

抗疏健骨颗粒质量标准研究<sup>\*</sup>

杜 星      郭东艳      史传道  
(陕西中医学院,陕西 咸阳 712046)

**摘 要:** **目的** 研究抗疏健骨颗粒的质量标准,为有效控制该制剂的质量提供实验依据。**方法** 采用薄层色谱法对淫羊藿、杜仲、牛膝、丹参、白术进行定性鉴别,采用高效液相色谱法对淫羊藿苷进行定量分析。**结果** 淫羊藿、杜仲、牛膝、丹参、白术的薄层鉴别结果良好,阴性对照均无干扰;含量测定淫羊藿苷在 0.1 μg ~ 1.2 μg 范围内有良好的线性关系( $r=0.9999$ ),平均加样回收率为 100.66%,RSD 为 1.31% ( $n=6$ )。**结论** 所建立的 TLC 法和 HPLC 法对淫羊藿、杜仲、牛膝、丹参、白术和淫羊藿苷含量可准确地进行定性、定量测定,专属性强、重现性好,可用于抗疏健骨颗粒的质量控制。

**关键词:** 抗疏健骨颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;淫羊藿苷

中图分类号: R286.0      文献标识码: A      文章编号: 1002 - 168X(2014)04 - 0097 - 05

Quality Standard Research of Kangshu Jiangu Granule<sup>\*</sup>

Du Xing      Guo Dongyan      Shi Chuandao  
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 712046)

**Abstract:** **Objective** to study the quality standard of Kangshu Jiangu granule, to provide the experimental basis for the effective quality control of the preparation. **Methods** TLC was used for qualitative identification of epimedium, eucommia, Achyranthes root, salvia, Atractylodes, using high performance liquid chromatography method for the quantitative analysis of icariin. **Results** the TLC results of epimedium, eucommia, Achyranthes root, salvia, Atractylodes macrocephala are good, the negative control showed no interference; the content determination of icariin between 0.1 μg ~ 1.2 μg range has a good linear relationship ( $r=0.9999$ ), the average recovery was 100.66%, RSD was 1.31% ( $n=6$ ). **Conclusion** the determination of TLC method and HPLC method of epimedium, eucommia, Achyranthes root, salvia, Rhizoma Atractylodis Macrocephalae and icariin contents can be accurately qualitative, quantitative, strong specificity, good reproducibility, and can be used for quality control of Kangshu Jiangu granule.

**Keywords:** Kangshu Jiangu granule; TLC; HPLC; icariin

抗疏健骨颗粒由淫羊藿、丹参、白术、杜仲、牛膝等药味组成,具有补肾健脾,活血壮骨的功效,主要用于脾肾两虚,气血瘀阻导致的骨质疏松症。方中淫羊藿为君药,其化学成分主要为黄酮类化合物,其中淫羊藿苷为其特征性成分<sup>[1-3]</sup>,为了控制该制剂的质量,本文拟采用薄层色谱法对方中淫羊藿、杜仲、牛膝、白术、丹参进行定性鉴别,对淫羊藿中的主要成分淫羊藿苷进行含量测定,为有效控制该制剂的质量提供实验依据。

**1 材料与仪器**

**1.1 实验材料** 试验用饮片均购于陕西昊源中药饮片有限公司,淫羊藿药材批号:131001、杜仲药材批号:140101、牛膝药材批号:140101、白术药材批号:140101、丹参药材批号:140101;抗疏健骨颗粒三批自制(批号:140410、140421、140506)。

淫羊藿苷对照品(批号:110737 - 200415)、丹酚酸 B 对照品(批号:111567 - 201212)、丹参酮 II A 对照品(批号:110766 - 200619)、人参皂苷 Ro

<sup>\*</sup> 基金项目: 陕西省科技厅资助项目(2012KTCL03 - 22)

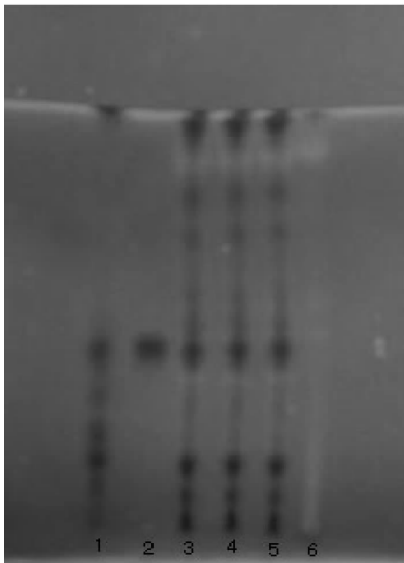
(批号:110754-200320)、 $\beta$ -蜕皮甾酮对照品(批号:111638-200603)、松脂醇二葡萄糖苷对照品(批号:111537-201204)、淫羊藿对照药材(批号:121632-201101)、丹参对照药材(批号:120923-201113)、白术对照药材(批号:120925-201109)、杜仲对照药材(批号:121202-200502)、牛膝对照药材(批号:121066-201106)、以上对照品及对照药材均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱纯(Honeywell),水为过滤后的娃哈哈纯净水。

