

HPLC 法测定仙灵骨葆胶囊中川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素

龚琴丹¹, 陈宗良², 陈桂茜²

1. 金华市婺城区食品药品监督管理局, 浙江 金华 321000

2. 金华市食品药品检验检测研究院, 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川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的定量测定方法。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: 川续断皂苷 VI 为 212 nm, 补骨脂素、异补骨脂素为 246 nm。结果 3 种成分均能达到基线分离, 川续断皂苷 VI 的进样量在 144.1~5 764.0 ng ($r=0.999\ 6$)、补骨脂素在 5.4~215.2 ng ($r=0.998\ 0$)、异补骨脂素在 6.6~265.6 ng ($r=0.998\ 5$) 与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 98.11%、97.86%、98.22%, RSD 均小于 2.0%。结论 建立的方法操作简便、分离良好、数据准确、灵敏度高、工作效率好, 可用于仙灵骨葆胶囊的多指标成分定量测定。

关键词: 多波长 HPLC 法; 仙灵骨葆胶囊; 川续断皂苷 VI; 补骨脂素; 异补骨脂素; 定量测定

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)16-2868-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.015

Determination of asperosaponin VI, psoralen, and angelicin in Xianling Gubao Capsule by HPLC

GONG Qin-dan¹, CHEN Zong-liang², CHEN Gui-qian²

1. Jinhua Wucheng City Food and Drug Administration, Jinhua 321000, China

2. Jinhua Institute for Food and Drug Control, Jinhua 321000, China

Abstract: Objective To determine asperosaponin VI, psoralen, and angelicin in Xianling Gubao Capsules (XGC) 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 asperosaponin VI was set at 212 nm, those for psoralen and angelicin were set at 246 nm. **Results** Three components reached baseline separation, the linearity was good when sample volumes were in the ranges of 144.1—5 764.0 for asperosaponin VI ($r = 0.999\ 6$), 5.4—215.2 ($r = 0.998\ 0$) for psoralen, and 6.6—265.6 ng ($r = 0.998\ 5$) for angelicin. The average recoveries of asperosaponin VI, psoralen, and psoralen were 98.11%, 97.86%, and 98.22%, respectively. The RSDs of recoveries were all less than 2.0%. **Conclusion** The method is simple and accurate and has good separation, with high sensitivity and good efficiency for the determination of more-index components in XGC.

Key words: multi-wavelength HPLC method; Xianling Gubao Capsule; asperosaponin VI; psoralen; angelicin; quantitative determination

仙灵骨葆胶囊 (Xianling Gubao Capsule, XGC) 是具有贵州特色的苗药, 主要用于治疗老年骨质疏松的中药制剂^[1], 收载于《国家中成药标准汇编·骨伤科分册》, 由淫羊藿、续断、补骨脂、丹参、知母和地黄 6 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^[2]。方中以淫羊藿补肾壮阳为君药, 续断补肝肾、强筋骨、调血脉、续折伤, 补骨脂温阳补肾共为臣药, 目前文献多以淫羊藿苷、朝

藿定 C 等进行定量研究并控制该制剂质量, 或以川续断皂苷 VI、补骨脂素等分别进行研究^[3-9]。为更有效控制该制剂质量, 本实验采用多波长 HPLC 法同时测定 3 种有效成分川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素, 该方法操作简便、分离度良好, 为该品种质量标准提高提供参考。

1 仪器与材料

安捷伦 1200 型高效液相色谱仪, 包括 VWD、DAD, 美国 Agilent 公司; XS105Du 十万分之一电

收稿日期: 2016-04-06

作者简介: 龚琴丹 (1983—), 女, 本科, 研究方向为中药质量控制与监管。E-mail: 183608783@qq.com

子天平, Mettler Toledo 仪器有限公司; DS-350L 超声波萃取仪, 福州德森精工有限公司; 密里博 DQ5 超纯水制水机, Merck Millipore 公司。

甲醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 超纯水自制; 乙腈, 色谱纯, 默克公司。川续断皂苷 VI(批号 111685-200802, 以质量分数 92.5%计)、补骨脂素(批号 110739-201115, 以质量分数 99.3%计)、异补骨脂素(批号 110738-201012, 以质量分数 100%计), 均由中国食品药品检定研究院提供。仙灵骨葆胶囊, 批号 1505028、1406053、1504051、1505024、1407016, 贵州同济堂制药有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为月旭 Ultimate[®] XB-C₁₈ 柱(250 mm×4.5 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~30 min, 5%~60%乙腈; 30~35 min, 60%~80%乙腈; 35~40 min, 80%乙腈; 40~45 min, 80%~5%乙腈; 检测波长: 0~23 min, 212 nm; 24~45 min, 246 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C。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 对照品溶液的制备

精密称取川续断皂苷 VI 15.58 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 A 贮备液; 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 B 贮备液。再精密量取 A 贮备液 5 mL、B 贮备液 1 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

