

HPLC 法同时测定博尔宁胶囊中 5 种成分

朱艳华¹, 马灵珍², 付平^{3*}

(1. 新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 亳州职业技术学院药学院, 安徽 亳州 236800; 3. 河南护理职业学院, 河南 安阳 455000)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定博尔宁胶囊(重楼、女贞子、大黄等)中 5 种成分的含有量。**方法** 博尔宁胶囊乙醇提取液的分析采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-甲醇(1:1)-水为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 203 nm(重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ和重楼皂苷Ⅰ)和 224 nm(女贞苷和特女贞苷); 进样量 20 μL。**结果** 重楼皂苷Ⅶ在 6.70~134.00 μg/mL($r=0.999\ 8$)、重楼皂苷Ⅵ在 4.35~87.00 μg/mL($r=0.999\ 6$)、重楼皂苷Ⅰ在 6.48~129.60 μg/mL($r=0.999\ 9$)、女贞苷在 7.45~149.00 μg/mL($r=0.999\ 7$)、特女贞苷在 7.03~140.60 μg/mL($r=0.999\ 6$) 范围内线性关系良好, 平均回收率($n=6$)分别为 99.28%、96.72%、99.30%、96.93% 和 98.68%, RSD 分别为 1.18%、1.05%、0.60%、1.42% 和 0.79%。**结论** 该方法准确灵敏, 重复性好, 可用于博尔宁胶囊的质量控制。

关键词: 博尔宁胶囊; 重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ; 重楼皂苷Ⅰ; 女贞苷; 特女贞苷; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)09-1952-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.016

Simultaneous determination of five constituents in Bo'erning Capsules by HPLC

ZHU Yan-hua¹, MA Ling-zhen², FU Ping^{3*}

(1. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. School of Pharmacy, Bozhou Vocational and Technical College, Bozhou 236800, China; 3. Henan Vocational College of Nursing, Anyang 455000, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of contents of five constituents in a supplementary antitumor agent, Bo'erning Capsules (*Paridis Rhizoma*, *Ligustri Lucidi Fructus*, *Rhei Radix et Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of Bo'erning Capsules ethanolic extract was performed on a 30 ℃ thermostatic Hypersil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-methanol (1:1)-water flowed at 1.3 mL/min in a gradient elution manner. The detection wavelengths were set at 203 nm for polyphyllin Ⅶ, polyphyllin Ⅵ and polyphyllin Ⅰ, and 224 nm for ligustroflavone and specnuezhenide. And the injection volume was 20 μL. **RESULTS** Polyphyllin Ⅶ, polyphyllin Ⅵ, polyphyllin Ⅰ, ligustroflavone and specnuezhenide showed good linear relationships within the ranges of 6.70–134.00 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 4.35–87.00 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 6.48–129.60 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 7.45–149.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$) and 7.03–140.60 μg/mL ($r=0.999\ 6$), whose average recoveries (RSD) were 99.28% (1.18%), 96.72% (1.05%), 99.30% (0.60%), 96.93% (1.42%) and 98.68% (0.79%), respectively. **CONCLUSION** This accurate, sensitive and well reproducible method can be used for the quality control of Bo'erning Capsules.

KEY WORDS: Bo'erning Capsules; polyphyllin Ⅶ; polyphyllin Ⅵ; polyphyllin Ⅰ; ligustroflavone; specnuezhenide; HPLC

收稿日期: 2015-10-28
基金项目: 安徽省高等学校教学质量与教学改革工程实训中心建设项目(20101460)
作者简介: 朱艳华(1981—), 女, 硕士, 主治医师, 从事肿瘤的中西医结合治疗及相关药物研究工作。Tel: 13609998739, E-mail: zhuyanhuayanhua@163.com
* 通信作者: 付平(1963—), 女, 讲师, 从事内科学研究。Tel: 13403726789, E-mail: shhz666@163.com

博尔宁胶囊为《中华人民共和国卫生部药品标准（中药成方制剂）》收录品种^[1]，由重楼、女贞子（酒制）、炙黄芪、光慈菇、马齿苋、龙葵、紫苏子（炒）、鸡内金（炒）、僵蚕（炒）、大黄、冰片 11 味药材组成，具有扶正祛邪、益气活血、软坚散结、消肿止痛的作用，是临床上辅助治疗癌症的药物，可配合化疗使用，有一定的减毒增效作用。但其质量标准仅对大黄所含大黄素进行了控制，而该成分可以通过植物提取和化学合成等方法制得，同时原标准规定大黄素含有量限度较低（每粒不得少于 0.02 mg），故无法全面有效地控制该药物的质量和有效性。本实验采用 HPLC 法对博尔宁胶囊中重楼所含重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅰ和女贞子所含女贞苷、特女贞苷的含有量同时进行测定，发现该方法分离效果及重复性好，而且简便、准确、快捷，为有效地控制产品质量提供了有利支持。

