薄层板上的斑点。结果见图 6。

2.1.7 杜仲^[4,7] 取本品约 5.0 g, 研细, 加无水乙醇 30 mL, 静置 30 min, 超声处理 30 min, 溶液滤过,

滤液减压浓缩至 0.5 mL, 所得的浓缩液即为供试品溶液。用电子分析天平称取杜仲对照药材约 3.0 g, 参照供试品溶液制备方法, 将杜仲对照药材制备为对照药材溶液。将缺少杜仲药材的药粉参照杜仲供试品溶液的制备方法, 制成阴性对照溶液, 备用。用玻璃点样管分别吸取杜仲供试品溶液 10 μ L、杜仲对照药材溶液 10 μ L、缺少杜仲的阴性对照溶液 10 μ L, 将样品溶液点样于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-正己烷(1:9)作为展开剂, 将点样后的薄层板放在展开缸中进行展开, 取出展开好的薄层板, 于通风橱中平放晾干挥去溶剂, 置紫外灯 366 nm 下检查薄层板上的斑点。结果见图 7。

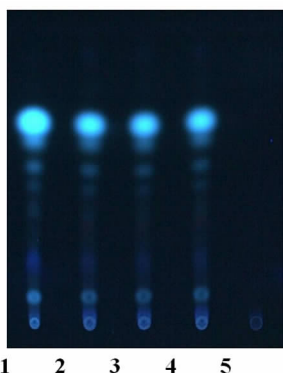


图 6 骨松灵颗粒当归薄层色谱图

注:1 当归对照药材 2,3,4 骨松灵颗粒 5 阴性对照品

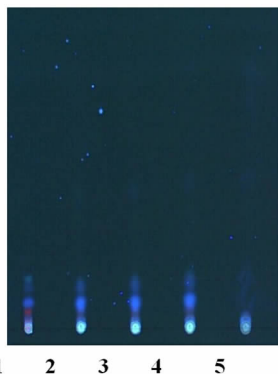


图 7 骨松灵颗粒杜仲薄层色谱图

注:1 杜仲对照药材 2,3,4 骨松灵颗粒 5 阴性对照品

2.1.8 龟甲^[1,8] 取本品约 13.0 g, 研细, 加入 20 mL 甲醇, 在超声仪上超声 30 min, 将所得的溶液滤过, 并在水浴锅上蒸干所得的滤液, 在滤液蒸干所得的残渣中加入 1 mL 甲醇溶解, 所得溶液即为供试品溶液。用电子天平精密称定胆固醇对照品适量, 置于棕色的容量瓶中, 加入甲醇至刻度使溶解, 制成浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。称定龟甲对照药材约 4.0 g, 按照供试品溶液制备方法制备为龟甲对照药材溶液。与龟甲供试品溶液的制备方法相同, 将

缺少龟甲药材的药粉制成阴性对照溶液, 备用。用玻璃点样毛细管分别吸取龟甲供试品溶液 3 μ L、胆固醇对照品溶液和龟甲对照药材溶液各 3 μ L、缺少龟甲的阴性对照品溶液 3 μ L, 将样品溶液点样于同一硅胶 G 板上, 乙酸乙酯-甲酸-甲苯-甲醇(2:0.6:15:1)作为展开剂, 将点样后的薄层板放在展开缸中上行展开 16 cm, 取出展开好的薄层板, 于通风橱中平放晾干挥去溶剂, 并在薄层板上均匀喷以 10% 硫酸乙醇试液, 将喷好后的薄层板放置在 105 $^{\circ}$ C 烘箱中加热(20 min), 至斑点清晰后取出, 于日光下观察薄层板上的斑点。结果见图 8。

