

愈骨疗伤胶囊的质量标准研究

孙 艳^{①②}, 卞 俊^①, 陈海飞^①, 柳正良^①

[摘要] 目的 建立愈骨疗伤胶囊的质量标准。方法 采用 TLC 法对续断、白芍、地黄进行定性鉴别; 采用 HPLC 法测定川续断皂苷 VI 与柚皮苷的含量。色谱条件为 Sunfire™ C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相为水-乙腈梯度洗脱, 流速为 1.0 ml/min, 进样量 20 μl。采用双波长检测 212、283 nm 分别对川续断皂苷 VI、柚皮苷进行检测。结果 薄层色谱斑点清晰, 分离效果好。续断皂苷 VI 的回归方程为 $Y = 228217X - 4176$, $r = 0.9998$, 在 0.04 ~ 8.0 μg/ml 范围内峰面积与进样量呈良好的线性关系; 柚皮苷的回归方程为 $Y = 2E + 06X - 885.61$, $r = 0.9999$, 在 0.021 ~ 4.1 μg/ml 范围内峰面积与进样量呈良好的线性关系。川续断皂苷 VI 和柚皮苷的平均回收率为 101.36%、100.45%。结论 所建立的方法简便、准确、专属性强, 可用于愈骨疗伤胶囊含量测定。

[关键词] 愈骨疗伤胶囊; 川续断皂苷 VI; 柚皮苷; TLC; HPLC

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2012)01-065-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.19

Quality Standard Study on Yuguliaoshang Capsule

SUN Yan^{①②}, BIAN Jun^①, CHEN Hai-fei^①, LIU Zheng-liang^①

^①Center of Pharmaceutics, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200434, China;

^②Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 333004, China

[Abstract] **Objective** To establish quality standards Yuguliaoshang capsule. **Methods** Dipsacus root, catalpol and paeoniae in the medicine were identified by TLC. Asperosaponin VI and naringin in this medicine were determined by HPLC. Sunfire™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 212 nm for asperosaponin VI and 283 nm for naringin. The injection volume was 20 μl. **Results** Thin layer chromatography spots were clear, with good separation effect. Asperosaponin VI showed good linear relationship within the range of 0.04-8.0 μg/ml ($r = 0.9998$), naringin within the range of 0.021-4.1 μg/ml ($r = 0.9999$). The average recovery of asperosaponin VI was 101.36% and naringin was 100.45%. **Conclusion** The method is simple, accurate, specific, and can be used for quality control of Yuguliaoshang capsules.

[Key words] Yuguliaoshang capsules; asperosaponin VI; naringin; TLC; HPLC

愈骨疗伤胶囊为解放军 411 医院自制制剂, 以川续断、骨碎补为君药, 补肝肾、续筋骨、调和血脉, 补肾活血。川续断其主要成分为川续断皂苷 VI。现代药理学研究表明, 川续断皂苷 VI 具有抗骨质疏松、促进骨骼愈合的作用^[1]。骨碎补其主要活性成分为柚皮苷, 具有补肝肾强筋骨、降血脂的药理作用^[2]。本试验建立了一种快速、准确的测

定方法, 使制剂中的两个指标性成分能够同时测定含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 系列高效液相色谱仪, 包括 1525 泵、2487 检测器、717 自动进样器、breeze 数据处理系统(美国 Waters 公司); SK3300H 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器厂); AB104-N 电子分析天平梅特勒(托利多仪器(上海)有限公司)。

1.2 试剂 川续断皂苷 VI 对照品、柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定); 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其它试剂均为分析纯, 愈骨疗伤胶囊(规格: 0.5 g/粒, 自制, 批号: 20110308、20110309、20110311)。

