

HPLC 法测定更年期乐片中朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷 VI 和大花双参苷 A

陆佳贇¹, 何胜利^{2*}

1. 解放军第 101 医院 药剂科, 江苏 无锡 214044

2. 遂成药业股份有限公司, 河南 新乡 451150

摘要: 目的 建立多波长 HPLC 梯度洗脱法同时测定更年期乐片中朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷 VI 和大花双参苷 A 的方法。方法 依利特 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 270 nm (朝藿定 C 和淫羊藿苷)、210 nm (川续断皂苷 VI)、230 nm (大花双参苷 A); 体积流量为 1.2 mL/min; 柱温为室温; 进样量 20 μL。结果 朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷 VI 和大花双参苷 A 分别在 7.14~142.80 μg/mL ($r=0.9998$)、5.64~112.80 μg/mL ($r=0.9996$)、6.35~127.00 μg/mL ($r=0.9995$)、7.90~158.00 μg/mL ($r=0.9993$) 与其峰面积呈良好的线性关系; 朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷 VI 和大花双参苷 A 的平均回收率分别为 99.24%、96.93%、97.81%、98.32%, RSD 值分别为 1.28%、0.94%、1.24%、1.50%。结论 该方法是一种快速、灵敏、准确的分析方法, 可作为更年期乐片的质量控制方法。

关键词: 更年期乐片; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 川续断皂苷 VI; 大花双参苷 A; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)04-0395-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.04.010

Determination of epimedin C, icariin, asperosaponin VI, and triplostoside A in Gengnianle Tablets by HPLC

LU Jia-yun¹, HE Sheng-li²

1. Department of pharmacy, The No.101 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuxi 214044, China

2. Suicheng Pharmacy Co., Ltd, Xinzhen 451150, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for the simultaneous determination of epimedin C, icariin, asperosaponin VI, and triplostoside A in Gengnianle Tablets. **Methods** The analysis was performed on Elite C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as mobile phases at the flow rate of 1.2 mL/min for gradient elution. Detection with variable wavelength was used, and set at 270 nm for epimedin C and icariin, 210 nm for asperosaponin VI, and 230 nm for triplostoside A. The column temperature was room temperature with injection volume of 20 μL. **Results** Epimedin C, icariin, asperosaponin VI, and triplostoside A had good linearity in the ranges of 7.14—142.80 μg/mL ($r = 0.9998$), 5.64—112.80 μg/mL ($r = 0.9996$), 6.35—127.00 μg/mL ($r = 0.9995$), and 7.90—158.00 μg/mL ($r = 0.9993$), respectively. The average recoveries were 99.24%, 96.93%, 97.81%, and 98.32% with RSD 1.28%, 0.94%, 1.24%, and 1.50%, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive, and accurate, which can be used in quantity control for Gengnianle Tablets.

Key words: Gengnianle Tablets; epimedin C; icariin; asperosaponin VI; triplostoside A; HPLC

更年期乐片处方出自《卫生部药品标准中药成方制剂》第十五册, 由淫羊藿、续断、牡蛎、知母、金樱子、黄柏、车前子、人参、桑椹、当归、核桃仁、鹿茸、补骨脂、首乌藤、白芍、首乌(制)、牛膝、甘草、熟地黄 19 味中药组成, 具有养心养肾、调补冲任的功效, 用于更年期出现的夜寐不安、心

悸、耳鸣、多疑善感、烘热汗出、烦躁易怒、腰背酸痛等^[1-2]。原标准未对方中相关物质进行定量。邹济高等^[3]仅对方中人参、首乌、淫羊藿、白芍进行了定性研究, 而定性的标准并不能有效地控制该方的质量和疗效。季婷婷等^[4]也仅对方中所含的淫羊藿进行了测定研究, 不能有效控制该复方制剂的

收稿日期: 2015-01-29

作者简介: 陆佳贇 (1982—), 男, 药师, 执业药师, 从事医院药学研究工作。Tel: (0510) 85142254 E-mail: lujiayunxs@163.com

