

· 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。

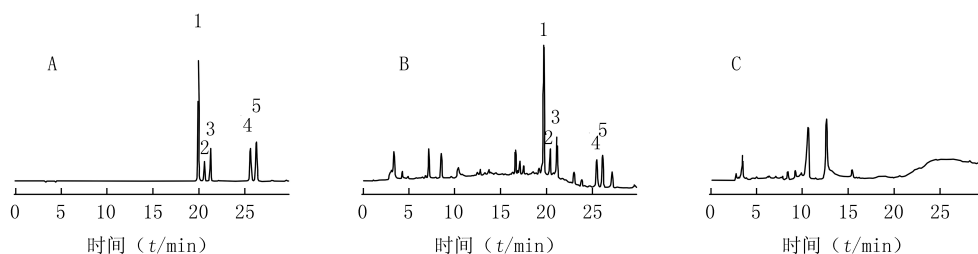


图1 仙灵骨葆胶囊的HPLC图

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	5.7856	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)