基金项目: 重大新药创制国家科技重大专项资助项目, No. 2009ZJ09004-058

作者简介: 孙 艳, 在读硕士。研究方向: 药物新技术与新剂型。
E-mail: belivesy@163.com

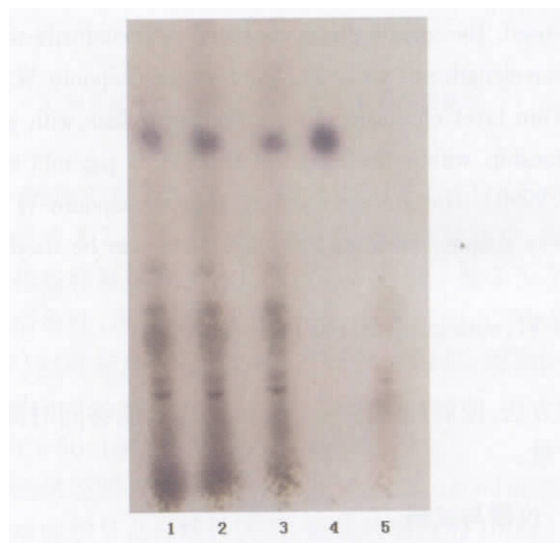
作者单位: ① 200434 上海, 解放军 411 医院药学科; ② 333004 江西南昌, 江西中医学院药学院

通讯作者: 卞 俊, Tel: (021) 65280289; E-mail: bian-jun@hotmail.com

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 川续断的鉴别 供试品溶液: 取本品(批号为 20110308、20110309、20110311) 0.05 g 置于 25 ml 容量瓶中加甲醇 20 ml 超声 30 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。对照品溶液: 称取川续断皂苷 VI 10.0 mg, 精密称定, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇超声溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 即得。阴性对照溶液: 按愈骨疗伤胶囊的处方配比及制法, 取除川续断外的其他药材制成阴性样品, 再按供试品制备方法, 制成缺川续断的阴性对照溶液。照文献 [3] 方法, 吸取供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇-醋酸-水(4:1:5) 上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 20% 硫酸乙醇溶液, 于 105℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色斑点, 缺川续断的阴性对照在与对照品及供试品色谱相应的位置上未显相同颜色的斑点。见图 1。

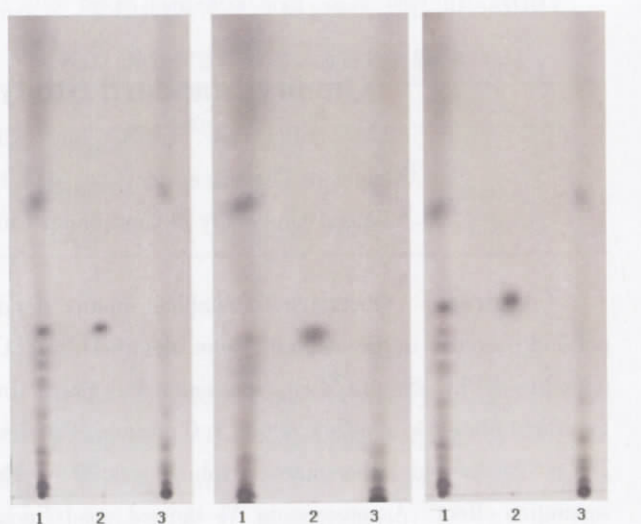


1、2、3: 供试品; 4: 川续断皂苷 VI 对照品; 5: 阴性对照

图 1 川续断的 TLC 图

2.1.2 白芍的鉴别 供试品溶液: 取本品 0.3 g 加水 30 ml 超声 30 min, 放冷滤过, 滤液用正丁醇萃取 2 次, 每次 20 ml, 合并正丁醇提取液, 并加氨试液洗涤, 弃去氨试液, 正丁醇液蒸干, 残渣加 10 ml 甲醇溶解, 即得。对照品溶液: 称取芍药苷对照品 10.0 mg, 精密称定, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇超声溶

解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 即得。阴性对照溶液: 按愈骨疗伤胶囊的处方配比及制法, 取除白芍药材外的其他药材制成阴性样品, 再按供试品制备方法, 制成缺白芍的阴性对照溶液。照文献 [3] 方法分别吸取供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.8) 溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 于 105℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色斑点, 缺白芍的阴性对照溶液在与对照品溶液及供试品色谱相应的位置上未显相同颜色的斑点。见图 2。



1: 供试品; 2: 芍药苷对照品; 3: 阴性对照

图 2 白芍 TLC 图

2.1.3 地黄的鉴别 供试品溶液: 其制备方法同 2.1.1。对照品溶液: 对照品溶液的制备 称取梓醇对照品 5.0 mg, 精密称定, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇超声溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。阴性对照溶液: 按愈骨疗伤胶囊的处方配比及制法, 取除地黄药材外的其他药材制成阴性样品, 再按供试品制备方法, 制成缺地黄的阴性对照溶液。照文献 [3] 方法分别吸取供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(14:8:1) 溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 于 105℃ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色斑点, 缺地黄的阴性对照溶液在与对照品及供试品色谱相应的位置上未显相同颜色的斑点。见图 3。