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, 称定质量, 超声处理(功率 140 W, 频率 42 kHz) 45 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方比例及制法制备不含续断及补骨脂的粉末, 按“2.3”项方法提取, 制备阴性对照溶液, 按上述色谱条件测定。结果阴性对照分别在川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素相应的保留时间无干扰, 见图 1。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 0.5、1、2、5、10、20 μL, 按上述色谱条件进样测定, 以峰面积为

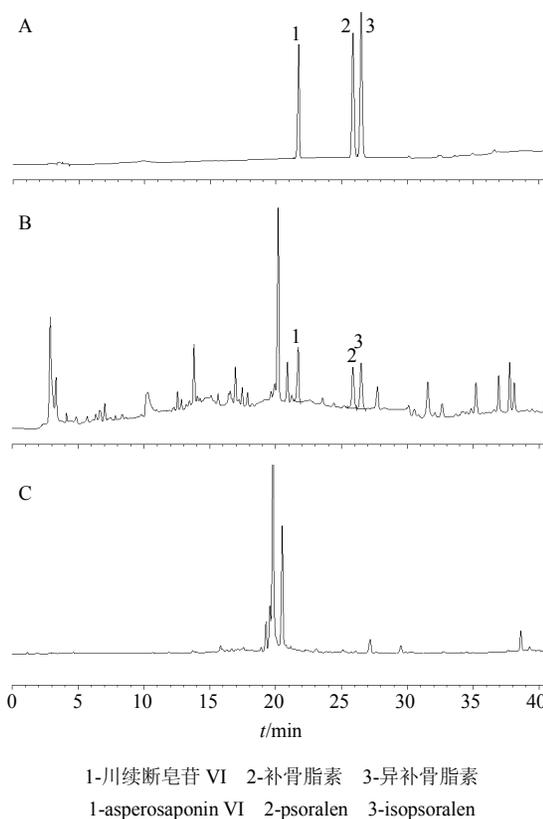


图 1 对照品 (A)、仙灵骨葆胶囊样品 (B) 和阴性对照 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of reference substances (A), XGC samples (B), and negative control (C)

纵坐标 (Y), 以各指标成分的进样量为横坐标 (X) 绘制回归曲线, 得回归方程分别为川续断皂苷 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 $Y=8 403.5 X+3.068, r=0.998 5$; 结果表明川续断皂苷 VI 进样量在 144.1~5 764.0 ng、补骨脂素在 5.4~215.2 ng、异补骨脂素在 6.6~265.6 ng 与峰面积呈良好线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取对照品溶液 5 μL, 连续进样 6 次, 按“2.1”项色谱条件分别计算峰面积的 RSD, 结果川续断皂苷 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%, 表明其进样精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一样品(批号为 1505028), 按“2.3”项下方法制备, 室温下放置, 分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 测定, 结果川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的 RSD 分别为 1.29%、1.65%、1.94%, 结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

称取同一样品(批号为 1505028)6 份,按“2.3”项下方法同法制备成供试品溶液,按“2.1”项色谱条件测定,结果川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的 RSD 分别为 1.87%、2.05%、2.14%,表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已测定的同批号样品(批号为 1505028)9 份,每份约 0.5 g,分别加入 A 贮备液 1、3、5 mL, B 贮备液 1、2、3 mL,再精密加入甲醇 50 mL,按“2.3”项下方法制备测定溶液,按“2.1”项色谱条件测定,结果川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素平均回收率分别为 98.11%、97.86%、98.22%,RSD 分别为 1.29%、0.93%、1.07%。

2.10 样品测定结果

取各批次样品,按“2.3”项下方法制备样品溶液,重复 3 次,进行测定,结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of samples ($n=3$)

样品批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	川续断皂苷 VI	补骨脂素	异补骨脂素
1505028	8.62	0.63	0.69
1406053	7.16	0.89	0.93
1504051	9.31	0.76	0.78
1505024	8.26	0.81	0.93
1407016	8.94	0.79	0.86

3 讨论

3.1 流动相及梯度洗脱程序的选择

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实验,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、峰形、分离度等因素,选择了本实验中乙腈-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、峰形良好,45 min 后基本无其他杂峰,能为川续断皂苷 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 400~200 nm 进行扫描,结果检测波长川续断皂苷 VI 在 212 nm、补骨脂素及异补骨脂素在 246 nm 处有最大吸收。另按“2.1”项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 23 min 变换检测波长为 246 nm。采用了 Zorbax SB-C₁₈ 柱、岛津 ODS-VP C₁₈、菲罗门 Luna-C₁₈ 柱进行实验,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

根据检测指标成分溶解性并参照文献方法^[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提取效果,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,文献报道的多指标成分研究^[7]也是 2 个系统分别控制续断及补骨脂的检测方法,为了提高效率、节约能源,本研究用一个系统对多指标成分进行测定,即能显著地提高效率,又可减少有机溶剂的使用,为更好地控制其质量提供参考,今后将进一步研究一测多评法,节约对照品,更好地节约能源。

参考文献

- [1] 龙千里,姬芝栩,龙征忠,等.仙灵骨葆治疗绝经后骨质疏松性 Colles 骨折的临床观察[J].药物评价研究,2016,39(2):254-258.
- [2] 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.
- [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] 吴春园,王俊,高锦飏.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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.