

一测多评法在仙灵骨葆胶囊中多成分检测的应用研究

吕晓霞¹, 陈宗良², 陈桂茜², 陈捷²

1. 金华市金东区市场监督管理局, 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** 采用一测多评法同时测定仙灵骨葆胶囊中5种成分。**方法** 以淫羊藿苷为基准, 建立仙灵骨葆胶囊中该成分与朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的相对校正因子, 利用相对校正因子分别计算其量, 同时对一测多评法的计算值与外标法实测值进行比较, 并用不同色谱柱考察相对保留时间及计算量, 评价一测多评法在仙灵骨葆胶囊中应用的可行性和准确性。**结果** 建立了仙灵骨葆胶囊中多成分一测多评的定量控制方法, 外标法各成分的进样量淫羊藿苷在 8.2~328.0 ng ($r=0.999\ 5$)、朝藿定 C 在 0.055 6~2.224 0 μg ($r=0.999\ 6$)、川续断皂苷 VI 在 0.144 1~5.764 0 μg ($r=0.999\ 6$)、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 ($r=0.998\ 5$) 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%; 并采用夹角余弦法对一测多评计算值与外标实测值进行评价, 结果无显著性差异。**结论** 采用基于相对保留时间定位和相对校正因子计算的一测多评法既能利用一种对照品同时测定多成分的量, 节约对照品, 又能适合多指标质量评价模式的要求, 提高工作效率。

关键词: 一测多评; 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; 校正因子

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)24-4374-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.014

A quantitative method using one marker for assay of multi-components in Xianling Gubao Capsule

LV Xiao-xia¹, CHEN Zong-liang², CHEN Gui-qian², CHEN Jie²

1. Market Supervision Administration of Jindong District of Jinhua, Jinhua 321000, China

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

Abstract: Objective To investigate the positioning based on the relative retention time of fingerprinting and to establish a new quality evaluation method for traditional Chinese medicine preparations, using one chemical reference substance to calculate multi-components simultaneously. **Methods** Employed icariin as the maker component, icariin relative correction factors (RCF) of epimedin C to icariin, asperosaponin VI to icariin, psoralen to icariin and angelicin to icariin were calculated in the chromatographic conditions for determination of the four components in Xianling Gubao Capsule (XGC). The contents of icariin were determined by external standard method, and those of epimedin C, asperosaponin VI, psoralen and angelicin were calculated by icariin and their RCF. The accuracy of the new method was evaluated by comparing the relative retention times and calculating the content which using different brands columns for determination. **Results** The analysis methods were established, the linearity was good when sample volume was in the range of at 8.2—328.0 ng for icariin ($r=0.999\ 5$), 0.055 6—2.224 μg for epimedin C ($r=0.999\ 6$), 0.144 1—5.764 μg for asperosaponin VI ($r=0.999\ 6$), 5.4—215.2 ng ($r=0.998\ 0$) for psoralen, 6.6—265.6 ng ($r=0.998\ 5$) for angelicin. The average recoveries of asperosaponin VI, psoralen and psoralen were 97.59%, 98.58%, 98.11%, 97.86%, 98.22%, respectively. The RSDs of recovery were all less than 2.0%; There has been no significant difference between the calculated contents and the determined contents, according to the angle cosine value. **Conclusion** The method can control the components without providing epimedin C, asperosaponin VI, psoralen, and angelicin reference. The method is not only save reference substance and medicine resources, but also suitable quality evaluation pattern for TCM preparation. This new method made fingerprinting more meaningful in TCM quality control.

