

· 研究报告 ·

HPLC法测定仙灵骨葆胶囊中5种成分的含量

陈宗良¹, 吕晓霞², 陈桂茜¹, 陈捷¹ (1. 金华市食品药品检验检测研究院, 浙江 金华 321000; 2. 金华市金东区食品药品监督管理局, 浙江 金华 321000)

[摘要] 目的 采用多波长 HPLC 法建立仙灵骨葆胶囊中淫羊藿苷、朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的含量测定方法。方法 采用月旭 Ultimate[®]XB-C₁₈ 柱, 流动相采用乙腈-水系统, 梯度洗脱; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 淫羊藿苷、朝藿定 C、川续断皂苷 VI 为 212 nm, 补骨脂素、异补骨脂素为 246 nm。结果 5 种成分均能达到基线分离, 各成分的进样量分别在: 淫羊藿苷 0.008 2~0.328 μg ($r=0.999 5$)、朝藿定 C 0.055 6~2.224 μg ($r=0.999 6$)、川续断皂苷 VI 0.144 1~5.764 μg ($r=0.999 6$)、补骨脂素 0.005 4~0.215 2 μg ($r=0.998 0$)、异补骨脂素 0.006 6~0.265 6 μg ($r=0.998 5$) 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 97.59%、98.58%、98.11%、97.86%、98.22%, RSD 均小于 2.0%。结论 该方法操作简便、分离良好、数据准确、灵敏度高, 可用于仙灵骨葆胶囊的多指标成分定量测定。

[关键词] 高效液相色谱; 仙灵骨葆胶囊; 淫羊藿苷; 朝藿定 C; 川续断皂苷 VI; 补骨脂素; 异补骨脂素

[中图分类号] 284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)05-0444-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.014

One step assay for five components in Xianlinggubao capsule by HPLC method

CHEN Zongliang¹, LÜ Xiaoxia², CHEN Guiqian¹, CHEN Jie¹ (1. Jinhua Institute for Food and Drug Control, Jinhua 321000, China; 2. Jinhua Jindong City Food and Drug Administration, Jinhua 321000, China)

[Abstract] **Objective** To assay Icarine, Epimedin C, asperosaponin VI, psoralen and angelicin in Xianlinggubao capsules via multi-wavelength HPLC method. **Methods** Separation was carried out on Welch Ultimate[®]XB-C₁₈ column. The mobile phase was acetonitrile-water system and a linear gradient elution was used. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength for Icarine, Epimedin C, asperosaponin VI was set at 212 nm, psoralen and angelicin at 246 nm. **Results** Five components reached baseline separation, the linearity was good when sample size was in the range of 0.008 2-0.328 μg for Icarine ($r=0.999 5$), 0.055 6-2.224 μg for Epimedin C ($r=0.999 6$), 0.144 1-5.764 μg for asperosaponin VI ($r=0.999 6$), 0.005 4-0.215 2 μg for psoralen ($r=0.998 0$), 0.006 6-0.265 6 μg for angelicin ($r=0.998 5$). The average recoveries were 97.59%, 98.58%, 98.11%, 97.86%, 98.22% respectively. The RSDs of recovery were all less than 2.0%. **Conclusion** This method is simple, accurate, with good separation, high sensitivity for the assay of multiple components in Xianlinggubao capsule.

[Key words] HPLC; Xianlinggubao capsule; Icarine; Epimedin C; asperosaponin VI; psoralen; angelicin

仙灵骨葆胶囊是具有贵州特色的苗药, 是一种主要用于治疗老年骨质疏松的中药制剂, 收载于《国家中成药标准汇编(骨伤科分册)》。仙灵骨葆胶囊由淫羊藿、续断、补骨脂、丹参、知母和地黄六味中药组成, 具有滋补肝肾, 接骨续筋, 强筋健骨的功效, 可用于肝肾不足、瘀血阻络所致骨质疏松症的治疗^[1]。方中以淫羊藿补肾壮阳为主药, 主含淫羊藿苷和朝藿定 C; 续断主含川续断皂苷 VI, 具有补肝肾、强筋

