

HPLC 法同时测定金刚片中 9 种成分

许银凤， 赵紫伟， 郭文娟
(云南经济管理学院, 云南 昆明 650106)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定金刚片(肉苁蓉、杜仲、淫羊藿等)中松果菊苷、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含有量。**方法** 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相(甲醇-乙腈)-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 330、208、270 nm。**结果** 9 种成分在各自范围内线性关系良好($r > 0.999\ 0$), 平均加样回收率 96.64% ~ 100.08%, RSD 0.71% ~ 1.76%。**结论** 该方法灵敏准确, 可用于金刚片的质量控制。
关键词: 金刚片; 化学成分; HPLC
中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)03-0605-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.019

Simultaneous determination of nine constituents in Jingang Tablets by HPLC

XU Yin-feng, ZHAO Zi-wei, GUO Wen-juan
(Yunnan College of Business Management, Kunming 650106, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of echinacoside, verbascoside, aucubin, pinoresinol diglucoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin and baohuoside I in Jingang Tablets (*Cistanches Herba*, *Eucommiae Cortex*, *Epimedii Folium*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of (methanol-acetonitrile) -0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 330, 208 and 270 nm. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.64% – 100.08% with the RSDs of 0.71% – 1.76%. **CONCLUSION** This sensitive and accurate method can be used for the quality control of Jingang Tablets.
KEY WORDS: Jingang Tablets; chemical constituents; HPLC

金刚片具有温阳补肾、益精填髓、强筋壮骨的功效,临床上用于腰膝酸软、阳痿不举、遗精早泄、小便频数等病症的治疗,该制剂源于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第 12 册^[1],是由肉苁蓉(酒蒸)、杜仲(盐水炒炭)、巴戟天(盐炒)、淫羊藿、羊腰子、狗肾(烫)、硫黄(制)7 味药材加工而成中药复方制剂,但该标准项下仅对其进行了理化鉴别研究,尚无成分定量测定,邓祖磊等^[2]仅采用 HPLC 法对其中的淫羊藿苷进行了定量研究。中药复方制剂具有多组分、多靶点、协同作用的特点,单一成分难以有效控制其质量和疗效

一致性,故本实验采用 HPLC 法对肉苁蓉(酒蒸)中松果菊苷和毛蕊花糖苷、杜仲(盐水炒炭)中桃叶珊瑚苷和松脂醇二葡萄糖苷,以及淫羊藿中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含有量同时进行测定,以期为金刚片质量标准提高提供依据。
1 仪器与试药
1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);AUD220D 电子天平(0.01 mg,日本岛津公司);KQ-500 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 金刚片（批号分别为 160604、160703、170101，陕西康惠制药股份有限公司）；松果菊苷（111670-201706，含有量 89.7%）、毛蕊花糖苷（111530-201512，含有量 96.7%）、松脂醇二葡萄糖苷（111537-201605，含有量 94.6%）、朝藿定 C（111780-201503，含有量 95.5%）、淫羊藿苷（110737-201516，含有量 94.2%）、宝藿苷 I（111852-201603，含有量 99.9%）对照品来自中国食品药品检定研究院；桃叶珊瑚苷（479-98-1，含有量 98.0%）、朝藿定 A（110623-72-8，含有量 97.0%）、朝藿定 B（110623-73-9，含有量 98.0%）对照品来自上海纯优生物科技有限公司。乙腈（天津市科密欧化学试剂有限公司）、甲醇（天津康科德科技有限公司）为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取松果菊苷、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 对照品适量，50% 甲醇制成贮备液（质量浓度分别为 1.498、0.604、0.442、1.320、0.396、0.478、0.992、0.784、0.402 mg/mL），分别精密量取 5.0、5.0、5.0、5.0、2.5、5.0、5.0、5.0、2.5 mL 置于同一 100 mL 量瓶中，50% 甲醇稀释至刻度，即得（质量浓度分别为 0.074 9、0.030 2、0.022 1、0.066 0、0.009 9、0.023 9、0.049 6、0.039 2、0.010 1 mg/mL）。

2.1.2 供试品溶液 取样品适量，除去糖衣后研细，精密称取约 0.5 g，置于 50 mL 量瓶中，精密加入 50% 甲醇 50 mL，超声提取 30 min，放冷，

50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按金刚片质量标准项下的处方和工艺过程，分别制备不含肉苁蓉（酒蒸）、杜仲（盐水炒炭）、淫羊藿的阴性样品，按“2.1.2”项下方法制成相应阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相 A 为甲醇-乙腈（3：2），B 为 0.2% 磷酸，梯度洗脱^[3-4]（0 ~ 13 min，25.0% A；13 ~ 20 min，25.0% → 29.0% A；20 ~ 33 min，29.0% → 41.0% A；33 ~ 53 min，41.0% → 65.0% A；53 ~ 60 min，65.0% → 25.0% A）；0 ~ 20 min 时在 330 nm^[5-9] 波长下检测松果菊苷和毛蕊花糖苷，20 ~ 33 min 在 208 nm^[10-12] 波长下检测桃叶珊瑚苷和松脂醇二葡萄糖苷，33 ~ 60 min 时在 270 nm^[13-14] 波长下检测朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷 I；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃。