收稿日期: 2016-06-09

基金项目: 金华市科技局科技项目 (2015-3-031)

作者简介: 吕晓霞 (1978—), 女, 主管药师, 从事中药及中成药质量控制与监管。Tel: (0579)82911307 15867943123 E-mail: 15867943123@163.com

Key words: quantitative analysis of multi-components by single marker; Xianling Gubao Capsule; icariin; epimedin C; asperosaponin VI; psoralen; angelicin; relative correction factors (RCF)

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,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^[1-2]。方中以淫羊藿补肾壮阳为主药,续断补肝肾、强筋骨、调血脉、续折伤,补骨脂温阳补肾共为辅药,目前文献多以淫羊藿苷、朝藿定C等进行定量研究并控制,或以川续断皂苷VI、补骨脂素等分别进行研究^[3-10],从传统的中医药观点来看,单一指标成分的控制难以真正体现中药的功效,尤其是复方制剂,检测任何一种指标成分均不能反映其整体疗效^[11-12]。多成分测定是发展趋势,一测多评^[13-16]、内标多控^[17-18]及多指标成分定量^[19-20]等已多有报道。因此,本实验探讨基于指纹图谱的相对保留时间定位的一测多评法在XGC中多成分检测,并对其进行科学评价,为该品种多指标质量评价提供参考。

1 仪器与试药

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,国药集团化学试剂有限公司;乙腈,色谱纯,默克化工技术(上海)有限公司;超纯水自制。

对照品淫羊藿苷(批号110737-200415,质量分数按100%计)、朝藿定C(批号111780-200801,质量分数按99.1%计)、川续断皂苷VI(批号111685-200802,质量分数按92.5%计),补骨脂素(批号110739-201115,质量分数按99.3%计),异补骨脂素(批号110738-201012,质量分数按100%计),均由中国食品药品检定研究院提供。XGC,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 方法原理^[9]

设样品中淫羊藿苷的峰面积为 A_Y ,浓度为 C_Y ,

则 $f_Y=A_Y/C_Y$ 。样品中朝藿定C与淫羊藿苷的相对校正因子为 $f=f_Y/f_C=A_Y C_C/(A_C C_Y)$ 。由此,可得朝藿定C定量计算公式: $C_C=f A_C C_Y/A_Y$ 。式中 A_C 为朝藿定C峰面积, C_C 为质量浓度。其他组分川续断皂苷VI、补骨脂素、异补骨脂素的校正因子以此类推计算即得。

2.2 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;柱温25℃。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。

2.3 对照品溶液的制备

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贮备液;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贮备液;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D贮备液。再精密量取A贮备液1 mL、B贮备液2.5 mL、C贮备液5 mL、D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。

2.4 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。

2.5 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“2.4”项同法提取,得阴性对照溶液,按“2.2”项色谱条件测定。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处无干扰,见图1。

2.6 外标法方法学验证

2.6.1 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液

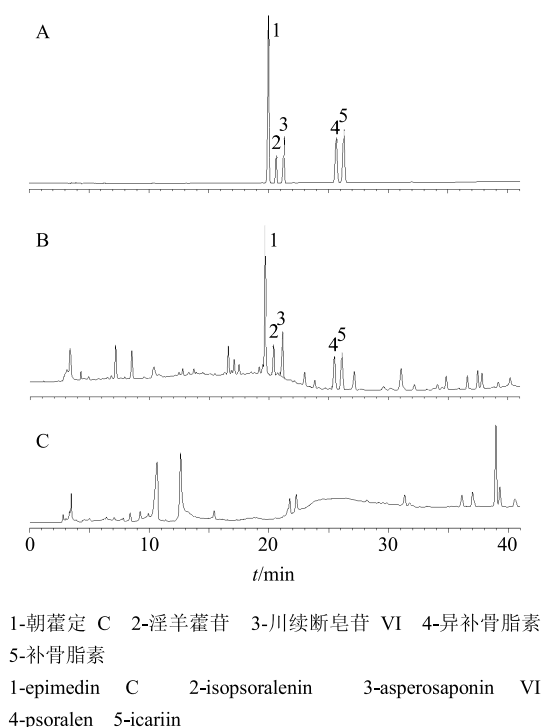


图1 混合对照品 (A)、XGC 样品 (B) 和阴性对照 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), XGC sample (B), and blank sample (C)