骨、调血脉、续折伤之功, 补骨脂主含补骨脂素和异补骨脂素, 具温阳补肾之功, 共为辅药。目前文献多以淫羊藿苷、朝藿定 C 等进行定量研究, 或以川续断皂苷 VI、补骨脂素等分别进行研究^[2-7], 为更有效地控制本品质量, 本实验采用多波长 HPLC 法同时测定方中主药及辅药所含的 5 种有效成分的含量, 并进行方法学研究, 结果操作简便、分离良好、数据准确, 能显著提高工作效率, 为以后该品种质量标准的提高提供参考。

[基金项目] 金华市科技局科技项目资助(2015-3-031)

[作者简介] 陈宗良, 本科, 副主任中药师。研究方向: 中药及中成药质量控制与研究开发。Tel: (0579)82301314; Email: zongliangchen@163.com

1 仪器与材料

安捷伦 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦有限公司, 包括 VWD、DAD 检测器); XS105Du 电子

天平(梅特勒-托利多公司),DS-350L 超声波萃取仪(福州德森精工有限公司),DQ5 超纯水制水机(密里博中国有限公司)。甲醇(分析纯),超纯水自制,乙腈[色谱纯,默克化工技术(上海)有限公司]。淫羊藿苷(批号:110737-200415,含量按100%计)、朝藿定 C(批号:111780-200801,含量按99.1%计)、川续断皂苷 VI(批号:111685-200802,含量92.5%计)、补骨脂素(批号:110739-201115,含量99.3%计)、异补骨脂素(批号:110738-201012,含量100%计),以上对照品均由中国食品药品检定研究院提供。仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,批号:1505028、1406053、1504051、1505024、1407016)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:月旭 Ultimate[®]XB-C₁₈柱(250 mm×4.5 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱:0~30 min,5%~60% A,30~35 min,60%~80% A,35~40 min,80% A,40~45 min,80%~5% A;检测波长:0~23 min,212 nm,24~45 min,246 nm;流速:1.0 ml;柱温:25℃,进样量:5 μl。按上述色谱条件,各指标成分分离度均大于1.5,按川续断皂苷 VI 峰计算理论塔板数不低于5 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取淫羊藿苷10.25 mg,置25 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得A储备液;朝藿定 C 28.05 mg,置25 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得B储备液;川续断皂苷 VI 15.58 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得C储备液;补骨脂素13.55 mg、异补骨脂素16.60 mg,置同一50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得D储备液。再精密量取A储备液1 ml、B储备液2.5 ml、C储备液5 ml、D储备液1 ml,置同一25 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取供试品内容物约1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定重量,超声处理(功率140 W,频率42 kHz)45 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,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例及制法制备不含淫羊藿、续断及补骨脂的粉末,按“2.2.2”项下同法提取,得阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液0.5、1、2、5、10、20 μl,按上述色谱条件进样测定,以

峰面积(Y)为纵坐标,以各指标成分的量(X/μg)为横坐标绘制曲线,得回归方程分别为:淫羊藿苷 $Y = 2\,200.0 X - 2.866$ ($r = 0.999\,5$)、朝藿定 C $Y = 1\,955.0 X + 22.24$ ($r = 0.999\,6$)、川续断皂苷 VI $Y = 209.6 X + 4.250$ ($r = 0.999\,6$)、补骨脂素 $Y = 8\,979.6 X + 13.92$ ($r = 0.998\,0$)、异补骨脂素 $Y = 8\,403.5 X + 3.068$ ($r = 0.998\,5$),结果表明,各成分的进样量淫羊藿苷在0.008 2~0.328 μg、朝藿定 C 在0.055 6~2.224 μg、川续断皂苷 VI 在0.144 1~5.764 μg、补骨脂素在0.005 4~0.215 2 μg、异补骨脂素在0.006 6~0.265 6 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液5 μl,连续进样6次,分别计算峰面积相对标准偏差,结果淫羊藿苷的RSD为1.36%、朝藿定 C 的RSD为0.71%、续断皂苷 VI 的RSD为0.92%、补骨脂素的RSD为1.05%、异补骨脂素的RSD为0.99%,表明其精密度良好。