2.3 系统适用性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，该方法专属性良好，各成分理论塔板数均大于 3 500，分离度均大于 1.5，阴性无干扰。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下各对照品贮备液 5.0 mL 至 50 mL 量瓶中，50% 乙醇稀释至刻度，制成溶液 A，取适量依次用 50% 甲醇稀释 20、15、10、5、2 倍，制得溶液 B、C、D、E、F，在“2.2”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
松果菊苷	$Y = 2.644\ 6 \times 10^6 X + 479.5$	0.999 8	7.490 ~ 149.8	0.437
毛蕊花糖苷	$Y = 1.187\ 4 \times 10^6 X + 288.1$	0.999 9	3.020 ~ 60.40	0.218
桃叶珊瑚苷	$Y = 1.431\ 5 \times 10^6 X - 352.4$	0.999 6	2.210 ~ 44.20	0.175
松脂醇二葡萄糖苷	$Y = 2.107\ 3 \times 10^6 X + 400.8$	0.999 4	6.600 ~ 132.0	0.382
朝藿定 A	$Y = 5.712\ 9 \times 10^5 X - 229.3$	0.999 9	1.980 ~ 39.60	0.119
朝藿定 B	$Y = 9.051\ 7 \times 10^5 X - 382.7$	0.999 7	2.390 ~ 47.80	0.206
朝藿定 C	$Y = 1.491\ 9 \times 10^6 X - 157.6$	0.999 5	4.960 ~ 99.20	0.163
淫羊藿苷	$Y = 1.684\ 2 \times 10^6 X + 335.9$	0.999 3	3.920 ~ 78.40	0.324
宝藿苷 I	$Y = 7.997\ 3 \times 10^5 X - 264.7$	0.999 8	2.010 ~ 40.20	0.131

2.5 精密度试验 取“2.1.1”项下对照品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次，测得松果