0.5、1、2、5、10、20 μL ，按上述色谱条件进样测定，以峰面积为纵坐标 (X)，以各指标成分的量作为横坐标 (Y) 绘制标准曲线，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 8.2~328.0 ng、朝藿定 C 在 0.055 6~2.224 0 μg 、川续断皂苷 VI 在 0.144 1~5.764 0 μg 、补骨脂素在 5.4~215.2 ng、异补骨脂素在 6.6~265.6 ng 呈良好线性关系。

2.6.2 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 RSD，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。

2.6.3 稳定性试验 取同一供试品（批号为 1505028），按“2.4”项下方法制备供试品溶液，室温下放置，分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 测定

峰面积，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峰面积的 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。

2.6.4 重复性试验 称取同一供试品（批号为 1505028）6 份，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项色谱条件测定，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峰面积的 RSD 分别为 2.18%、1.96%、1.87%、2.05%、2.14%，表明该方法重复性良好。

2.6.5 回收率试验 精密称取已测定的同批号供试品（批号为 1505028）6 份（2 份 1 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“2.4”项下方法制备成供试品溶液，供回收率试验用，按“2.2”项色谱条件测定，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%。

2.7 相对校正因子计算

以淫羊藿苷为基准峰，按“2.1”项下公式分别计算淫羊藿苷对朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素及异补骨脂素的相对校正因子见表 1。

2.8 待测组分色谱峰的定位与计算

取上述混合对照品溶液，按上述色谱条件考察在 4 支不同品牌色谱柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μm ）上的色谱行为，以淫羊藿苷为参照峰，测得朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素、异补骨脂素的相对保留时间及相对校正因子见表 2。一测多评法定位以淫羊藿苷峰保留时间为参照，计算朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素、异补骨脂素的相对保留时间，其相对保留时间应分别在 0.98、1.04、1.26、1.31 的 $\pm 5\%$ 范围之内；各成分量以淫羊藿苷峰的峰面积为对照，分别乘以相对校正因子 1.07、10.09、0.24、0.24 计算朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素、异补骨脂素的量。

2.9 样品测定结果

取 5 批供试品按“2.4”项制备而成的供试品溶液和混合对照品溶液各 5 μL ，按上述色谱条件测定，分别采用一测多评法和外标法计算 5 种成分量，采用夹角余弦法计算相似度均大于 0.999 7，表明 2 种方法测定量没有显著性差异，结果见表 3。

表 1 相对校正因子
Table 1 Relative correction factors (RCF)

进样体积/ μL	相对校正因子				
	淫羊藿苷	朝藿定 C	川续断皂苷 VI	异补骨脂素	补骨脂素
0.5	1.00	1.04	9.83	0.22	0.22
1	1.00	1.08	9.96	0.22	0.23
2	1.00	1.09	10.02	0.22	0.22
5	1.00	1.02	9.85	0.22	0.22
10	1.00	1.06	10.49	0.22	0.23
20	1.00	1.10	10.25	0.23	0.23
平均值		1.06	10.07	0.22	0.23
RSD/%		2.92	2.56	2.69	2.59

表 2 不同色谱柱测得的相对保留时间及相对校正因子
Table 2 RRT and RCF of different brands columns

色谱柱	相对保留时间				相对校正因子			
	朝藿定 C	川续断皂苷 VI	异补骨脂素	补骨脂素	朝藿定 C	川续断皂苷 VI	异补骨脂素	补骨脂素
月旭 Ultimate [®] XB-C ₁₈ 柱	0.97	1.03	1.24	1.28	1.06	10.07	0.22	0.23
岛津 Shim-pack ODS-VP C ₁₈ 柱	1.01	1.09	1.31	1.37	1.10	10.11	0.23	0.24
菲罗门 Luna-C ₁₈ 柱	0.95	1.01	1.21	1.27	1.01	10.03	0.25	0.23
安捷伦 Zorbax SB-C ₁₈ 柱	0.99	1.04	1.27	1.32	1.12	10.13	0.24	0.25
平均值	0.98	1.04	1.26	1.31	1.07	10.09	0.24	0.24
RSD/%	2.63	3.26	3.40	3.47	4.53	0.44	5.49	4.03