2.5 专属性试验 精密吸取阴性对照溶液5 μl,按上述色谱条件测定。结果阴性对照分别在淫羊藿苷、朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素相应的保留时间处无干扰,见图1。

2.6 稳定性试验 取同一供试品(批号:1505028),按“2.2.2”项下方法同法制备供试品溶液,室温下放置,分别在0、2、4、8、12、16、24 h测定含量,结果淫羊藿苷、朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的RSD分别为1.31%、1.05%、1.29%、1.65%、1.94%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一供试品(批号:1505028)6份,按“2.2.2”项下方法同法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定含量,结果淫羊藿苷、朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的RSD分别为2.18%、1.96%、1.87%、2.05%、2.14%,表明该方法重复性良好。

2.8 回收率试验 精密称取已知含量的同批号供试品(批号:1505028)6份(2份为一组),每份约0.5 g,分别加入A储备液1、2、3 ml、B储备液1、3、5 ml、C储备液1、3、5 ml、D储备液1、2、3 ml,再精密加入甲醇50 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,供回收率试验用,按上述色谱条件测定,结果淫羊藿苷、朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的平均回收率分别为97.59%、98.58%、98.11%、97.86%、98.22%,RSD分别为1.09%、1.14%、1.29%、0.93%、1.07%,见表1。

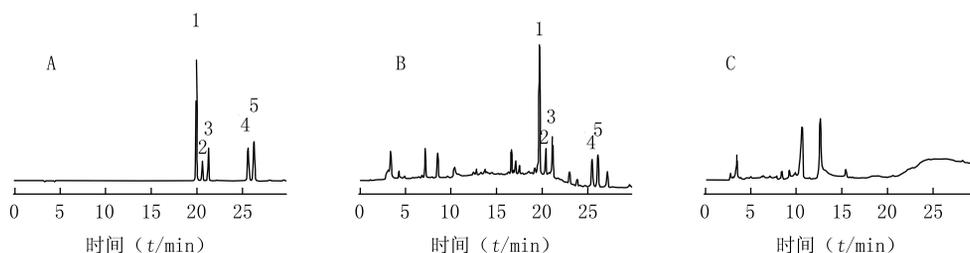


图1 仙灵骨葆胶囊的HPLC图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照

1.朝藿定C;2.淫羊藿苷;3.川续断皂苷VI;4.补骨脂素;5.异补骨脂素

表1 仙灵骨葆胶囊中5种成分的加样回收率试验结果(n=6)

成分	样品量 (m/g)	样品中含量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
淫羊藿苷	0.512 1	0.732 3	0.410 0	1.132 8	97.68	97.59	1.09
	0.501 9	0.717 7	0.410 0	1.117 9	97.61		
	0.531 2	0.759 6	0.820 0	1.571 4	99.00		
	0.509 4	0.728 4	0.820 0	1.521 7	96.74		
	0.519 4	0.742 7	1.230 0	1.924 6	96.09		
朝藿定C	0.521 6	0.745 9	1.230 0	1.956 4	98.41	98.58	1.14
	0.512 1	3.697 4	1.111 9	4.789 5	98.22		
	0.501 9	3.623 7	1.111 9	4.734 8	99.93		
	0.531 2	3.835 3	3.335 7	7.059 4	96.66		
	0.509 4	3.677 9	3.335 7	6.991 6	99.34		
川续断皂苷VI	0.519 4	3.750 1	5.559 5	9.248 6	98.90	98.11	1.29
	0.521 6	3.766 0	5.559 5	9.237 3	98.41		
	0.512 1	4.414 3	1.411 2	5.785 6	97.17		
	0.501 9	4.326 4	1.411 2	5.686 5	96.38		
	0.531 2	4.578 9	4.233 6	8.765 2	98.88		
补骨脂素	0.509 4	4.391 0	4.233 6	8.521 4	97.56	97.86	0.93
	0.519 4	4.477 2	7.056 0	11.459 3	98.95		
	0.521 6	4.496 2	7.056 0	11.532 4	99.72		
	0.512 1	0.322 6	0.269 1	0.586 5	98.06		
	0.501 9	0.316 2	0.269 1	0.574 6	96.02		
异补骨脂素	0.531 2	0.334 7	0.538 2	0.863 5	98.26	98.22	1.07
	0.509 4	0.320 9	0.538 2	0.850 1	98.32		
	0.519 4	0.327 2	0.807 3	1.121 4	98.37		
	0.521 6	0.328 6	0.807 3	1.120 9	98.14		
	0.512 1	0.353 3	0.332 0	0.680 6	98.57		
	0.501 9	0.346 3	0.332 0	0.674 1	98.73	98.22	1.07
	0.531 2	0.366 5	0.664 0	1.005 6	96.25		
	0.509 4	0.351 5	0.664 0	1.001 7	97.92		
	0.519 4	0.358 4	0.996 0	1.346 1	99.17		
	0.521 6	0.359 9	0.996 0	1.342 9	98.69		

