

HPLC 测定益肾骨康颗粒中莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的含量

宋京美¹, 龚韬¹, 杨薇¹, 胡银燕¹, 严文利¹, 王夏¹, 冯利^{2*} (1.北京市临床药理学研究所, 北京 100035; 2.国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021)

摘要: 目的 通过 HPLC 对益肾骨康颗粒中莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的含量进行定量分析。方法 色谱柱为 Kinetex EVO C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量为 10 μL, 流动相采用乙腈(A)和 0.5%磷酸水溶液(B)进行梯度洗脱。检测波长设为 240 nm(莫诺苷、马钱苷)、283 nm(柚皮苷)、335 nm(野黄芩苷)进行检测。结果 莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷标准曲线分别为 $Y=1.8978 \times 10^6 X - 22\,664.29$ ($r=0.999\,9$), $Y=1.7920 \times 10^6 X + 3\,040.43$ ($r=0.999\,9$), $Y=3.7459 \times 10^6 X + 3\,287$ ($r=0.999\,9$), $Y=1.8540 \times 10^6 X + 654.57$ ($r=0.999\,8$); 线性范围分别为 0.363 5~2.544 5, 0.238 2~1.667 6, 0.087 1~0.609 4, 0.078 3~0.548 2 μg, 平均加样回收率分别为 98.25%, 96.35%, 95.74%, 95.76%, RSD 分别为 0.85%, 0.92%, 1.06%, 0.67%。**结论** 该法操作简单, 结果具有较好的仪器精密度、稳定性和重复性, 可作为益肾骨康颗粒质量控制的有效方法, 而不同批次益肾骨康颗粒有效成分含量存在不同程度差异。

关键词: 益肾骨康颗粒; 莫诺苷; 马钱苷; 野黄芩苷; 柚皮苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)07-0841-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.012

引用本文: 宋京美, 龚韬, 杨薇, 等. HPLC 测定益肾骨康颗粒中莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 841-844.

Determination of Morroniside, Loganin, Scutellarin and Naringin in Yishen Gukang Granules by HPLC

SONG Jingmei¹, GONG Tao¹, YANG Wei¹, HU Yinyan¹, YAN Wenli¹, WANG Xia¹, FENG Li^{2*} (1.Beijing Institute of Clinical Pharmacy, Beijing 100035, China; 2.National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of morroniside, loganin, scutellarin and naringin in Yishen Gukang granules by high performance liquid chromatography(HPLC). **METHODS** The HPLC method was performed on Kinetex EVO C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm). The gradient elution was adopted with the mobile phase consisting of acetonitrile(A) and 0.5% phosphoric acid aqueous(B), and the injection volume was 10 μL. The detection wavelengths were set at 240 nm (morroniside and loganin), 283 nm(naringin) and 335 nm(scutellarin). **RESULTS** The calibration curves of morroniside, loganin, scutellarin and naringin were $Y=1.8978 \times 10^6 X - 22\,664.29$ ($r=0.999\,9$), $Y=1.7920 \times 10^6 X + 3\,040.43$ ($r=0.999\,9$), $Y=3.7459 \times 10^6 X + 328\,7$ ($r=0.999\,9$), $Y=1.8540 \times 10^6 X + 654.57$ ($r=0.999\,8$) and the linear ranges were 0.363 5~2.544 5, 0.238 2~1.667 6, 0.087 1~0.609 4, 0.078 3~0.548 2 μg, respectively. The average recoveries of morroniside, loganin, scutellarin and naringin were 98.25%, 96.35%, 95.74%, 95.76% and the RSD were 0.85%, 0.92%, 1.06%, 0.67%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, stable and reproducible for the quality control of Yishen Gukang granules. The contents of active ingredients in different batches of Yishen Gukang granules are different.

KEYWORDS: Yishen Gukang granules; morroniside; loganin; scutellarin; naringin; HPLC; content determination

益肾骨康颗粒(国家发明专利号: ZL201310582907.9)为中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院的医院制剂, 该医院制剂的药物组成主要有酒萸肉、半枝莲、烫骨碎补、茯苓、牡丹皮、泽泻等十味中药, 具有补肾填髓、强筋壮骨、化痰解毒、抗肿瘤止痛的功能, 临床上多用于治疗癌性躯体痛(骨转移痛和肿瘤侵犯深部组织)及肾虚血瘀证^[1-2]。其君药: 烫骨碎补归肝、肾经,