**1.2 仪器** 安捷伦 1260 型高效液相色谱仪(G1311C 型四元泵,G1329B 型进样器,G4212B 型二极管阵列检测器,ChemStation for LC 3D systems)色谱工作站;PTF-A500 电子天平(百分之一);METTLER TOLEDO(AL204)电子天平(万分之一);SartoriusMC 电子天平(十万分之一);D101 型电热鼓风干燥箱。

**2 方法与结果**

**2.1 定性鉴别**

**2.1.1 淫羊藿薄层色谱鉴别** 取抗疏健骨颗粒约 1 g,研细,加乙醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取淫羊藿对照药材粉末 0.25 g,同法制备对照药材溶液。再取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,作为对照品溶液。



1. 淫羊藿对照药材;2. 淫羊藿苷对照品;  
3、4、5 供试品;6 阴性对照

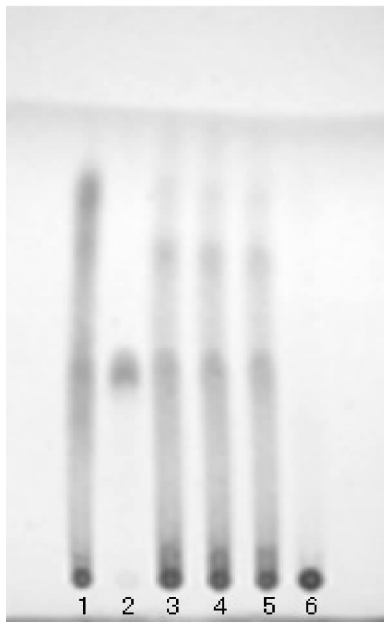
图 1 淫羊藿薄层色谱图(紫外 302nm)

按照处方比例制得缺淫羊藿药材的阴性样品,同法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法<sup>[4]</sup>试验,吸取供试品溶液、对照药材、对照品和阴性对

照溶液各 5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10: 1: 1;1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(302 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材、对照品色谱相应的位置上,显相同的颜色荧光斑点,阴性对照无干扰。结果见图 1。

**2.1.2 杜仲薄层色谱鉴别<sup>[5]</sup>**

取抗疏健骨颗粒约 5 g,研细,置于锥形瓶中,加甲醇 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液水浴蒸干,残渣加水 30 mL 使溶解,用乙酸乙酯振摇提取 3 次,每次 25 mL,弃去有机层,余水层用水饱和正丁醇溶液振摇提取 3 次,每次 25 mL,弃去有机层,余水层通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径为 1.5 cm,柱高为 15 cm),分别用 100 mL 水、100 mL 氨试液洗脱,弃去洗脱液,用水洗至近中性,再用 40 % 乙醇溶液 50 mL 洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取杜仲对照药材 0.5 g,置于锥形瓶中,加甲醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液水浴蒸干,残渣加水 15 mL 使溶解,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径为 1.5 cm,柱高为 15 cm),分别用 100 mL 水、100 mL 氨试液洗脱,弃去洗脱液,用水洗至近中性,再用 40 % 乙醇溶液 50 mL 洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为对照药材溶液。



1. 杜仲对照药材;2. 松脂醇二葡萄糖苷对照品;  
3、4、5 供试品;6 阴性对照

图 2 杜仲薄层色谱图(日光)