表 3 样品定量测定结果
Table 3 Content determination of sample

样品批号	淫羊藿苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	朝藿定 C/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		川续断皂苷 VI/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		补骨脂素/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		异补骨脂素/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	
		外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
1505028	1.43	7.22	7.17	8.62	8.57	0.63	0.61	0.69	0.66
1406053	1.01	6.79	6.83	7.16	7.21	0.89	0.85	0.93	0.90
1504051	1.37	7.88	7.81	9.31	9.25	0.76	0.73	0.78	0.74
1505024	1.10	7.38	7.47	8.26	8.29	0.81	0.79	0.93	0.98
1407016	0.91	6.07	6.17	8.94	9.01	0.79	0.76	0.86	0.90

3 讨论

续断、补骨脂为温阳补肾、强筋健骨的要药，在 XGC 处方中起到滋补肝肾、接骨续筋、强筋健骨的作用，谢琴等^[10]采用多指标成分 2 个系统分别控制续断及补骨脂的检测方法，为提倡效率、节约能源，本研究用 1 个系统对多指标成分进行测定，即能显著地提高效率，又可节约有机溶剂，并进一步研究了一测多评法的应用，即节约了对照品，更好地节约能源，又能发挥中药质量控制多指标质量评价等技术来体现中药整体性的作用，更好地控制

其质量。

本实验通过不同色谱柱的考察计算确定了朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素、异补骨脂素与淫羊藿苷的相对保留时间及相对校正因子，借鉴中药色谱指纹图谱进行相似度评价常用的夹角余弦算法评价一测多评法计算的量与外标法测定的量之间的差异性，结果表明无显著性差异，表明本方法具有很好的可行性和准确性。一测多评法确定的朝藿定 C、川续断皂苷 VI、补骨脂素、异补骨脂素的相对保留时间分别在 0.98、1.04、1.26、1.31 的 $\pm 5\%$ 范

围之内, 相对校正因子分别为 1.07、10.09、0.24、0.24, 可为 XGC 一测多评法同时计算 5 组成的量提供参考。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局国家药品标准 [S]. WS-10269 (ZD-0269)-2002-2011Z.
- [2] 刘光勇, 易泽洪, 杨国奇, 等. 仙灵骨葆胶囊联合伊班膦酸钠注射液和碳酸钙 D3 治疗老年骨质疏松的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(7): 1067-1070.
- [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] 龚琴丹, 陈宗良, 陈桂茜. 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 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2868-2870.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [12] 丰加涛, 金郁, 王金成, 等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 180-185.
- [13] 张婷, 郑夺, 王文彤, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在参芎养心颗粒质量评价中的应用研究 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1920-1925.
- [14] 杨艳模. 一测多评技术在银杏叶提取物及金鸡制剂中的应用研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [15] 汪丽君, 刘淑敏, 毛春芹, 等. 一测多评法同时测定五味子中 8 个木脂素类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(7): 1191-1197.
- [16] 陈凯, 李慧, 王佳奇, 等. 基于一测多评法研究配伍比例及 pH 值环境对黄连-大黄配伍后 4 种生物碱成分溶出的变化规律 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1709-1713.
- [17] 王跃生, 饶毅, 魏惠珍, 等. HPLC-“内标”多控法测定四逆散中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1316-1319.
- [18] 陈燕军, 余琦, 饶毅, 等. 内标多控法测定枳实中黄酮类成分及其不确定度评定研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(1): 39-44.
- [19] 曲蕃升. 栀子金花丸多指标成分 HPLC 含量测定方法研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2015.
- [20] 陈宗良, 李冰岚, 朱克, 等. 磐安产白芍指纹图谱多指标成分定量方法研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(3): 612-622.