具有疗伤止痛、补肾强骨之功, 现代药理研究表明其具有免疫调节、抗炎抗肿瘤、骨损伤修复等作用^[3-6]。臣药: 半枝莲归肺、肝、肾经, 具有清热解毒、化痰利尿之效, 现代药理研究表明其具有促进细胞免疫功能、抗肿瘤、抗病毒、解热、保肝等功能^[7-12]。佐药: 酒萸肉归肝、肾经, 具有补益肝肾、收涩固脱之功效; 现代药理研究表明其具有神经、心肌保护作用, 对糖尿病肾病保护

基金项目: 北京市科技计划项目(Z171100001717017); 中国医学科学院临床与转化基金项目(2019XK320072)

作者简介: 宋京美, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (010)83227445 E-mail: 2428083078@qq.com *通信作者: 冯利, 男, 博士, 主任医师 Tel: 18618147576 E-mail: fengli663@126.com

作用,抗肿瘤、抗氧化作用等^[13-16]。

中药最重要的特点就是多成分、多靶点,中药的多种活性成分是其发挥疗效的物质基础,多成分的质控模式是中药质量控制研究的重点^[17-20]。该医院制剂内控质量现行标准仅为薄层鉴别定性分析,缺少有效的定量分析方法。本研究现采用高效液相色谱多波长切换法同时测定酒萸肉(马钱苷、莫诺苷)、半枝莲(野黄芩苷)、烫骨碎补(柚皮苷)4种成分的含量,此方法准确、操作简便,提供了更加全面有效的定量分析手段。

1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司);XP105DR 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KX-2127QT 超声波清洗器(北京科玺世纪科技有限公司);Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司)。

甲醇(分析纯,北京市通广精细化工品公司);乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);磷酸(色谱纯,天津市光复科技发展有限公司);水为超纯水,其他试剂为分析纯;对照品:莫诺苷(批号:111998-201703;纯度:97.4%)、马钱苷(批号:111640-201707;纯度:99.2%)、野黄芩苷(批号:110842-201709;纯度:91.7%)、柚皮苷(批号:110722-201714;纯度:93.4%)均购自中国食品药品检定研究院;益肾骨康颗粒(中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院提供,批号:20181029,20181030,20181031)。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液配制

精密称取莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷对照品适量,加 80%甲醇制成每 1 mL 含莫诺苷 1.817 5 mg、马钱苷 1.191 2 mg、野黄芩苷 0.435 3 mg、柚皮苷 0.391 6 mg 混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液配制

精密称定益肾骨康样品粉末 1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 180 W,频率 60 kHz)30 min,用 80%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 阴性对照溶液配制

按处方中药味的比例及制法分别制备不含酒萸肉(莫诺苷、马钱苷)、半枝莲(野黄芩苷)、烫骨碎补(柚皮苷)的阴性样品,再按“2.2”项下方法制备相应的阴性对照溶液。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Kinetex EVO C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈(A)和 0.5%磷酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱,柱温 40 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 λ₁: 0~25 min 为 240 nm;λ₂: 25~50 min 为 283 nm;λ₃: 335 nm,进样量为 10 μL。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution procedure

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	λ ₁ /λ ₂ /nm	λ ₃ /nm
0~10	5	95	240	335
10~25	5→17	95→83	240	335
25~39	17→80	83→20	283	335
39~45	80	20	283	335
45~46	80→5	20→95	283	335
46~50	5	95	283	335

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,进行专属性试验。结果显示各个成分的专属性均良好,阴性样品对测定不产生干扰。结果见图 1。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 μL,按照“2.4”项下色谱方法进行测定,以峰面积为纵坐标 Y,进样量为横坐标 X,线性回归。分别绘制标准曲线,计算回归方程及线性范围。结果见表 2。

表 2 线性关系试验结果

Tab. 2 Results of the linear relationship

对照品	回归方程	r 值	线性范围/μg
莫诺苷	$Y=1.8978 \times 10^6 X - 22\ 664.29$	0.999 9	0.363 5~2.544 5
马钱苷	$Y=1.7920 \times 10^6 X + 3\ 040.43$	0.999 9	0.238 2~1.667 6
野黄芩苷	$Y=3.7459 \times 10^6 X + 3\ 287$	0.999 9	0.087 1~0.609 4
柚皮苷	$Y=1.8540 \times 10^6 X + 654.57$	0.999 8	0.078 3~0.548 2

