

HPLC 同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素

周 岚¹, 乙 引¹, 伍 庆^{2*}, 周 宁³, 冯泽熹³

1. 贵州师范大学生命科学院, 贵州 贵阳 550001
2. 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001
3. 贵州同济堂制药有限公司, 贵州 贵阳 550009

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的方法。方法 RP-HPLC 法测定, 色谱柱为 Spherisorb C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 检测波长 250 nm, 柱温 25 °C。结果 朝藿定 C 在 0.505~5.050 μg ($r=0.999\ 99$), 淫羊藿苷在 0.245~2.450 μg ($r=0.999\ 99$), 补骨脂素在 50.05~500.50 ng ($r=0.999\ 99$), 异补骨脂素在 0.047~0.470 μg ($r=0.999\ 99$) 与峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 99.7%、98.2%、98.4%、98.0%, RSD 分别为 1.6%、2.0%、1.7%、2.5%。结论 本方法分析时间短且重现性和稳定性较好, 可作为仙灵骨葆胶囊的质量控制方法。

关键词: 仙灵骨葆胶囊; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 补骨脂素; 异补骨脂素; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-1998-03

Determination of epimedin C, icariin, psoralen, and isopsoralen in Xianling Gubao Capsula by HPLC

ZHOU Lan¹, YI Yin¹, WU Qing², ZHOU Ning³, FENG Ze-xi³

1. Department of Biotechnology and Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China
2. Key Laboratory for Information System of Mountainous Area and Protection of Ecological Environment of Guizhou Province, Guiyang 550001, China
3. Guizhou Tongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550009, China

Key words: Xianling Gubao Capsula; epimedin C; icariin; psoralen; isopsoralen; HPLC

仙灵骨葆胶囊由淫羊藿、补骨脂等 6 味中药经现代工艺研制而成, 美国信纳克医学研究中心按美国 FDA 标准进行临床试验, 证明其具有显著提高人腰椎骨密度和总骨密度的功效^[1]。目前对此类中成药质量控制的主要手段是测定其君药或主要药材中的主要有效成分^[2-5]。为更好地体现中药多成分、多途径、多靶点的作用, 本实验采用 RP-HPLC 法同时对淫羊藿、补骨脂中的朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素进行测定。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪、Agilent 色谱工作站 (美国 Agilent 公司), HB210250 型数控超声

波清洗器 (济宁天华超声电子仪器有限公司)。对照品朝藿定 C (自制, 质量分数 >98.0%), 对照品淫羊藿苷 (批号 073729910)、补骨脂素 (批号 0739-200108)、异补骨脂素 (批号 0738-9970) 购自中国药品生物制品检定所。仙灵骨葆胶囊为市售 (批号 081005、090912、090911, 贵州同济堂制药有限公司); 缺淫羊藿、补骨脂阴性样品 (自制); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Spherisorb C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量 10 μL, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温

收稿日期: 2010-12-14

基金项目: 国家“863”计划 (2009AA043201)

作者简介: 周 岚 (1976—), 女, 四川潼南人, 贵州师范大学在读研究生, 研究方向为分析化学。

Tel: 13439137783 E-mail: zhoulan008@126.com

*通讯作者 伍 庆 Tel: (0851)6701986 E-mail: wq0851@126.com

25 °C, 流动相为乙腈 (A) -水 (B), 梯度洗脱程序: 0~5 min, 15%~20% A; 5~10 min, 20%~30% A; 10~30 min, 30~33% A; 30~40 min, 33%~40% A; 检测波长 250 nm; 理论塔板数按淫羊藿苷峰计大于 5 000。在此色谱条件下, 朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素、异补骨脂素的分离度均大于 1.5, 阴性对照无干扰。

2.2 混合对照品储备液的制备

分别精密称取朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素、异补骨脂素对照品适量, 加甲醇适量溶解并定量稀释成含朝藿定 C 1.010 mg/mL、淫羊藿苷 490.0 μg/mL、补骨脂素 100.1 μg/mL、异补骨脂素 94.0

μg/mL 的混合对照品储备液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取仙灵骨葆胶囊内容物约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇溶液 50 mL 后, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方比例分别制备缺淫羊藿、补骨脂的阴性样品, 按“2.3”项操作, 得阴性对照溶液, 依“2.1”项测定。结果阴性对照在朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素、异补骨脂素相应保留时间处无干扰, 见图 1。

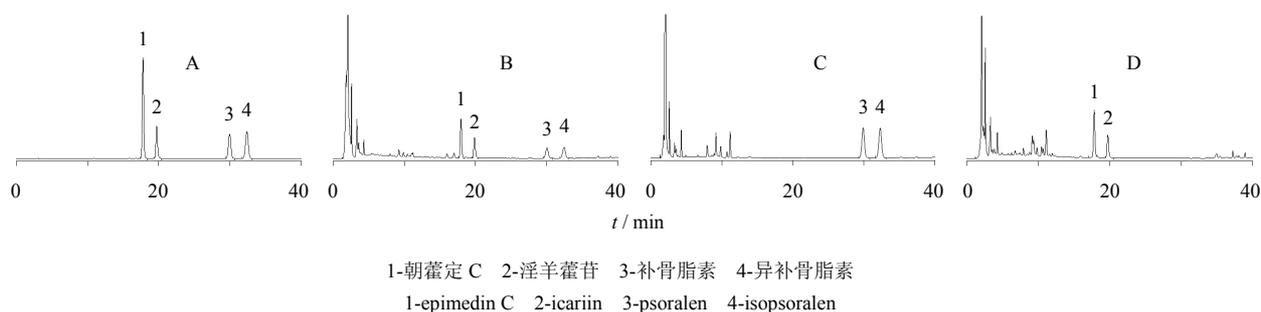


图 1 混合对照品 (A)、仙灵骨葆胶囊 (B) 和缺淫羊藿 (C)、缺补骨脂 (D) 阴性样品的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Xianling Gubao Capsula (B), negative samples without *Epimedii Folium* (C), or without *Psoraleae Fructus* (D)