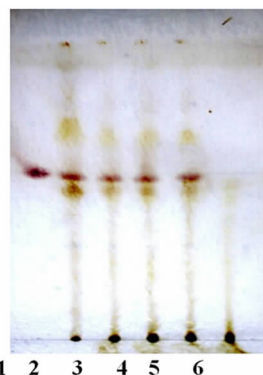


图 8 骨松灵颗粒龟甲薄层色谱图

注:1 胆固醇对照品 2 龟甲对照药材 3,4,5 骨松灵颗粒 6 阴性对照品

结论:在薄层板上, 三批制剂样品在与相应的阳性对照样品位置处有显相同的斑点, 而阴性对照样品在此处无干扰。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件^[1] 淫羊藿苷: 流动相乙腈-水(30:70), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L, 检测波长 270 nm。理论塔板数按照主要成分淫羊藿苷的峰进行计算应不低于 1500。柚皮苷: 流动相甲醇-磷酸-水(35:4:65), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L, 检测波长 283 nm。理论塔板数按照主要成分柚皮苷的峰进行计算应不低于 3000。毛蕊花糖苷: 流动相乙腈-1% 醋酸(14:86), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L, 检测波长 334 nm。理论塔板数按照主要成分毛蕊花糖苷的峰进行计算应不低于 5 000。黄芪甲苷^[9-10]: 流动相乙腈-水(33:67), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L, 蒸发温度: 100 $^{\circ}$ C, 雾化温度: 80 $^{\circ}$ C, 氮气流速: 1.6 mL/min。理论塔板数按照主要成分黄芪甲苷的峰进行计算应不低于 4 000。

2.2.2 对照品溶液制备 分别精密称定淫羊藿苷、柚皮苷、毛蕊花糖苷、黄芪甲苷对照品适量, 其中淫

羊藿苷、柚皮苷、黄芪甲苷分别加入甲醇制成每毫升中含 0.216 0、0.568 0、0.935 0 mg 的溶液,毛蕊花糖苷加入流动相制成每毫升中含 0.243 2 mg 的溶液,即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 1)淫羊藿苷供试品溶液:称取本品约 1.1 g,置于具塞锥形瓶中,加入甲醇 20 mL,称重,超声处理 1 h,再称重,并用甲醇补足减失重量,摇匀,溶液滤过,取续滤液,用微孔滤膜(0.45 μm)进行滤过,即得。2)柚皮苷供试品溶液:称取本品约 1.2 g,加入甲醇 30 mL,置于圆底烧瓶中,加热回流(80 ℃)3 h,冷却至室温,溶液滤过,滤液置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇洗涤容器,洗涤的溶液倒入量瓶中,并加入甲醇稀释至容量瓶的刻度,用微孔滤膜(0.45 μm)进行滤过,即得。3)毛蕊花糖苷供试品溶液:称取本品约 12.0 g,置于圆底烧瓶中,加入甲醇 100 mL,称重,水浴 80 ℃回流提取 45 min,冷却至室温,用电子分析天平再称重,并用甲醇补足提取过程中因溶剂挥发而减失的重量,摇匀溶液后用滤纸进行滤过,用量筒量取续滤液 50 mL,水浴(80 ℃)挥干溶剂,在续滤液挥干溶剂后所得的残渣中加入流动相进行溶解,溶解后溶液转移至 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,用微孔滤膜(0.45 μm)进行滤过,即得。4)黄芪甲苷供试品溶液:称取本品约 5.0 g,置于圆底烧瓶中,加入甲醇 100 mL,水浴(80 ℃)回流提取 2 h,提取液用滤纸滤过,收集滤液,并在水浴锅上挥去滤液中的溶剂,滤液挥去溶剂后所得的残渣中加入 50 mL 热水溶解,冷却至室温后,在水溶液中加入水饱和过的正丁醇,一共萃取 4 次,每次均为 40 mL,合并所得的正丁醇提取液,然后用氨试液萃取 2 次,每次 40 mL,弃去氨试液,合并正丁醇萃取液,并在水浴(80 ℃)上挥去溶剂,残渣加甲醇进行溶解,并定容至 10 mL 量瓶中,用微孔滤膜(0.45 μm)进行滤过,即得。