2.5.3 仪器精密度试验 吸取“2.1”项下混合对照品溶液,按“2.4”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷峰面积,并计算其相应的 RSD 值分别为 0.36%, 0.21%, 0.38%, 0.17%。

2.5.4 重复性试验 取 6 份同一批次的益肾骨康颗粒,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4”项下色谱条件测定莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的峰面积,并计算 4 种成分的含量及其相应的 RSD 值。结果 4 种成分含量为 0.109 6%, 0.056 3%, 0.023 9%, 0.021 6%;其 RSD 值为 0.26%, 0.32%, 0.64%, 0.38%, 表明该方法重复性良好。

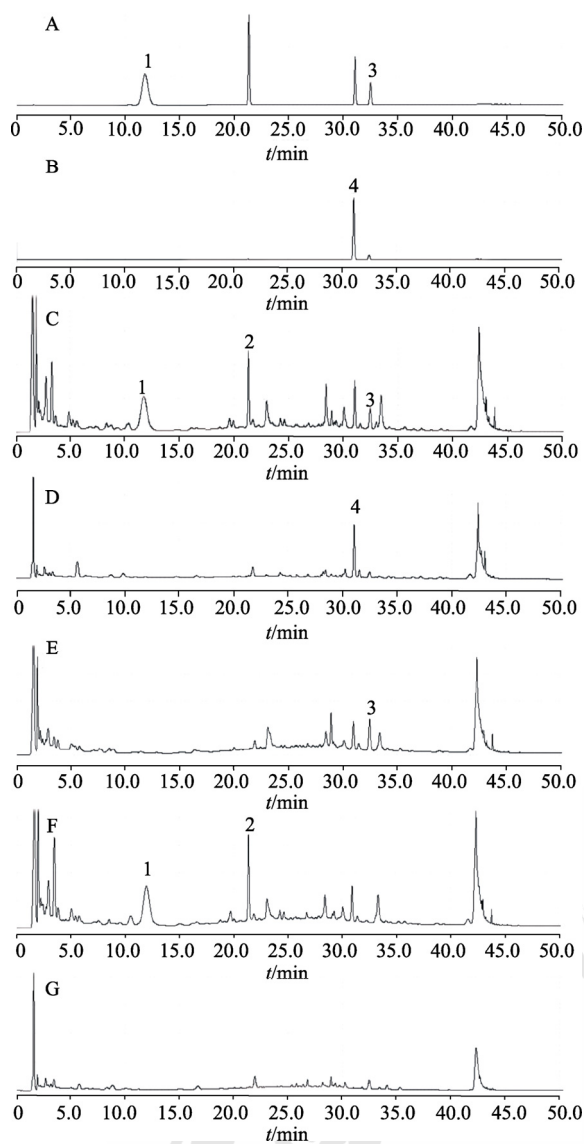


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液(λ_1 - λ_2); B-对照品溶液(λ_3); C-供试品溶液(λ_1 - λ_2); D-供试品溶液(λ_3); E-缺酒萸肉阴性样品; F-缺烫骨碎补阴性样品; G-缺半枝莲阴性样品; 1-莫诺苷; 2-马钱苷; 3-柚皮苷; 4-野黄芩苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference solution(λ_1 - λ_2); B-reference solution(λ_3); C-test solution(λ_1 - λ_2); D-test solution(λ_3); E-negative sample without Corni Fructus; F-negative sample without Drynariae Rhizoma; G-negative sample without Scutellariae Barbatæ Herba; 1-morroniside; 2-loganin; 3-naringin; 4-scutellarin.

2.5.5 溶液稳定性试验 取同一益肾骨康供试品溶液, 分别在 0, 6, 12, 18, 24 h, 按“2.4”项下色谱条件测定, 计算莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷峰面积的 RSD 值分别为 0.81%, 0.43%, 0.68%, 0.62%, 该供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5.6 加样回收率试验 取已知含量的益肾骨康样品 9 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 再分别精密加入已知含量的 50%, 100%, 150% 的混合对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项

下色谱条件进样测定, 计算加样回收率。莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的平均加样回收率分别为 98.25%, 96.35%, 95.74%, 95.76%, RSD 分别为 0.85%, 0.92%, 1.06%, 0.67%, 该方法回收率良好。结果见表 3。