*通信作者 何胜利, 工程师, 从事药品生产和质量控制研究工作。Tel: (0371) 62599489

质量和疗效。淫羊藿和续断为方中的主要药味,因此本实验采用高效液相色谱(HPLC)梯度洗脱法对更年期片中淫羊藿所含朝藿定 C、淫羊藿苷和续断所含川续断皂苷VI、大花双参苷 A 开展测定研究,为改进更年期片制剂质量标准提供可行性方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

美国安捷伦 1200 型 HPLC 色谱仪,包括脱气机、四元泵、自动进样器、可变波长检测器、Chemstation 色谱工作站;VS-100UE 恒温超声波提取机(无锡沃信仪器有限公司)。

1.2 试药

大花双参苷 A 对照品(批号 JOT-10893,质量分数 98.0%)购于成都普菲德生物技术有限公司;朝藿定 C 对照品(批号 111780-200801,质量分数 100.0%)、淫羊藿苷对照品(批号 110737-200415,质量分数 100.0%)、川续断皂苷VI(批号 111685-201305,质量分数 91.3%)均购于中国食品药品检定研究院;更年期片(规格 0.35 g/片,批号分别为 140601、140701、140703)购于吉林吉春制药股份有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂);磷酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

依利特 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱^[5-7]: 0~20 min, 30.0% A; 20~36 min, 30.0%→50.0% A; 36~44 min, 50.0% A→30.0% A; 检测波长: 270 nm^[8-9](0~20 min, 朝藿定 C 和淫羊藿苷)、210 nm^[10-11](20~28 min, 川续断皂苷VI)、230 nm^[12](28~44 min, 大花双参苷 A); 体积流量为 1.2 mL/min; 柱温为室温; 进样量 20 μL。此系统条件下所测组分与其他组分分离效果良好,理论塔板数按大花双参苷 A 计不得低于 3 000,分离度均大于 2.0。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别称取朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI和大花双参苷 A 对照品适量,置于 4 个 20 mL 量瓶中,加甲醇溶解并加至刻度,即得质量浓度分别为 0.714、0.564、0.635、0.790 mg/mL 的对照品母液,备用。分别吸取上述对照品母液 7.5、5.0、6.0、1.5 mL 置于同一个 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并加至

刻度,摇匀,即得朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI、大花双参苷 A 质量浓度分别为 107.1、56.4、76.2、23.7 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取更年期片适量,剪碎,取 1.0 g,并精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入精密吸取的甲醇 50 mL,称定总质量并记录,于 200 W 频率 20 kHz 超声下,处理 30 min,取出自然冷却,再次称定总质量,缺失部分以甲醇补充,摇匀,0.45 μm 滤头滤过,取续滤液,即得,备用。

2.4 阴性样品溶液的制备

按照更年期片处方中各药比例,称取缺淫羊藿的其余药味、缺续断的其余药味各 1 份,分别制备与更年期片工艺一致的阴性样品,按照供试品溶液的制备项下方法处理,制备缺淫羊藿和续断的阴性溶液。

2.5 专属性试验

分别精密吸取更年期片供试品溶液、对照品溶液和阴性样品溶液 20 μL,进行测定,结果朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI、大花双参苷 A 对照品色谱图相应的保留时间处与供试品溶液色谱图有相同的吸收峰;但缺淫羊藿阴性样品溶液中未显示朝藿定 C、淫羊藿苷色谱吸收峰;缺续断的阴性样品溶液色谱图中未显示川续断皂苷VI、大花双参苷 A 吸收峰,见图 1。