再取松脂醇二葡萄糖苷对照品适量,加甲醇

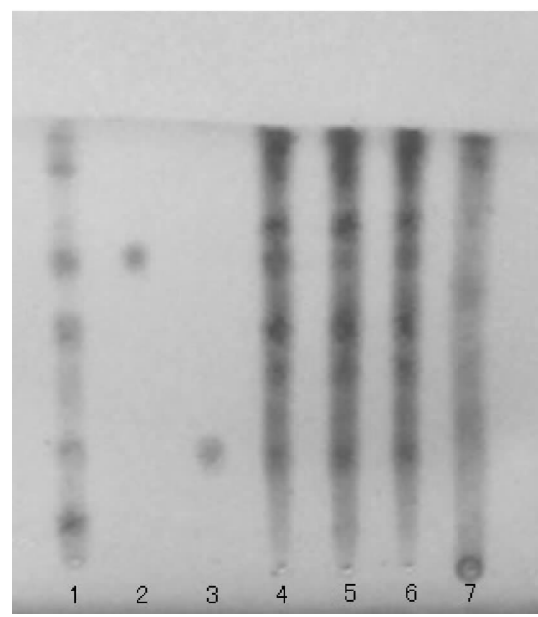
制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按照处方比例制得缺杜仲药材的阴性样品,同法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法<sup>[4]</sup>试验,吸取供试品溶液和阴性对照溶液各20  $\mu$ L、对照药材、对照品溶液各15  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(2:4:4)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%香草醛硫酸溶液,在105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,显相同的颜色斑点,阴性对照无干扰。结果见图2。

2.1.3 牛膝薄层色谱鉴别<sup>[6]</sup>

取抗疏健骨颗粒约4 g,研细,加80%甲醇50 mL,加热回流3 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水15 mL,微热使溶解,加在D101型大孔吸附树脂柱(内径为1.5 cm,柱高为15 cm)上,用水100 mL洗脱,弃去水洗液,再用20%乙醇100 mL洗脱,弃去洗脱液,继用80%乙醇100 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干残渣加水20 mL使溶解,用水饱和正丁醇溶液15 mL振摇提取1次,弃去有机层,收集水层,水浴蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取牛膝对照药材1 g,加80%甲醇25 mL,加热回流3小时,滤过,滤液蒸干,残渣加水15 mL,微热使溶解,加在D101型大孔吸附树脂柱(内径为1.5 cm,柱高为15 cm)上,用水100 mL洗脱,弃去水液,再用20%乙醇100 mL洗脱,弃去洗脱液,继用80%乙醇100 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加80%甲醇1 mL使溶解,作为对照药材溶液。再取 $\beta$ -蜕皮甾酮对照品、人参皂苷Ro对照品,加甲醇分别制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。按照处方比例制得缺牛膝药材的阴性样品,同法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法<sup>[4]</sup>试验,吸取供试品溶液及阴性对照溶液各35  $\mu$ L、对照药材溶液15  $\mu$ L和对照品溶液5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水-甲酸(7:3:0.5:0.05)为展开剂,展开(展距约9 cm),取出,晾干,喷以10%香草醛硫酸溶液,在105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。结果见图3。

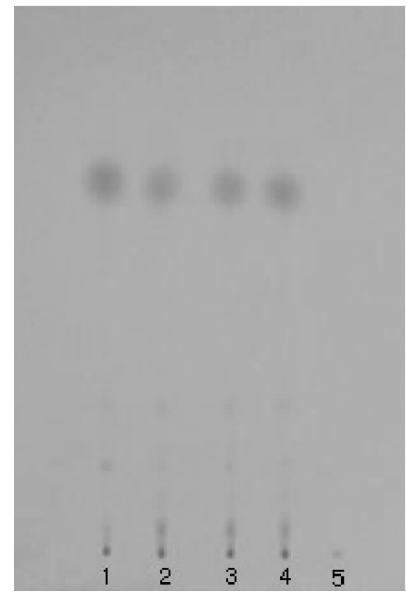
2.1.4 白术薄层色谱鉴别 取抗疏健骨颗粒约2 g,研细,加正己烷8 mL,超声处理15 min,滤过,

滤液浓缩至1 mL,作为供试品溶液。另取白术对照药材0.5 g,同法制成对照药材溶液。按照处方比例制得缺白术的阴性样品,同法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法<sup>[4]</sup>试验,吸取上述4种溶液各25  $\mu$ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(50:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,并有一桃红色主斑点(苍术酮),阴性对照无干扰。结果见图4。



1. 牛膝对照药材;2.  $\beta$ -蜕皮甾酮对照品;  
3. 人参皂苷Ro对照品;4、5、6 供试品;7 阴性对照

图3 牛膝薄层色谱图(日光)