表3 回收率试验结果

Tab. 3 Results of recovery test

成分	称取量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
莫诺苷	0.502 3	1.373 3	0.660 9	2.030 2	99.39	98.25	0.85
	0.502 8	1.374 7	0.660 9	2.034 1	99.78		
	0.502 2	1.373 1	0.660 9	2.018 0	97.59		
	0.501 3	1.370 6	1.321 7	2.674 0	98.61		
	0.501 5	1.371 2	1.321 7	2.668 8	98.18		
	0.501 9	1.372 2	1.321 7	2.666 7	97.94		
	0.494 3	1.351 5	1.982 6	3.285 3	97.54		
	0.497 1	1.359 1	1.982 6	3.295 0	97.64		
	0.500 4	1.368 1	1.982 6	3.302 7	97.58		
马钱苷	0.502 3	0.705 9	0.352 9	1.047 1	96.69	96.35	0.92
	0.502 8	0.706 6	0.352 9	1.053 4	98.27		
	0.502 2	0.705 8	0.352 9	1.047 1	96.71		
	0.501 3	0.704 5	0.705 8	1.385 0	96.41		
	0.501 5	0.704 8	0.705 8	1.380 8	95.78		
	0.501 9	0.705 4	0.705 8	1.378 8	95.41		
	0.494 3	0.694 7	1.058 7	1.704 4	95.37		
	0.497 1	0.698 6	1.058 7	1.715 5	96.05		
	0.500 4	0.703 3	1.058 7	1.724 6	96.47		
野黄芩苷	0.502 3	0.299 5	0.136 6	0.429 3	95.00	95.74	1.06
	0.502 8	0.299 8	0.136 6	0.433 8	98.06		
	0.502 2	0.299 4	0.136 6	0.431 4	96.58		
	0.501 3	0.298 9	0.273 3	0.560 9	95.88		
	0.501 5	0.299 0	0.273 3	0.559 5	95.32		
	0.501 9	0.299 3	0.273 3	0.559 4	95.18		
	0.494 3	0.294 7	0.409 9	0.683 5	94.85		
	0.497 1	0.296 4	0.409 9	0.686 6	95.19		
	0.500 4	0.298 4	0.409 9	0.690 3	95.61		
柚皮苷	0.502 3	0.270 3	0.140 3	0.404 4	95.65	95.76	0.67
	0.502 8	0.270 5	0.140 3	0.406 4	96.90		
	0.502 2	0.270 2	0.140 3	0.403 3	94.88		
	0.501 3	0.269 7	0.280 5	0.540 2	96.42		
	0.501 5	0.269 8	0.280 5	0.539 2	96.02		
	0.501 9	0.270 0	0.280 5	0.538 9	95.83		
	0.494 3	0.266 0	0.420 8	0.669 0	95.79		
	0.497 1	0.267 5	0.420 8	0.667 4	95.06		
	0.500 4	0.269 2	0.420 8	0.670 3	95.31		

2.6 含量测定

取 3 批益肾骨康颗粒样品, 按“2.2”项下方法配制供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件测定莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的含量。3 批样品莫诺苷、马钱苷、野黄芩苷、柚皮苷的 RSD 分别为 0.32%, 0.26%, 0.55%; 0.27%, 0.09%, 0.14%; 0.19%, 0.06%, 0.25%; 0.50%, 0.37%, 0.41%。结果见表 4。

表4 样品含量测定结果(n=2)

Tab. 4 Results of sample determination(n=2)

样品编号	莫诺苷	马钱苷	野黄芩苷	柚皮苷
20181029	0.257 6	0.132 8	0.034 4	0.048 7
20181030	0.286 0	0.153 4	0.088 6	0.058 3
20181031	0.273 4	0.140 5	0.059 6	0.053 8

3 讨论

本研究运用 UV 法全波长扫描各对照品,测得莫诺昔、马钱昔在 240 nm, 柚皮昔在 283 nm, 野黄芩昔在 335 nm 有最大吸收, 为采用同一色谱条件对 4 种成分进行测定, 故采用了多波长切换及梯度洗脱的方法以实现此目的。此方法可以同时测定 4 种成分, 缩短出峰时间, 实现各有效成分理想分离, 更有效率的进行样品测定。

在供试品溶液制备时, 分别考察了提取方法(超声处理、回流提取)、提取溶剂(60%甲醇、80%甲醇、乙醇)、提取溶媒量(15, 25, 50 mL)、提取时间(10, 20, 30, 40 min)对其含量测定结果的影响。结果显示, 当使用 80%甲醇 25 mL, 超声提取 30 min, 得到的含量结果为最优、最简便的方法。