2.6 线性关系考察

分别精密吸取同对照品母液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,将吸取溶液分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并加至刻度,摇匀。进样测定,通过图谱获得相应峰面积,并根据各对照品质量浓度得回归方程。朝藿定 C: $A=70\ 516 C-501.5$, $r=0.999\ 8$, 线性范围为 7.14~142.80 μg/mL; 淫羊藿苷: $A=31\ 524 C+307.1$, $r=0.999\ 6$, 线性范围为 5.64~112.80 μg/mL; 川续断皂苷VI: $A=29\ 813+291.2$, $r=0.999\ 5$, 线性范围为 6.35~127.00 μg/mL; 大花双参苷 A: $A=15\ 619 C+301.4$, $r=0.999\ 3$, 线性范围为 7.90~158.00 μg/mL。

2.7 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL 进行分析测定,连续重复进样 6 次,分别测定 4 种成分的峰面积,计算得朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI、大花双参苷 A 峰面积的 RSD 值分别为 0.46%、1.12%、0.73%、1.25%。

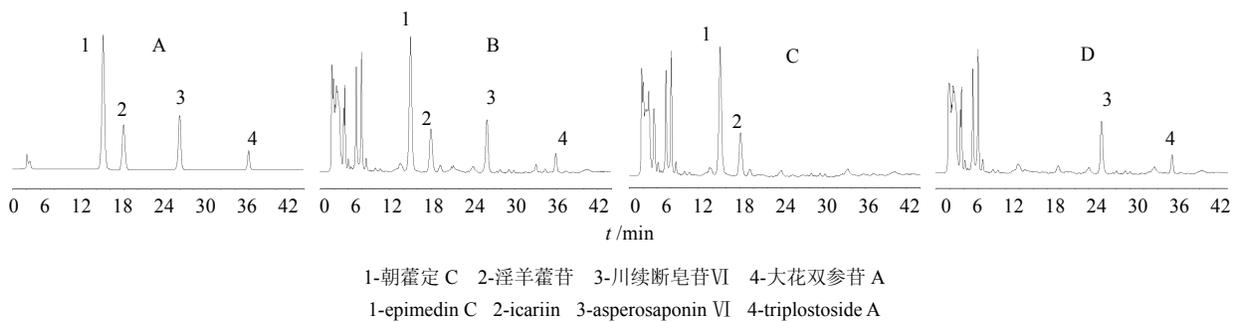


图1 对照品(A)、更年期乐片(B)、缺续断阴性样品(C)和缺淫羊藿阴性样品(D)的HPLC图谱
 Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), Gengnianle Tablets (B), sample without *Dipsaci Radix* (C), and sample without *Epimedii Herba* (D)

2.8 重复性试验

称取适量批号140701更年期乐片样品6份,制备供试品溶液,进样测定,计算得朝藿定C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI、大花双参苷A质量分数的RSD值分别为0.79%、1.04%、1.15%、0.57%。

2.9 稳定性试验

取批号140701更年期乐片样品,制备供试品溶液,分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h,进样测定,计算得朝藿定C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI、大花双参苷A峰面积的RSD值分别为0.75%、0.98%、0.85%、1.21%,结果表明24 h内更年期乐片供试品溶液具有良好的稳定性。

2.10 回收率试验

称取批号140701更年期乐片样品(含朝藿定C

为5.37 mg/g、淫羊藿苷2.84 mg/g、川续断皂苷VI 3.83 mg/g、大花双参苷A为1.19 mg/g)适量,剪碎,取0.5 g,精密称定,置50 mL具塞锥形瓶中,精密加入混合对照品溶液2.5 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算各组分回收率,结果朝藿定C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI、大花双参苷A平均回收率分别为99.24%、96.93%、97.81%、98.32%,RSD值分别为1.28%、0.94%、1.24%、1.50%。

2.11 样品测定

取不同批号的更年期乐片样品,制备供试品溶液,进样测定,用外标法计算样品中朝藿定C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI、大花双参苷A的质量分数,结果见表1。

表1 更年期乐片中朝藿定C、淫羊藿苷、川续断皂苷VI和大花双参苷A的测定结果(n=3)

Table 1 Determination of epimedinin C, icariin, asperosaponin VI, and triplastoside A in Gengnianle Tablets (n = 3)