2.2.4 标准曲线绘制 取 2.2.2 项下 4 种对照品溶液,稀释成不同浓度,分别按照 2.2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积。分别以淫羊藿苷、柚皮苷、毛蕊花糖苷、黄芪甲苷浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,得回归方程 $Y = 247.93X + 0.023\ 7$ ($r = 0.999\ 7$), $Y = 205.14X + 0.342\ 6$ ($r = 0.999\ 6$), $Y = 369.29X + 0.140\ 6$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 1.529\ 3X + 2.871\ 9$ ($r = 0.999\ 1$),线性范围分别为 0.031 5 ~ 1.712 0 μg,0.056 8 ~ 1.817 6 μg,0.060 8 ~ 1.945 6 μg,0.467 6 ~ 11.220 0 μg,线性关系良好。

2.2.5 专属性 按 2.2.3 项下的方法,分别制备不

含淫羊藿、骨碎补、熟地黄和黄芪的阴性对照溶液,按照 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果在与淫羊藿苷、柚皮苷、毛蕊花糖苷和黄芪甲苷对照品色谱相应位置上阴性对照品无干扰,表明本方法具有较好的专属性。

2.2.6 精密度试验 取 2.2.2 项下淫羊藿苷和柚皮苷对照品溶液各 10 μL,毛蕊花糖苷和黄芪甲苷对照品溶液各 20 μL,分别按 2.2.1 项下色谱条件测定,连续进样 5 次,测得淫羊藿苷、柚皮苷、毛蕊花糖苷、黄芪甲苷峰面积 RSD 分别为 0.11%,0.36%,0.83%,0.65%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取淫羊藿苷和柚皮苷供试品溶液各 10 μL,毛蕊花糖苷和黄芪甲苷供试品溶液各 20 μL,分别于 0,2,4,6,8,12 h 进行测定。结果淫羊藿苷在 8 h 内基本稳定,RSD 为 3.14%;柚皮苷在 12 h 内基本稳定,RSD 为 0.67%;毛蕊花糖苷在 4 h 内基本稳定,RSD 为 2.32%;黄芪甲苷在 12 h 内基本稳定,RSD 为 1.86%。

2.2.8 重复性试验 称取骨松灵颗粒适量,按照 2.2.3 项下方法分别制备 6 份淫羊藿苷、柚皮苷、毛蕊花糖苷和黄芪甲苷供试品,按照 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积,计算 4 种成分平均含量,RSD 值分别为 1.77%,0.73%,2.32%,0.79%,表明试验重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量的骨松灵颗粒各 9 份,分别加入淫羊藿苷、柚皮苷、毛蕊花糖苷和黄芪甲苷对照品溶液适量,按照 2.2.3 项下供试品溶液的制备方法,同法进行处理样品,样品溶液进样测定含量,计算样品的加样回收率。淫羊藿苷平均回收率为 100.23%,柚皮苷平均回收率为 99.97%,毛蕊花糖苷平均回收率为 99.94%,黄芪甲苷平均回收率为 99.84%,结果表明方法可靠。

2.2.10 样品测定 取颗粒样品共 3 批,按上述四种供试品溶液的制备方法制备样品溶液,分别在上述各色谱条件下将样品溶液进样测定,测得四种指标性成分的含量。结果如下表 1。

表 1 骨松灵颗粒样品测定结果(n=3)				
批次	淫羊藿苷含量 mg/g	柚皮苷含量 mg/g	毛蕊花糖苷 含量 mg/g	黄芪甲苷含量 mg/g
I	3.8868	4.0051	0.1316	0.3582
II	3.9420	3.9596	0.1280	0.3600
III	3.9322	3.9719	0.1186	0.4003

3 讨论

淫羊藿、骨碎补、熟地黄、黄芪是本方中的君臣

药。淫羊藿中的淫羊藿苷等黄酮类成分具有抑制破骨细胞形成^[11];骨碎补中柚皮苷等黄酮类成分具有提高骨密度,促进成骨细胞的增殖和分化^[12];熟地黄提取物能提高成骨细胞中碱性磷酸酶的活性及成骨细胞的增殖^[13];黄芪总黄酮能明显抑制骨矿物质的溶解和丢失^[14];故选择淫羊藿中的淫羊藿苷、骨碎补中的柚皮苷、熟地黄中的毛蕊花糖苷、黄芪中的黄芪甲苷作为含量测定的指标性成分。