综上所述, 本研究建立了高效液相色谱法同时测定益肾骨康颗粒中马钱昔、莫诺昔、野黄芩昔、柚皮昔的含量, 此法操作简便、重现性好、精密度高、回收率好, 结果准确, 为该药物质量控制提供了丰富的研究资料, 可用于益肾骨康颗粒的质量控制。

REFERENCES

- [1] YIN Y K, FENG L, ZHOU L, et al. Effects of Yishen Gukang decoction on expression of bone-specific alkaline phosphatase, carboxyterminal propeptide of type I procollagen, and carboxyterminal cross-linked telepeptide of type I collagen in malignant tumor patients with bone metastasis[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志:英文版), 2017, 37(1): 30-34.
- [2] SONG H L, YIN Y K, ZHOU L, et al. Randomized controlled double-blind clinical study on yishen gukang recipe combined with oxycodone hydrochloride sustained-release tablets in the treatment of moderate to severe cancerous pain with kidney deficiency and blood stasis syndrome[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2018, 59(15): 1300-1304.
- [3] TAN L Y, MA H N. Research progress in pharmacological activities of Rhizoma Drynariae[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2017, 26(11): 66-70.
- [4] LI B, DUAN T, FAN L. Study on inhibitory effect of *Drynaria Fortunei* extract on human myeloma SP20 cells[J]. Afr J Trad Compl Alt Med, 2013, 10(5): 375-379. Doi: 10. 4314/ajtcam. v10i5. 26.
- [5] 李积东, 黄起壬. 柚皮昔的分离提取及药理作用研究进展[J]. 北方药学, 2014(11): 67-68.
- [6] JIANG Z W, ZENG J Q, HUANG F, et al. Effects of flavonoids of Rhizoma Drynariae on Tibia distraction osteogenesis efficacy in rat model[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33(2): 661-663.
- [7] 王翊豪, 许晓义, 杨斯琪, 等. 半枝莲药理作用及化学成分提取的研究进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2017(38): 116-118.
- [8] LIU X. Extraction, separation and antitumor activity of total alkaloids from *Scutellaria barbata*[D]. Wuhan: Jiangnan University, 2017.
- [9] SONG H E, REN Y. Determination of four flavonoids in *Scutellaria barbata*[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2020, 48(3): 103-105.
- [10] 宋宗辉, 张艺雯, 王玲洁, 等. 姜胃宁颗粒的质控标准提高研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10): 2397-2399.
- [11] KE Y, BAO T H, WU X S, et al. Scutellarin suppresses migration and invasion of human hepatocellular carcinoma by inhibiting the STAT3/Girdin/Akt activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 483(1): 509-515.
- [12] ZHANG L B, SUN S, LI W, et al. Effect of scutellarin inhibits collagen-induced arthritis through TLR4/NF- κ B-mediated inflammation[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 5555-5560.
- [13] 杨明明, 袁晓旭, 赵桂琴, 等. 山茱萸化学成分和药理作用的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2016, 33(5): 398-400.
- [14] WEN Y Y, WANG L, WANG S, et al. Review on extraction, isolation and antioxidant activity of active components from *Cornus officinalis*[J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2018, 18(92): 44-46, 48.
- [15] XU H Q, SHEN J, LIU H, et al. Morroniside and loganin extracted from *Cornus officinalis* have protective effects on rat mesangial cell proliferation exposed to advanced glycation end products by preventing oxidative stress[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2006, 84(12): 1267-1273.
- [16] ZHUANG F Z, ZHAO Y X, LI Y H, et al. Simultaneous determination of four components in Shilongqingxue granules by HPLC[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2019, 36(6): 487-491.
- [17] XU C S, CHEN J S, ZHANG S Y, et al. Establishment of HPLC fingerprint and determination of multiple components in Compound Shexiang Huangqi Dropping Pills[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(16): 1894-1901.
- [18] HU K, LI S S, LIU W, et al. Simultaneous determination of 6 compounds in Rehmanniae Radix by dual-wavelength HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(12): 1478-1482.
- [19] ZHANG K Y, HONG T, WANG D, et al. Simultaneous determination of two specific flavonoid glycosides in *Lysimachia capillipes* Hemsl. by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(13): 1570-1573.
- [20] HUANG H, HU W N. Simultaneous determination of succinic acid, hesperidin and liquiritin in Banxia syrup by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(8): 967-970.

收稿日期: 2020-04-28

(本文责编: 曹粤锋)