2.5 线性关系考察

分别精密量取混合对照品储备液 0.5、0.75、1.0、1.5、3.0、5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液。分别进样 10 μL, 按上述色谱条件测定。以各对照品峰面积为纵坐标, 质量 (μg) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程分别为: 朝藿定 C $Y=1\,021.1X-7.365\,1$ ($r=0.999\,99$), 淫羊藿苷 $Y=1\,199.1X-4.566\,9$ ($r=0.999\,99$), 补骨脂素 $Y=6\,586.3X-7.227\,3$ ($r=0.999\,99$), 异补骨脂素 $Y=7\,217.2X-13.587\,0$ ($r=0.999\,99$); 结果表明朝藿定 C 在 0.505~5.050 μg, 淫羊藿苷在 0.245~2.450 μg, 补骨脂素在 50.05~500.50 ng, 异补骨脂素在 0.047~0.470 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 (朝藿定 C 150.15 μg/mL, 淫羊藿苷 51.99 μg/mL, 补骨脂素 10.005 μg/mL, 异补骨脂素 102.00 μg/mL) 10 μL, 连续进样 6 次, 计算得朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素、

异补骨脂素峰面积的 RSD 分别为 0.2%、0.4%、0.1%、0.1%。

2.7 稳定性试验

取批号为 090912 的样品, 按“2.3”项下方法操作制备供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样测定, 结果朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素、异补骨脂素峰面积的 RSD 分别为 1.4%、1.8%、0.9%、0.3%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.8 重现性试验

取批号为 090912 的样品, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算得朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素、异补骨脂素质量分数的 RSD 分别为 0.9%、1.0%、0.6%、0.6%。

2.9 回收率试验

取批号为 090912 的样品 9 份 (3 份 1 组), 每份 0.15 g, 精密称定, 各组分别按样品中各成分量的 80%、100%、120% 加入对照品, 按“2.3”项下的方法操作制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进样测定, 计算回收率。结果朝藿定 C、淫羊藿苷、

补骨脂素、异补骨脂素的平均回收率分别为 99.7%、98.2%、98.4%、98.0%，RSD 分别为 1.6%、2.0%、1.7%、2.5%。

2.10 样品测定

取 3 批样品（批号 081005、090912、090911），每批 2 份，制备供试品溶液，分别进样测定，外标一点法计算，测定结果见表 1。

表 1 3 批仙灵骨葆胶囊中朝藿定 C、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of epimedin C, icariin, psoralen, and isopsoralen in three batches of Xianling Gubao Capsula ($n=3$)

批号	朝藿定 C/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	淫羊藿苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	补骨脂素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	异补骨脂素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
081005	11.43	6.581	0.988	0.901
090912	11.89	6.006	0.914	0.852
090911	11.01	6.693	0.954	0.892

3 讨论

3.1 流动相的选择

曾选择乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-水等流动相系统进行等度及梯度洗脱，由于存在干扰峰，保留时间过长，峰型拖尾等因素的影响，最后选择乙腈-水系统的流动相进行梯度洗脱，各峰分离度均大于 1.5，峰型对称。

3.2 波长选择

淫羊藿苷和朝藿定 C 的最大吸收波长是 270 nm^[6],

补骨脂素、异补骨脂素的最大吸收波长是 246 nm^[6], 实验证明波长 250 nm 时淫羊藿苷、朝藿定 C、补骨脂素、异补骨脂素均具有较好的响应，方法学考察结果证明该波段下实验方法精密、稳定、准确。

3.3 提取溶剂和方法的选择

朝藿定 C、淫羊藿苷是黄酮类化合物，补骨脂素、异补骨脂素是香豆素类化合物，易溶于醇类溶剂。实验比较了甲醇、乙醇及 90%、70%、50%乙醇 5 种提取溶剂，考察了加热回流提取和超声提取两种方式，以及提取时间和溶剂体积等，试验结果表明加入 50 mL 70%乙醇溶液超声提取 30 min 的提取条件下各指标成分提取完全、方法简便。

参考文献

- [1] 唐卡毅. 仙灵骨葆防治骨质疏松症的研究进展 [J]. 重庆医学, 2009, 38(12): 1535-1537.
- [2] 周春燕, 王正俊, 严晓星. 仙灵骨葆颗粒的质量标准研究 [J]. 安徽医药, 2008, 12(1): 16-17.
- [3] 伍庆, 周宁, 冯泽熹, 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.
- [4] 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.
- [5] 王玉萍, 郭宝林. 仙灵骨葆胶囊中总黄酮及淫羊藿苷的含量测定 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 741-742.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2010.