1 仪器与试剂

安捷伦 1200 高效液相色谱仪，配置 G1329A 自动进样器、Chemstation 色谱工作站、G1315B 可变波长检测器（美国安捷伦公司）。重楼皂苷Ⅶ（111593-201303，含有量 92.5%）、重楼皂苷Ⅵ（11592-201203，含有量 95.1%）、重楼皂苷Ⅰ（111590-201103，含有量 92.1%）、女贞苷（111918-201102，含有量 88.6%）、特女贞苷（111926-201404，含有量 97.3%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。博尔宁胶囊购自石家庄东方药业有限公司，共 3 批（0.15 g/粒，批号 04141007、04150102、04141209）。甲醇、乙腈为色谱纯（天津市康科德科技有限公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；体积流量 1.3 mL/min；以乙腈-甲醇（1：1）为流动相 A，水为流动相 B，梯度洗脱（0 ~ 9 min，32.0% A；10 ~ 30 min，32.0% → 44.0% A；31 ~ 43 min，44.0% → 50.0% A；44 ~ 50 min，50.0% → 32.0% A）^[2-8]；检测波长 203 nm^[9-12]（重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ和重楼皂苷Ⅰ）和 224 nm^[13-16]（女贞苷和特女贞苷）；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。在上述色谱条件下，待测成分峰与相邻峰的分离度大于 1.5，理论塔板数以各成分色谱峰计均大于 2 500。

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅰ、女贞苷和特女贞苷

对照品适量，置于 20 mL 量瓶中，乙醇溶解定容，制成质量浓度分别为 0.670、0.435、0.648、0.745、0.703 mg/mL 的对照品贮备液。再精密量取 1.5、2.0、2.5、1.0、5.0 mL，置于同一 50 mL 量瓶中，乙醇定容，摇匀，即得含重楼皂苷Ⅶ 0.020 1 mg/mL、重楼皂苷Ⅵ0.017 4 mg/mL、重楼皂苷Ⅰ 0.032 4 mg/mL、女贞苷 0.014 9 mg/mL、特女贞苷 0.070 3 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取博尔宁胶囊内容物适量，研磨成细粉，精密称取 0.5 g，置于圆底烧瓶中，精密加入乙醇 50 mL，称定质量，加热回流提取 30 min，乙醇补足减失的质量，静置 10 min，取上清液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

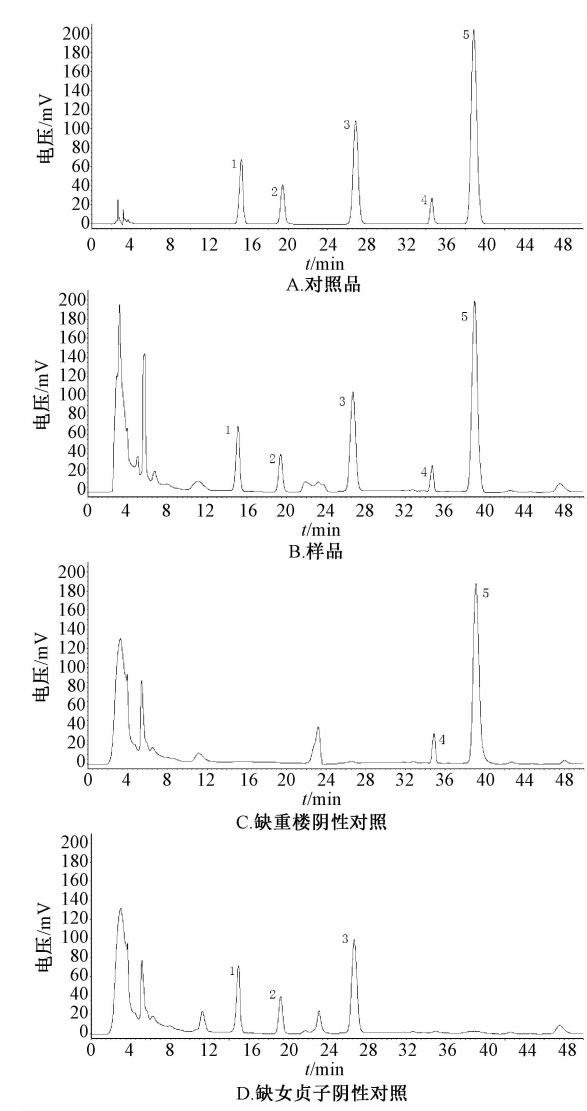
2.4 阴性对照试验 严格按照处方和生产工艺制备缺重楼、女贞子阴性样品，按“2.3”项下方法制备阴性对照溶液，精密吸取供试品、混合对照品、阴性对照溶液各 20 μL 进行测定。结果，重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅰ、女贞苷和特女贞苷与其他组分均能达到基线分离，而阴性对照在相应位置处未检测出色谱峰，色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，乙醇稀释至刻度，摇匀，在“2.1”项色谱条件下进行测定。以峰面积为纵坐标（Y），对照品质量浓度为横坐标（X）绘制标准曲线，结果见表 1，可知重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅰ、女贞苷和特女贞苷在各自线性范围内线性关系良好。