2.9 样品测定结果 取3批供试品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进行测定,结果见表2。

3 讨论

3.1 流动相及梯度程序的选择 流动相曾选择甲醇-0.5%磷酸、乙腈-0.5%磷酸、乙腈-水、甲醇-水等系统,进行不同梯度洗脱试验,由于处方中丹参酮类等强保留成分的干扰影响,以及考虑指标峰的保留

时间、峰型、分离度等因素,本研究选择乙腈-水系统进行梯度洗脱,并在30 min后增加乙腈至80%进行洗脱,在此条件下,各检测指标成分分离度、峰型良好,45 min后基本无其他杂质峰,能为淫羊藿苷、朝藿定C、川续断皂苷VI、补骨脂素及异补骨脂素的定性、定量提供较好的色谱条件。

3.2 检测波长的选择 取上述对照品溶液在400~

(下转第452页)

2013, 8(2):e56459.

[2] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(4):246-257.

[3] Yi X, Zhou Q, Lin J, *et al*. Platelet response to aspirin in Chinese stroke patients is independent of genetic polymorphisms of COX-1 C50T and COX-2 G765C[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2013, 20(1): 65-72.

[4] Mehta SR, Bassand J P, Chrolavicius S, *et al*. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(10):930-942.

[5] Yi X, Lin J, Wang C, *et al*. Low-molecular-weight heparin is more effective than aspirin in preventing early neurologic deterioration and improving six-month outcome [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23(6): 1537-1544.

[6] 王 玥, 周 瑜, 张建容, 等. 进展性脑梗死患者血小板参数及血浆纤维蛋白原变化的研究 [J]. 重庆医学, 2015, 44(26):3692-3694.

[7] 戴京涛, 李志贤, 孔伟丽, 等. 氯吡格雷联合阿司匹林治疗脑梗死临床分析 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(11): 72-73.

[8] 吴学永, 卢常盛, 李上海, 等. 阿司匹林在不同年龄段脑梗死患者中二级预防的效果 [J]. 临床荟萃, 2016, 31(2):201-203.

[9] 赵云清, 罗建华, 周其志, 等. 阿司匹林抵抗对大动脉粥样硬化性脑梗死复发的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2015, 22(4):219-225.

[10] Sacco RL, Diener HC, Yusuf S, *et al*. Aspirin and extended release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(12):1238-1251.

[11] 乔 伟. 氯吡格雷对急性缺血性脑卒中患者血清炎症性标记物的影响 [D]. 青岛: 山东大学, 2012.

[12] 刘 凡, 查 泰, 刘雪娟, 等. 不同剂量硫酸氯吡格雷治疗缺血性脑卒中的疗效与安全性比较 [J]. 医药导报, 2014, 33(2):194-197.

[13] 倪金迪, 沈国锋, 李 响, 等. 抗血小板药预防脑卒中的应用进展 [J]. 中国临床神经科学, 2014, 22(4):412-417.