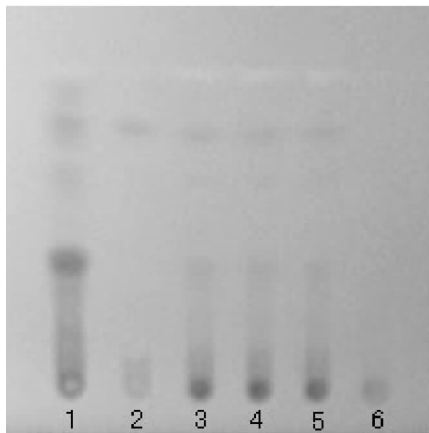


1. 白术对照药材;2,3,4 供试品;5. 阴性对照

图 4 白术薄层色谱图(日光)

## 2.1.5 丹参薄层色谱鉴别

**2.1.5.1 丹参酮 II<sub>A</sub>** 取抗疏健骨颗粒约 2 g, 研细, 加乙醚 10 mL, 振摇, 放置 1 h, 滤过, 滤液挥干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取丹参对照药材 0.5 g, 同法制成对照药材溶液。再取丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按照处方比例制得缺丹参的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法<sup>[4]</sup> 试验, 吸取供试品和阴性对照溶液各 30  $\mu$ L、对照药材、对照品溶液各 20  $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90  $^{\circ}$ C) - 乙酸乙酯(4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。结果见图 5。

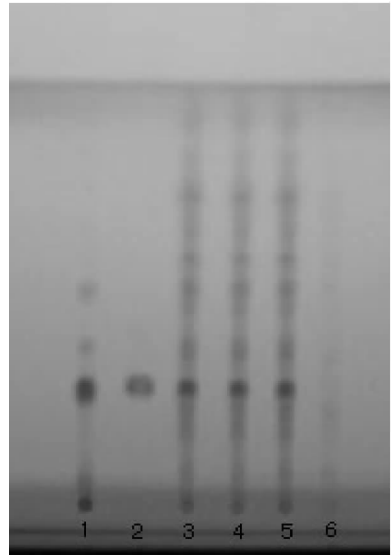


1. 白术对照药材;2. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对照品;  
3,4,5 供试品;6. 阴性对照

图 5 丹参薄层色谱图(日光)

**2.1.5.2 丹酚酸 B<sup>[7]</sup>** 取抗疏健骨颗粒约 1 g, 研细, 加 75% 甲醇 50 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 6 mL 溶解, 加盐酸调节 PH=2, 摇匀, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 10 mL, 合并, 收集乙酸乙酯层, 水浴蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取丹参对照药材 0.2 g, 加 75% 甲醇 25 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液浓缩至 1 mL, 作为对照药材溶液。再取丹酚酸 B 对照品, 加 75% 甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按照处方比例制得缺丹参的阴性样品, 同法制备阴性对照溶液。照薄层色谱法<sup>[4]</sup> 试验, 吸取供试品、阴性对照溶液、对照药材和对照

品溶液各 2  $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上, 以甲苯 - 三氯甲烷 - 乙酸乙酯 - 甲醇 - 甲酸(2:3:4:0.5:2) 为展开剂, 展开(展距约 9 cm), 取出, 晾干, 置紫外光灯(254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照无干扰。结果见图 6。



1. 丹参对照药材;2. 丹酚酸 B 对照品;  
3,4,5 供试品;6. 阴性对照

图 6 丹参薄层色谱图(紫外 254nm)

## 2.2 含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱 Thermo ODSC18(250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈 - 水(30:70); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长为 270 nm; 柱温: 25  $^{\circ}$ C。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 取淫羊藿苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取抗疏健骨颗粒约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 以微孔滤膜(0.22  $\mu$ m) 滤过, 即得。

**2.2.4 阴性对照溶液的制备** 按处方比例及制法, 制成缺淫羊藿的阴性对照样品, 取 0.25 g, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

**2.2.5 专属性试验** 精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件分别进行测定。结果表明, 阴性对照色谱图中, 在与对照品相同保留时间处无

干扰,即表明其余药味对淫羊藿苷的测定无干扰。

**2.2.6 线性关系考察** 分别精密吸取淫羊藿苷对照品溶液(浓度 0.1 mg/mL) 1,2,4,6,8,10,12  $\mu$ L,按上述色谱条件注入色谱仪,测定峰面积,以峰面积 A 为纵坐标,淫羊藿苷含量 C( $\mu$ g)为横坐标绘制标准曲线。计算的回归方程为: $y = 730.19x + 3.1022$ ,相关系数  $r^2 = 0.9999$ ,淫羊藿苷在 0.1  $\mu$ g ~ 1.2  $\mu$ g 之间线性关系良好。