表 1 5 种成分的线性关系
Tab. 1 Linear relationships of five constituents

成分	回归方程	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)	r
重楼皂苷Ⅶ	$Y=7.0069 \times 10^5 X - 209.4$	6.70 ~ 134.00	0.999 8
重楼皂苷Ⅵ	$Y=5.1134 \times 10^5 X + 383.7$	4.35 ~ 87.00	0.999 6
重楼皂苷Ⅰ	$Y=7.2431 \times 10^5 X + 186.5$	6.48 ~ 129.60	0.999 9
女贞苷	$Y=3.9715 \times 10^5 X + 401.2$	7.45 ~ 149.00	0.999 7
特女贞苷	$Y=1.1316 \times 10^6 X - 480.9$	7.03 ~ 140.60	0.999 6

2.6 精密度试验 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液（含重楼皂苷Ⅶ 0.020 1 mg/mL、重楼皂苷Ⅵ 0.017 4 mg/mL、重楼皂苷Ⅰ 0.032 4 mg/mL、女贞苷 0.014 9 mg/mL、特女贞苷 0.070 3 mg/mL），连续 6 次，测得 5 种成分峰面积 RSD 分别为 1.36%、1.43%、0.75%、1.07% 和 1.49%，表明仪器精密度良好。



1. 重楼皂苷Ⅶ 2. 重楼皂苷Ⅵ 3. 重楼皂苷Ⅰ 4. 女贞苷 5. 特女贞苷

1. polyphyllin Ⅶ 2. polyphyllin Ⅵ 3. polyphyllin Ⅰ

4. ligustroflavone 5. specnuezhenide

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.7 重复性试验 取同一批(批号 04150102)博尔宁胶囊6份,平行制备6份供试品溶液进样测定,测得重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅰ、女贞苷和特女贞苷峰面积 RSD 分别为 0.64%、1.67%、0.38%、1.25% 和 0.87%,表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一批(批号 04150102)博尔宁胶囊制备的供试品溶液,在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h,每次进样 20 μL,测得重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅰ、女贞苷和特女贞苷峰面积 RSD 分别为 0.39%、1.33%、0.86%、

1.24% 和 0.99%,表明供试品溶液室温下在 24 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取含有量已知(重楼皂苷Ⅶ 2.08 mg/g、重楼皂苷Ⅵ 1.64 mg/g、重楼皂苷Ⅰ 3.19 mg/g、女贞苷 1.52 mg/g、特女贞苷 6.91 mg/g)的博尔宁胶囊内容物适量,研磨成细粉,精密称取 0.25 g,置于圆底烧瓶中,精密称取混合对照品溶液和乙醇各 25 mL,加热回流提取 30 min,乙醇补足减失的质量,静置 10 min,取上清液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液。在“2.1”项色谱条件下测定,计算平均回收率及 RSD,结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 (n=6)						
Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)						
成分	称样量/ mg	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
重楼皂苷Ⅶ	0.251 3	0.522 7	0.502 5	1.012 9	97.55	99.28
	0.249 1	0.518 1	0.502 5	1.013 5	98.59	(1.18)
	0.253 2	0.526 7	0.502 5	1.031 6	100.48	
	0.250 7	0.521 5	0.502 5	1.022 7	99.74	
	0.248 9	0.517 7	0.502 5	1.014 2	98.81	
重楼皂苷Ⅵ	0.251 5	0.523 1	0.502 5	1.028 3	100.54	
	0.251 3	0.412 1	0.435 0	0.830 1	96.09	96.72
	0.249 1	0.408 5	0.435 0	0.830 7	97.06	(1.05)
	0.253 2	0.415 2	0.435 0	0.833 5	96.16	
	0.250 7	0.411 1	0.435 0	0.840 2	98.64	
重楼皂苷Ⅰ	0.248 9	0.408 2	0.435 0	0.825 9	96.02	
	0.251 5	0.412 5	0.435 0	0.831 6	96.34	
	0.251 3	0.801 6	0.810 0	1.612 2	100.07	99.30
	0.249 1	0.794 6	0.810 0	1.597 3	99.10	(0.60)
	0.253 2	0.807 7	0.810 0	1.610 1	99.06	
女贞苷	0.250 7	0.799 7	0.810 0	1.597 6	98.51	
	0.248 9	0.794 0	0.810 0	1.603 5	99.94	
	0.251 5	0.802 3	0.810 0	1.605 4	99.15	
	0.251 3	0.382 0	0.372 5	0.753 2	99.65	96.93
	0.249 1	0.378 6	0.372 5	0.737 6	96.38	(1.42)
特女贞苷	0.253 2	0.384 9	0.372 5	0.742 7	96.05	
	0.250 7	0.381 1	0.372 5	0.739 1	96.11	
	0.248 9	0.378 3	0.372 5	0.739 4	96.94	
	0.251 5	0.382 3	0.372 5	0.741 5	96.43	
	0.251 3	1.736 5	1.757 5	3.469 2	98.59	98.68
特女贞苷	0.249 1	1.721 3	1.757 5	3.450 6	98.40	(0.79)
	0.253 2	1.749 6	1.757 5	3.471 3	97.96	
	0.250 7	1.732 3	1.757 5	3.480 5	99.47	
	0.248 9	1.719 9	1.757 5	3.440 3	97.89	
	0.251 5	1.737 9	1.757 5	3.491 2	99.76	