骨碎补的鉴定研究方法按照 2010 版药典中展开剂的条件进行展开,结果在柚皮苷对照品的相应位置处样品无斑点,采用本实验中展开剂条件后,斑点清晰可见,且阴性无干扰。黄芪的鉴定研究方法按照 2010 版药典的检测方法制样,以黄芪甲苷为对照,结果阴性对照有干扰,经摸索条件后,按照本实验方法进行展开,结果斑点清晰,阴性对照无干扰。熟地黄的鉴定研究方法按照 2010 版药典的检测方法制样展开,以毛蕊花糖苷为对照,结果供试品色谱图斑点分不开,且阴性有干扰;参照文献中展开剂条件进行展开,斑点清晰可见,且阴性无干扰。当归的鉴定研究方法按照 2010 版药典的检测方法未有斑点,参考文献中鉴别方法,结果斑点清晰可见,且阴性无干扰。

在定量测定中,分别对供试品溶液制备中的提前方法、提取溶剂、提取时间进行了考察,最终确定本文中供试品的处理方法。

采用《中国药典》2010 年版一部中淫羊藿药材中淫羊藿苷含量测定色谱条件对本品中淫羊藿苷含量进行测定,色谱峰分离较好,峰形对称,适合本品中淫羊藿苷的含量测定;按照药典流动相条件(甲醇-醋酸-水)测定柚皮苷,峰有拖尾现象,将流动相改为甲醇-磷酸-水,峰形较好,适合本品中柚皮苷的含量测定;按照药典,毛蕊花糖苷流动相条件为乙腈-0.1%醋酸(16:84),色谱峰分离不好,峰形拖尾,调整流动相条件为乙腈-1%醋酸(14:86),色谱峰分离较好;按照药典,黄芪甲苷流动相比比例为乙腈-水(32:68),色谱峰分离不好,调整流动相比比例为(33:67),色谱峰分离较好。

由毛蕊花糖苷稳定性试验结果发现,毛蕊花糖苷稳定性较差^[15],供试品应在制备后 4 h 内进样测定。

本研究采用 TLC 法定性鉴别 8 味药材的特征斑点明显,HPLC 法测定 4 种指标性成分含量的方法较简便,且稳定、准确,可有效控制骨松灵颗粒的质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 李德勋. 壮骨关节丸中淫羊藿、骨碎补的薄层色谱鉴别[J]. 中成药,2003,25(8):682-683.
- [3] 冯玛莉,高凤福. 龟龄集中补骨脂的薄层色谱鉴别[J]. 山西中医学院学报,2005,6(2):44-45.
- [4] 朱希,尹华,李月,等. 补肾活血颗粒的薄层色谱研究[J]. 江西中医学院学报,2012,24(4):33-37.
- [5] 刘志承,李曙光,刘纪青,等. 软肝颗粒质量标准研究[J]. 中药材,2010,33(10):1649-1651.
- [6] 王宇红,周新蓓. 脂清胶囊质量标准的研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(3):641-642.
- [7] 张子华. 归肾丸的质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(2):153-156.
- [8] 张永太,李国文,冯年平,等. 丽妍软胶囊质量标准研究[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(7):582-583.
- [9] 田景奎,吴丽敏,刘建建,等. HPLC-ELSD 测定芪体颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中成药,2004,26(10):812.
- [10] 聂颖兰,范斌,郭娜,等. HPLC-ELSD 法测定健脾益肾胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):130.
- [11] 赵丽娜. 淫羊藿防治骨质疏松临床效果评价[J]. 现代中西医结合杂志,2003,12(9):922-923.
- [12] 周继凯. 中药骨碎补对成骨细胞的作用机制研究[D]. 长沙:中南大学,2007.
- [13] 李雪靖,郭鸿. 原发性骨质疏松症中医药治疗概况[J]. 河北医药,2010,32(20):2913.
- [14] 陈华庭,王虎,郑菁,等. 黄芪总黄酮提取物对维甲酸所致大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国药师,2005,8(11):895-897.
- [15] 彭素萍,巩珏,苗瑞娟,等. 连翘酯苷 B 与毛蕊花糖苷稳定性研究[J]. 今日药学,2012,22(6):326-328.

(2015-04-14 收稿 责任编辑:张文婷)