**2.2.7 精密度试验** 精密吸取对照品溶液10  $\mu$ L,按上述色谱条件重复进样 5 次,记录峰面积,结果 RSD 为 0.68 %,表明本方法精密度良好。

**2.2.8 稳定性试验** 取上述项下供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12 h 进样,依上述色谱条件进行测定,记录峰面积,结果 12 h 内淫羊藿苷峰面积的 RSD(n=5)为 1.99 %,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.2.9 重复性试验** 取同一批(20140421)样品,共 5 份,按照上述方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10  $\mu$ L 进样,在上述色谱条件下,样品中淫羊藿苷的平均含量为 1.98016 mg/g,RSD 为 1.27 %,表明此方法重复性良好。

**2.2.10 回收率试验** 取已知含量的抗疏健骨颗粒 0.25 g,精密称定,分别精密加入一定量的淫羊藿苷对照品,按上述供试品制备方法及色谱条件进行试验,结果淫羊藿苷的平均回收率为 100.66 %,RSD 为 1.31 %。

**2.2.11 样品含量测定** 取本样品 3 批,按上述供试品制备方法及色谱条件进行测定,计算样品中淫羊藿苷的含量,结果见表 1。

表 1 样品中淫羊藿苷的含量测定结果(n=3)

批次	淫羊藿苷含量(mg/g)			平均值	RSD
	1	2	3		
140410	2.0096	1.9824	1.9984	1.9968	1.10
140421	1.9424	1.9984	1.9632	1.9680	2.31
140506	1.9680	1.9056	1.9296	1.9344	2.60

3 讨论

**3.1 本品系 5 味中药组成的复方制剂**,经试验摸索,建立了淫羊藿、杜仲、牛膝、丹参、白术的薄层鉴别方法,薄层斑点清晰,分离较好,且阴性无干扰,可作为抗疏健骨颗粒质量控制的定性方法。其中杜仲的薄层色谱鉴别在 2010 版《中国药典》一部中未收载,其主要是对杜仲胶的理化鉴别,文

献中报道亦较少,本文采取分别用乙酸乙酯和水饱和正丁醇溶液振摇提取 3 次,均弃去有机层,余水层通过 D101 型大孔吸附树脂柱,收集洗脱液 40 % 乙醇部分点样。此方法具有很强的专属性,可为杜仲松脂醇二葡萄糖苷的色谱鉴别提供参考依据。牛膝因其含有大量多糖成分,在进行薄层鉴别时点样困难,点样成分易扩散,且展开后拖尾现象严重,斑点不明显,经过 D101 型大孔吸附树脂柱进行洗脱后,收集其 80 % 乙醇洗脱部位,蒸干,供试品色谱中目标成分斑点明显,阴性无干扰。在对供试品中的丹酚酸 B 进行薄层鉴别时,考虑其带状现象严重,使其特征斑点被覆盖,故采用稀盐酸调节 pH,乙酸乙酯萃取的方法,改良后带状现象明显减轻,使其斑点清晰可见,此方法简便可行。

**3.2 淫羊藿在本品中系君药**,淫羊藿苷是其主要成分,本文采用高效液相色谱法测定了本品中淫羊藿苷的含量,淫羊藿苷峰和样品中其它组分色谱峰可达基线分离,同时缺淫羊藿阴性溶液色谱中在与淫羊藿苷对照品色谱峰相应位置上无色谱峰,说明阴性无干扰,故可作为抗疏健骨颗粒的定量方法。方法学考察重复性、精密度、稳定性、回收率等均较好。考虑到药材来源及提取、干燥等因素影响,以 10 版《中国药典》中的最低含量限度作为标准,本品以淫羊藿苷计,不得低于 1.68 mg/g。

参考文献

[1] 鲍磊.淫羊藿有效成分提取工艺研究[D].吉林:长春工业大学,2010.  
[2] 韩惠,单洪,周福军,等.淫羊藿中活性成分的代谢产物研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(1):78-82.  
[3] 王昌林,李昱,王粤新.淫羊藿及其有效成分的药理研究概况[J].中国中药杂志,1998,23(3):183-185.  
[4] 国家药典委员会.中国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2010.  
[5] 高志敏,李凌军,王信,等.天钩降压胶囊质量标准研究[J].时珍国医国药,2012,23(12):3012-3014.  
[6] 王珍,李鑫.补肾健脾颗粒质量标准研究[J].中成药,2010,32(7):1252-1255.  
[7] 胡克菲,郑清婷,李永华,等.复方软肝颗粒质量标准研究[J].中成药,2009,31(3):410-401.