批号	朝藿定C		淫羊藿苷		川续断皂苷VI		大花双参苷A	
	均值/(片·mg ⁻¹)	RSD/%						
140601	1.82	1.28	0.972	1.08	1.28	1.05	0.409	0.49
140701	1.88	0.92	0.994	0.58	1.34	0.72	0.416	1.08
140703	1.98	1.55	0.981	0.82	1.38	0.85	0.425	1.67

3 讨论

实验中考察了不同溶剂、提取方法对指标成分提取效果的影响。分别以甲醇、50%甲醇、乙醇为提取溶剂对样品进行对比研究,结果表明甲醇提取明显优于50%甲醇和乙醇的提取效率;同时在功率200 W 频率20 kHz的超声波条件下,超声处理15、30、45 min进行考察,结果表明,超声提取30 min和超声提取45 min提取结果相差不大,同时所测指

标成分均明显高于超声提取15 min。故采用超声提取(功率200 W,频率20 kHz)30 min作为供试品溶液的提取方法。

更年期综合症是一种常见病、多发病。徐辉^[14]采用更年期乐片对随机选取的100例更年期女性患者进行临床效果观察,结果100例患者中显效47例,有效42例,无效11例,总有效率89%,表明更年期乐片能有效地改善更年期综合症症状。朝藿定C、

淫羊藿苷为淫羊藿中主要活性成分^[14], 川续断皂苷 VI、大花双参苷 A 为续断中主要有效成分, 本研究对更年乐片中 4 个有效成分进行了 HPLC 测定, 通过该方法能定量控制产品质量, 并达到可控的临床效果, 实验研究结果表明该定量方法能快速、灵敏、准确地测定更年乐片中朝藿定 C、淫羊藿苷、川续断皂苷 VI 和大花双参苷 A。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 国家药品标准中药成方制剂第十五册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 92.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 306-308, 309-310, 附录 30, 附录 36.
- [3] 邹济高, 朱 军, 陶 玉. 更年乐片质量标准研究 [J]. 基层中药杂志, 2000, 14(3): 16-17.
- [4] 季婷婷, 柳立新. 高效液相色谱法测定更年乐片中淫羊藿苷的含量 [J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2009, 8(5): 93-94.
- [5] 刘京晶, 郭宝林, 黄文华, 等. HILIC-HPLC 测续断药材中多种皂苷含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 2367-2371.
- [6] 穆建国, 甘惠仍, 贾宪生. HPLC 测定骨松宝颗粒中淫羊藿苷和朝藿定 C 的含量 [J]. 中国执业药师, 2014, 11(6): 27-30.
- [7] 吴 彦, 孟冬玲, 田兆福, 等. LC/ESI/MS 方法测定卷烟及烟气中的淫羊藿苷、淫羊藿定 C [J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(5): 701-705.
- [8] 袁 佳, 钱冬女, 滕 俊. HPLC 法测定不同产地淫羊藿饮片中淫羊藿苷的含量 [J]. 海峡药学, 2014, 26(5): 56-57.
- [9] 左建平, 安显辉. 不同采收季节的淫羊藿中朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量比较 [J]. 中国药业, 2014, 23(7): 13-15.
- [10] 夏立武, 唐晓霞, 刘亚军, 等. HPLC 测定熟参益气止血颗粒中川续断皂苷 VI 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 941-943.
- [11] 吴春蕾, 李厚聪, 张志锋, 等. LC-MS 测定两种来源续断中的川续断皂苷 VI [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(6): 738-740.
- [12] 张吉发, 肖 峰, 罗 鸿, 等. 川续断中大花双参苷 A 含量的反相高效液相色谱法测定 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(3): 539-540.
- [13] 徐 辉. 更年乐片治疗更年期综合症的临床观察 [J]. 海南医学, 2003, 14(12): 73-74.
- [14] 周 岚, 乙 引, 伍 庆, 等. 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 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1998-2000.