菊苷、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、

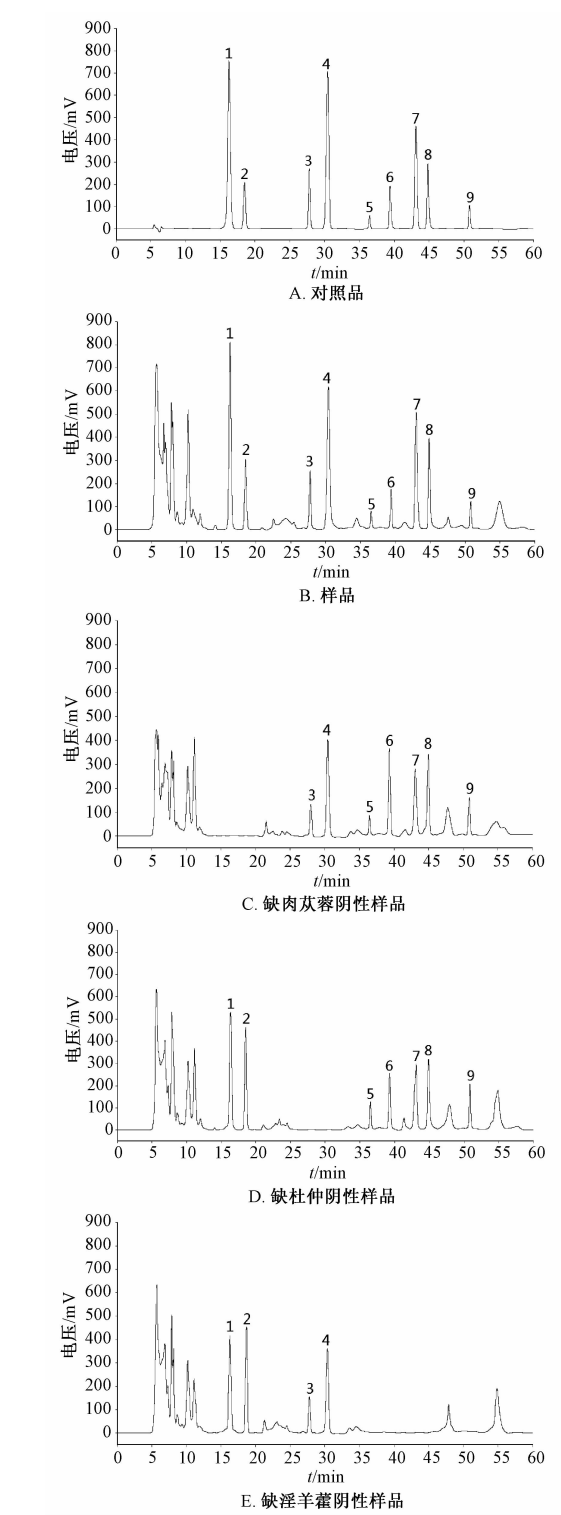


图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

宝藿苷 I 峰面积 RSD 分别为 0.52%、0.75%、0.92%、0.61%、1.27%、1.02%、0.80%、0.67%、1.13%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批样品（批号 160604）6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次，测得松果菊苷、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 含有量 RSD 分别为 0.92%、1.06%、1.13%、0.97%、1.61%、1.45%、0.59%、1.10%、1.53%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液（批号 160604），在“2.2”项色谱条件下于 0、2、4、8、10、12 h 进样测定，测得松果菊苷、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 峰面积 RSD 分别为 1.09%、0.77%、0.67%、1.18%、1.26%、1.37%、0.74%、1.18%、0.54%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品（批号 160604）6 份，除去糖衣后研细，每份 0.25 g，置于 50 mL 量瓶中，精密加入“2.1.1”项下对照品贮备液适量，根据 2015 年版《中国药典》四部“药品质量标准分析方法验证指导原则”要求，使所测成分原有量与对照品加入量比例近似 1:1，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定。结果，松果菊苷、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 平均加样回收率分别为 100.08%、97.45%、97.07%、98.59%、96.64%、98.01%、99.08%、97.74%、98.67%，RSD 分别为 1.06%、1.76%、1.27%、0.83%、0.71%、1.42%、0.85%、1.16%、1.68%。

2.9 样品含有量测定 取 3 批样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 2。

3 讨论与结论

在确定金刚片供试品溶液制备方法时，本实验首先对提取方式（超声提取、回流提取）进行了考察，发现回流提取时鞣质、多糖等易溶于水的杂质较多，干扰成分测定，同时考虑到超声操作简便、重复性好等优点，最终采用超声法提取。然后，对提取溶剂（水、50% 甲醇、甲醇、乙醇）

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)									
Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)									
批号	松果菊苷	毛蕊花糖苷	桃叶珊瑚苷	松脂醇二葡萄糖苷	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	宝藿苷 I
160604	7.172	3.648	2.141	6.339	0.973	2.079	5.976	4.128	1.251
160703	7.504	3.816	1.850	5.922	1.064	2.269	6.555	4.508	1.307
170101	6.679	3.302	2.246	6.637	0.886	1.781	5.634	3.763	1.139

和提取时间（20、30、40 min）进行了考察，以各成分提取率为评价指标，最终确定供试品溶液最佳制备方法为 50% 甲醇超声提取 30 min。然后，对柱温（25、30、35 ℃）进行了考察，以各成分峰形、分离度、保留时间为评价指标，最终确定最佳柱温为 30 ℃。

本实验采用 HPLC 法同时测定金刚片中松果菊苷、毛蕊花糖苷、桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的含有量，可以有效控制其质量，而且该方法简便、快速、全面，可为该制剂的质量控制提供依据。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准（中药成方制剂第 12 册）[S]. 北京：人民卫生出版社，1997：91.

[2] 邓祖磊，崔 田. HPLC 法测定金刚片中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房，2012，23(48)：4585-4586.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：135，165，327-328.

[4] 伍 庆，张明时，王兴宁，等. 高效液相色谱法同时测定杜仲药材中绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷的含量[J]. 时珍国医国药，2008，19(3)：688-689.

[5] 蔡 鸿，鲍 忠，姜 勇，等. 不同影响因素下肉苁蓉中 3 种活性成分的定量分析[J]. 中草药，2013，44(22)：3223-3230.

[6] 任荣军. 一测多评法测定肉苁蓉中 2 种有效成分的含量[J]. 中国药师，2015，18(8)：1404-1406.

[7] 田玉彪，杨广安，黄维杰，等. HPLC 测定肉苁蓉微粉中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量[J]. 安徽农业科学，2015，43(33)：171-173.

[8] 彭 芳，徐 荣，高晓霞，等. 蒸制处理改进肉苁蓉产地加工的质量[J]. 中成药，2016，38(5)：1093-1097.

[9] 曾建伟，张珍丽，钟 黎，等. HPLC 波长切换法同时测定复方苁蓉散中松果菊苷、毛蕊花糖苷和淫羊藿苷[J]. 中成药，2016，38(1)：84-87.

[10] 杨林军，黄文平，吴永忠，等. 杜仲板皮和枝皮中 4 种有效成分差异性比较[J]. 中草药，2015，46(4)：584-587.

[11] 赫锦锦，杜红岩，张保国，等. RP-HPLC 测定杜仲雄花茶中桃叶珊瑚苷的含量[J]. 中成药，2010，32(2)：318-320.

[12] 肖 芳，黄勤挽，范润勇，等. HPLC 法同时测定杜仲 3 个药用部位中 8 种成分[J]. 中成药，2016，38(8)：1782-1786.

[13] 马清娟，王 晶，韩 凌，等. HPLC 法同时测定淫羊藿药材中 8 种黄酮类成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报，2014，31(12)：970-978.

[14] 黄弥娜，周燕妮，柳 强，等. HPLC 法测定不同产地淫羊藿中 7 种主要黄酮类成分的含量[J]. 第二军医大学学报，2015，36(12)：1352-1355.