1、2、3: 供试品; 4: 梓醇对照品; 5: 阴性对照

图 3 地黄 TLC 图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Sunfire™ C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 乙腈-水梯度洗脱, 见表 1, A 为水, B 为乙腈; 双波长检测: 210、283 nm, 柱温: 30℃, 流速: 1.0 ml/min。进样量: 20 μl。

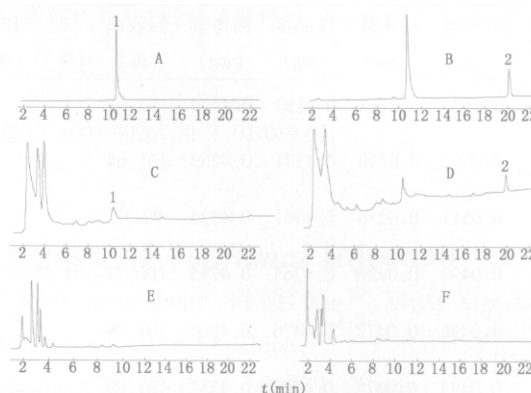
表 1 流动相梯度洗脱表

时间(min)	A(%)	B(%)
0.0	80	20
20.0	60	40
30.0	80	20

2.2.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液 称取川续断皂苷 VI 对照品适量, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解制成约含川续断皂苷 VI 1.0 mg/ml, 作为贮备液; 称取柚皮苷对照品适量, 置 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解制成约含柚皮苷 0.5 mg/ml, 作为贮备液; 分别精密吸取川续断皂苷 VI、柚皮苷对照品贮备液各 1.0 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 的滤膜后作为混合对照品溶液。(2) 供试品溶液 取愈骨疗伤胶囊适量(批号: 20110311), 研细。取 0.05 g 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 加入 15 ml(乙腈-水 30:70) 混合溶液, 超声处理 30 min, 放冷, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。(3) 阴性对照溶液 取按处方量及制备工艺要求制成的不含川续断、骨碎补的样品, 精密称定。照上述供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。

2.2.3 系统适应性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液 20 μl, 按以上色谱条

件进行测定。对照品峰形良好, 柚皮苷保留时间约为 11 min, 川续断皂苷 VI 保留时间约为 20 min, 供试品溶液中柚皮苷、川续断皂苷 VI 与其它组分分离完全, 分离度大于 1.5。理论塔板数在 283 nm 处按柚皮苷计算不得低于 3500; 在 212 nm 处按川续断皂苷 VI 计算不得低于 3500, 阴性样品对柚皮苷及川续断皂苷 VI 均无干扰, 见图 4。



A、B: 对照品; C、D: 样品; E、F: 阴性对照; 1: 柚皮苷; 2: 川续断皂苷 VI

图 4 HPLC 图

2.2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取对照品溶液注入液相色谱仪, 使川续断皂苷进样量为 0.04、0.4、0.8、1.20、4.0、8.0 μg/ml, 柚皮苷进样量为 0.021、0.21、0.41、0.62、2.1、4.1 μg/ml。记录色谱峰, 以峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X, μg/ml)为横坐标, 绘制标准曲线, 得川续断皂苷和柚皮苷 VI 回归方程分别为:

$$Y = 228217X - 4176, r = 0.9998, n = 6$$

$$Y = 2E + 06X - 885.61, r = 0.9999, n = 6$$

川续断 VI、柚皮苷的线性范围分别为 0.04 ~ 8.0 μg/ml, 0.021 ~ 4.1 μg/ml。

2.2.5 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 212 nm 处测定川续断皂苷 VI 峰面积平均值为 118308.3, RSD 为 0.82%; 283 nm 处测定柚皮苷峰面积平均值为 736451.8, RSD 为 0.31%。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液(批号: 20110311), 分别于配制后 0、2、4、6、8、10、16 h 测定其峰面积, 在 212 nm 处测定川续断皂苷 VI 峰面积的 RSD 为 1.92%; 在 283 nm 处测定柚皮苷峰面积的 RSD 为 1.59%。结果表明供试品溶液在 16 h 内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一(批号: 20110311)样品 6 份, 按上述样品处理方法及色谱条件分别测定样品, 川续断皂苷 VI 的平均含量为 0.79%, RSD 为 1.28%; 柚皮苷的平均含量为 0.15%, RSD 为