2.10 样品含有量测定 取 3 批博尔宁胶囊,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样,每次 20 μL,测定含有量,结果见表 3。

表 3 含有量测定结果 (mg/粒)

Tab. 3 Results of content determination (mg/pill)

批号	重楼皂苷 Ⅶ	重楼皂苷 Ⅵ	重楼皂苷 Ⅰ	女贞苷	特女贞苷
04141007	0.289	0.227	0.435	0.241	1.125
04150102	0.312	0.246	0.479	0.228	1.036
04141209	0.347	0.281	0.503	0.209	0.984
平均值	0.316	0.251	0.472	0.226	1.048

3 讨 论

3.1 流动相的选择 考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-甲醇（1：1）-水流动相系统，发现乙腈-甲醇（1：1）-水流动相各色谱峰的峰形和分离度均较好，故最终选用该流动相进行梯度洗脱。

3.2 提取方法的选择 考察了甲醇和乙醇两种提取溶剂，以及加热回流和超声提取两种提取方法，发现乙醇加热回流提取的效果最佳。在此基础上，选择提取时间 15、30、45 min 进行研究，发现 30 min和45 min 各成分含有量差异不大，而 15 min 时重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅰ和特女贞苷含有量明显低于其他两种成分。因此，最终确定乙醇加热回流提取 30 min 作为最佳提取方法。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 国家药品标准新药转正标准：第 70 册 [S]. 2008：39-42.

[2] 钱永健,张 超. HPLC 法测定出血热预防片中的女贞苷、特女贞苷、哈巴苷和哈巴俄苷[J]. 中成药, 2015, 37 (1): 116-120.

[3] 崔蕴慧,樊 化,利弈成,等. 女贞子指纹图谱研究及红景天苷、特女贞苷的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(12): 2854-2857.

[4] 黄 雯,苏子仁. HPLC 法测定女贞子药材中女贞苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 824-826.

[5] 乔春风,朱新科. 多波长高效液相色谱法同时测定夜宁合剂中 4 种有效成分的含量[J]. 中南药学, 2014, 12(8): 793-796.

[6] 刘 佳,张 鹏,宋发军,等. 重楼地上部分四种重楼皂苷含量的分析[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1233-1235.

[7] 韩燕全,洪 燕,夏伦祝,等. UPLC-ELSD 法同时测定重楼中重楼皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ、Ⅶ[J]. 中草药, 2012, 43(2): 305-308.

[8] 叶 方,杨光义,黄良永,等. 鄂西北地区重楼药材中皂苷含量比较[J]. 医药导报, 2013, 32(7): 933-936.

[9] 刘俊有,慕杨娜,季 雪,等. 高效液相色谱法测定贞芪扶正颗粒特女贞苷含量[J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29 (3): 67-68.

[10] 商桂春,袁大鹏,刘海滨. HPLC 测定女珍颗粒中特女贞苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 153-155.

[11] 郭培果. HPLC 测定参茸珍宝片中特女贞苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(10): 1231-1234.

[12] 林伟鑫,李 勇,吉国辉,等. HPLC 法测定调脂胶囊中特女贞苷的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(3): 564-565.

[13] 吴 珊,吴 卫,郑有良. 反相高效液相色谱法同时测定重楼药材中 4 种皂苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1896-1897.

[14] 陈锡琨. HPLC 测定宫血宁胶囊中重楼皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅵ及Ⅶ的含量[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(12): 1346-1349.

[15] 刘小芬,杨成梓,黄泽豪,等. 重楼药材性状与 4 种皂苷含量分析[J]. 福建中医药, 2014, 45(1): 53-56.

[16] 尹兴斌,林龙飞,曹飒丽,等. 重楼克感胶囊中重楼皂苷Ⅰ,Ⅱ,Ⅵ,Ⅶ及金丝桃苷含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 58-61.