

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.018

高效液相色谱法测定壮骨止痛口服膏中川续断皂苷VI含量

熊有明¹, 崔虹², 曾珍¹

(1. 重庆市万州食品药品检验所, 重庆 404000; 2. 重庆市万州区中医院, 重庆 404000)

摘要:目的 建立测定壮骨止痛口服膏中川续断皂苷VI含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用 Inertsustain C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(28:72, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 212 nm, 进样量为 10 μL。结果 川续断皂苷VI进样量在 0.212~5.295 μg ($r=0.9999$) 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率为 95.75%, RSD 为 0.85% ($n=9$)。结论 该方法简单、准确, 灵敏度高, 重复性好, 可用于壮骨止痛口服膏中川续断皂苷VI的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 壮骨止痛口服膏; 川续断皂苷VI; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)13-0066-02

Content Determination of Asperosaponin VI in Zhuanggu Zhitong Oral Paste by HPLC

XIONG Youming¹, CUI Hong², ZENG Zhen¹

(1. Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 404000; 2. Wanzhou District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, China 404000)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of asperosaponin VI in Zhuanggu Zhitong Oral Paste by high performance liquid chromatography(HPLC). Methods A Inertsustain C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was employed with acetonitrile-water(28:72, V/V) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 212 nm, and the injection volume was 10 μL. Results The linear range of asperosaponin VI was 0.212~5.295 μg ($r=0.9999$), the average recovery rate was 95.75%, and the RSD was 0.85% ($n=9$). Conclusion The method is simple, accurate, highly sensitive and repeatable, and can be used for the determination of Chuanxiu saponin in Zhuanggu Zhitong Oral Paste.

Key words: high performance liquid chromatography; Zhuanggu Zhitong Oral Paste; asperosaponin VI; content determination

壮骨止痛口服膏为重庆市万州区中医院院内制剂, 由黄芪、当归、续断、熟地黄、补骨脂等 12 味中药组方。临床应用证实, 其具有益气血、补肝肾、强筋壮骨的功效, 主要用于筋骨折伤后期、腰膝酸痛、筋骨痿软等症。方中续断为君药, 性微温, 味苦、辛, 补肝肾, 可强筋骨、续折伤等。皂苷类为续断的主要有效成分, 其中以川续断皂苷VI为代表, 2015 年版《中国药典(一部)》^[1]将川续断皂苷VI作为续断药材质量控制的指标之一。该制剂现行质量标准只有鉴别和通则检查, 为提高其质量标准, 保证用药安全, 本研究中探讨了壮骨止痛口服膏中川续断皂苷VI的含量测定方法, 为该制剂的质量控制提供了定量检测方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); Mettler-XP204 型天平(瑞士梅特勒-托利多公司, 精度为万分之一); Sartorius-ME215S 型电子天平(德国赛多利斯公司, 精度为十万分之一)。

1.2 试剂

川续断皂苷VI对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 111685-201707, 含量为 90.9%); 壮骨止痛口服膏(重庆市万州区中医院, 批号分别为 20190903, 20190918, 20191010); 正丁醇、甲醇均为分析纯, 乙腈为

色谱纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

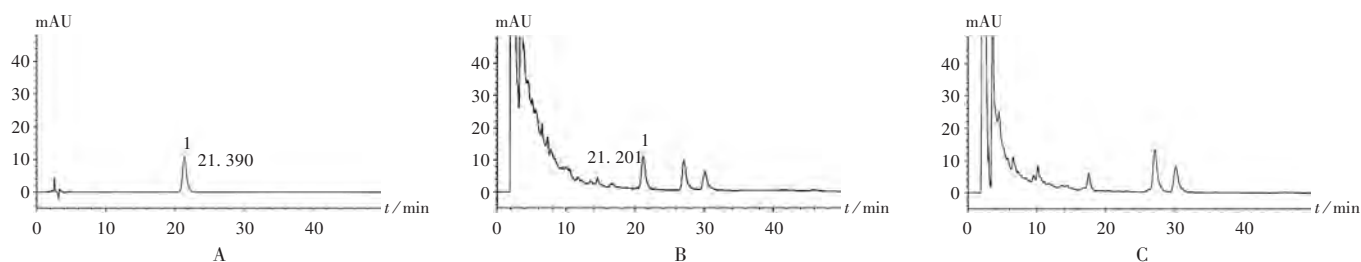
色谱柱: Inertsustain C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(28:72, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 212 nm; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