[14] 肖明珠. 负荷剂量氯吡格雷治疗进展性脑卒中的安全性及临床效果 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2015, 18(18):107-108.

[收稿日期] 2017-05-10 [修回日期] 2017-07-07
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 446 页)

表 2 仙灵骨葆胶囊中 5 种成分的含量测定结果 (mg/g)

样品批号	淫羊藿苷	朝藿定 C	川续断皂苷 VI	补骨脂素	异补骨脂素
1505028	1.43	7.22	8.62	0.63	0.69
1406053	1.01	6.79	7.16	0.89	0.93
1504051	1.37	7.88	9.31	0.76	0.78
1505024	1.10	7.38	8.26	0.81	0.93
1407016	0.91	6.07	8.94	0.79	0.86

200 nm 波长范围内进行扫描, 结果检测波长淫羊藿苷及朝藿定 C 在 270 nm、川续断皂苷 VI 在 212 nm、补骨脂素及异补骨脂素在 246 nm 处有最大吸收。由于淫羊藿苷与川续断皂苷 VI 保留时间较接近, 比较淫羊藿苷及朝藿定 C 对照品溶液在 270 nm 和 212 nm 波长下的响应及含量, 结果在 212 nm 波长处检测对结果无影响。另按上述色谱条件, 川续断皂苷 VI 峰的保留时间在 21.7 min, 补骨脂素及异补骨脂素峰保留时间分别为 25.9、26.5 min, 故选择在 23 min 处变换检测波长为 246 nm。研究过程中使用了 Zorbax SB-C₁₈ 柱、岛津 ODS-VP C₁₈ 柱、菲罗门 Luna-C₁₈ 柱进行试验, 结果各指标峰分离度均符合 HPLC 要求, 变换波长的时间为川续断皂苷 VI 峰的保留时间增加 1 min, 即可顺利进行实验。

3.3 提取方法和溶剂的选择 根据检测指标成分的溶解性, 并参考文献^[2-6]选择稀乙醇、65% 甲醇、甲醇等进行超声处理, 并考察了不同时间及不同溶剂

体积的结果, 结果表明, 采用甲醇 50 ml 超声处理 45 min 的提取效果最佳。

续断、补骨脂为温阳补肾、强筋健骨的要药, 在仙灵骨葆胶囊处方中起到滋补肝肾, 接骨续筋, 强筋健骨的作用, 文献^[7]提到多指标成分研究也是两个系统分别控制续断及补骨脂的检测方法。本研究使用一个系统对多指标成分进行测定, 方法准确可靠, 既能显著提高效率, 又能节约有机溶剂, 更为环保, 并为进一步研究一测多评方法提供参考。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理局国家药品标准 [S]. WS-10269(ZD-0269)-2002-2011Z, 2011.

[2] 伍 庆, 周 宁, 冯泽嘉, 等. HPLC 测定仙灵骨葆胶囊中淫羊藿苷和淫羊藿定 C 含量 [J]. 中成药, 2009, 31(8):1211-1213.

[3] 李振国, 李忠保, 王海波. HPLC 法测定仙灵骨葆颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量 [J]. 中医研究, 2009, 22(1):25-26.

[4] 吴春园, 王 俊, 高锦彪. 高效液相色谱法测定仙灵骨葆胶囊中川续断皂苷 VI 的含量 [J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(17): 238-239.

[5] 高国英, 吴 越, 倪艳娜. HPLC-MS 对仙灵骨葆胶囊含量测定方法的探讨 [J]. 中国药品标准, 2010, 11(4):298-301.

[6] 钱南萍, 万维香, 魏润新. 反相高效液相色谱法同时测定仙灵骨葆滴丸中淫羊藿苷和补骨脂素及异补骨脂素的含量 [J]. 中成药, 2011, 33(2):269-272.

[7] 谢 琴, 王菊美, 黄礼杰, 等. 仙灵骨葆胶囊多指标成分的定量研究 [J]. 中成药, 2001, 23(6):411-414.

[收稿日期] 2016-06-28 [修回日期] 2016-11-01
[本文编辑] 顾文华