1.57%。

2.2.8 加样回收率试验 称取已知含量的愈骨疗伤胶囊的样品(批号:20110311)适量,共6份。精密称定,分别加对照品溶液(低、中、高3个浓度),按上述试验方法分别测定含量,计算加样回收率,川续断皂苷VI用A表示,柚皮苷用B表示。见表2。

表2 川续断皂苷VI及柚皮苷的加样回收率结果

成分	取样量 (g)	加入量 (mg)	样品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
A	0.0504	0.0118	0.4187	0.4299	102.67		
	0.0502	0.0118	0.4171	0.4239	101.64		
	0.0511	0.0236	0.4361	0.4325	99.16		
	0.0499	0.0236	0.4265	0.4295	100.73	101.36	1.24
	0.0496	0.0472	0.4476	0.4566	101.99		
	0.0495	0.0472	0.4468	0.4557	101.99		
B	0.0504	0.0105	0.0915	0.0934	102.12		
	0.0502	0.0105	0.0912	0.0925	101.45	100.45	1.42
	0.0511	0.0209	0.1031	0.1011	98.04		
	0.0499	0.0209	0.1012	0.1020	100.81		
	0.0496	0.0418	0.1216	0.1214	99.83		
	0.0495	0.0418	0.1214	0.1220	100.46		

2.2.9 样品测定 按上述测定方法,测定3批样品中川续断皂苷VI与柚皮苷的含量,结果见表3。

表3 样品中川续断皂苷VI及柚皮苷含量测定结果($n=3$)

批号	川续断皂苷VI(%)	柚皮苷(%)
20110308	4.12	0.78
20110309	4.04	0.80
20110311	4.04	0.80

3 讨论

本次试验采用梯度洗脱,同时测定川续断皂苷

VI与柚皮苷的含量,在前10 min 柚皮苷能达到很好的分离效果,在后10 min 川续断皂苷VI能达到很好的分离效果,获得满意结果,一次性配制样品溶液,同时测定两个成分,方法简便、迅速、准确,达到了预期效果。在前期试验中对流动相进行优化,曾采用以乙腈-水(26:74)、(40:60),乙腈-0.1%的磷酸(28:72)等流动相进行洗脱时均不能使川续断皂苷VI与柚皮苷两者同时达到很好的分离效果,目标峰柚皮苷的旁边会存在干扰,没有达到很好的分离效果。波长的选择:在212 nm处川续断皂苷VI有最大吸收,柚皮苷有吸收,但212 nm不是柚皮苷的最大吸收波长,其最大吸收波长为283 nm。2010版《中国药典》(一部)对骨碎补的检测采用283 nm作为检测波长,对川续断的检测采用212 nm作为检测波长。

本文对川续断、地黄、白芍进行TLC鉴别,色谱斑点清晰,专属性强。阴性对照无干扰;本文在《中国药典》的基础上对地黄的显色剂进行了优化,药典中采用5%茴香醛进行显色,此显色效果不好,本次试验将其改为5%香草醛进行显色,使得斑点显色更加清晰,同时对其展开剂进行优化,以三氯甲烷-甲醇-水(14:6:1)溶液为展开剂,其 R_f 值较小,故采用以三氯甲烷-甲醇-水(14:8:1)溶液为展开剂展开,其色谱中 R_f 适宜;对白芍的展开剂进行优化,分别以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.6),三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.8)为展开剂展开,观察TLC图,以乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.8)为展开剂时,色谱中各物质分离较好。

[参考文献]

- [1] 钟美英,申玉华.川续断的研究现状[J].中医药导报,2008,14(6):137-139
- [2] 常德有,董福慧.骨碎补的研究概况[J].吉林中医药,2006,26(6):61-62
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2010.239-240;309-310

(收稿日期:2010-12-09;修回日期:2011-08-29)

(本文编辑 梁爱君)