取川续断皂苷VI对照品 23.30 mg, 精密称定, 置 20 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液适量, 以甲醇稀释成含川续断皂苷VI分别为 0.021 2, 0.105 9, 0.211 8, 0.311 7, 0.529 5 mg/mL 的系列对照品溶液。取本品 2.5 g, 精密称定, 置 250 mL 分液漏斗中, 加 20 mL 水溶解, 用水饱和正丁醇提取 5 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇, 置水浴上蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。按处方(不含续断)及本品工艺制备阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取对照品溶液(质量浓度为 0.211 8 mg/mL)、供试品溶液、阴性对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按拟订色谱条件进样测定, 色谱图见图 1。可见, 阴性对照无干扰, 方法专属性良好, 且川续



1. 川续断皂苷 VI

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

断皂苷 VI 和其他组分可达到基线分离。

线性关系考察:按拟订色谱条件,将 2.2 项下川续断皂苷 VI 系列对照品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图。以川续断皂苷 VI 对照品溶液质量浓度 (X) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 2.1127 \times 10^6 X + 261.55$, $r = 0.9999$ 。结果表明,川续断皂苷 VI 进样量在 0.212 ~ 5.295 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取质量浓度为 0.2118 mg/mL 的川续断皂苷 VI 对照品溶液 10 μL ,重复进样 6 次。结果峰面积均值为 447 728, RSD 为 0.89% ($n = 6$),表明仪器精密良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 20190903)样品,依法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时进样测定,记录色谱峰面积。结果峰面积均值为 370 518, RSD 为 0.28% ($n = 7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 20190903)样品,依法制备供试品 6 份,精密称定,依法制备供试品溶液,分别进样测定,计算含量。结果平均含量为 0.771 mg/g , RSD 为 0.86% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的供试品 9 份,每份约 1 g,精密称定,置 250 mL 分液漏斗中,精密加入川续断皂苷 VI 对照品贮备液 0.4, 0.8, 1.6 mL,每个浓度平行 3 份,依法进样测定,计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 批供试品(批号分别为 20190903, 20190918, 20191010),依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果 3 批样品平均含量分别为 0.771, 0.750, 0.782 mg/g 。

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

壮骨止痛口服膏处方由续断、黄芪、党参、枸杞、杜仲、当归等 12 种中药组方,加上辅料,成分复杂,干扰严重。曾考察氯仿、乙醚、水饱和正丁醇对提取效果的影响,结果表明,水饱和正丁醇提取较完全,并可减少辅料及其他中药组分的干扰,故最终选择用水饱和正丁醇作为提取溶剂。

表 1 川续断皂苷 VI 加样回收试验结果 ($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.773	0.424	1.178	95.52		
0.775	0.424	1.182	95.99		
0.767	0.424	1.176	96.46		
0.771	0.847	1.578	95.28		
0.768	0.847	1.579	95.31	95.75	0.85
0.773	0.847	1.568	93.86		
0.765	1.694	2.363	94.33		
0.769	1.694	2.378	94.98		
0.770	1.694	2.390	95.63		

3.2 波长选择

参考 2015 年版《中国药典(一部)》^[1]及文献[2-4]中的方法,曾同时通过在 200 ~ 400 nm 波长范围内的全波段扫描,确定川续断皂苷 VI 最大吸收在 212 nm 波长附近,最终确定测定波长为 212 nm。

3.3 流动相选择

参照 2015 年版《中国药典(一部)》^[1]中续断药材含量测定项下的流动相,曾考察乙腈与水的比例,根据川续断皂苷 VI 的峰形、理论板数与分离度,确定乙腈-水 (28:72, V/V) 为流动相时分离效果较理想。

3.4 方法评价

采用 HPLC 法测定壮骨止痛口服膏中川续断皂苷 VI 的含量,受主客观因素的干扰较小,且准确、简便,重复性好,可作为壮骨止痛口服膏的定量分析方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 329.
- [2] 李进飞, 郭景文, 史宪海. HPLC 法同时测定腰痛片中芍药苷、川续断皂苷 VI、补骨脂和异补骨脂含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1099-1104.
- [3] 杜建红, 寇新民, 王艳丽, 等. HPLC 法测定止痛壮骨散中川续断皂苷 VI 的含量[J]. 中药执业药师, 2016, 13(11): 24-26.
- [4] 李军山, 常云凤, 马洁, 等. 续断饮片标准汤中川续断皂苷 VI 转移率的研究[J]. 中国药房, 2018, 29(20): 2782-2785.

(收稿日期: 2020-02-28)