

HPLC 测定龙钻通痹颗粒剂中青藤碱和补骨脂素

农毅清¹, 蒋林^{2*}, 庞宇舟², 罗宇东³, 米阿娜²

(1. 广西南宁食品药品检验所, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001;
3. 广西中医药大学 制药厂, 南宁 530023)

[摘要] 目的: 建立一种同时测定龙钻通痹颗粒剂中青藤碱和补骨脂素含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1% 三乙胺 (47.5:52.5) 为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 246 nm。结果: 青藤碱在 1.01 ~ 12.12 μg 呈良好的线性关系 ($r=0.9997$), 补骨脂素在 0.02436 ~ 0.29232 μg 呈良好的线性关系 ($r=0.9998$)。青藤碱和补骨脂素的平均回收率为 100.49% 和 97.00%, RSD 为 3.0% 和 1.9%。结论: 建立了同时测定龙钻通痹颗粒剂中青藤碱和补骨脂素含量的高效液相色谱方法, 该方法快速, 简便, 结果准确, 重复性好, 可作为龙钻通痹颗粒剂的质量评价方法。

[关键词] 龙钻通痹颗粒剂; 高效液相色谱法; 青藤碱; 补骨脂素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0058-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200058

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160830.0828.040.html>

[网络出版时间] 2016-08-30 8:28

Simultaneous Determination of Sinomenine and Psoralen in Longzuan Tongbi Granule by HPLC

NONG Yi-qing¹, JIANG Lin^{2*}, PANG Yu-zhou², LUO Yu-dong³, MI A-na²

(1. Nanning Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530001, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

3. Pharmaceutical Factory of Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC method for the simultaneous determination of sinomenine and psoralen in Longzuan Tongbi granule. **Method:** The contents were determined by HPLC method on Phenomenex Gemini C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); with methanol-0.1% triethylamine (47.5:52.5) as the mobile phase; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; and the detection wavelength was set at 246 nm. **Result:** Sinomenine and psoralen showed good linear relationship within 1.01-12.12 μg ($r=0.9997$) and 0.02436-0.29232 μg ($r=0.9998$) respectively. The average recovery rate was 100.49% (RSD 3.0%) and 97.00% (RSD 1.9%). **Conclusion:** The method is rapid, simple, reliable, and accurate, and can be used as the quality evaluation method for Longzuan Tongbi granule.

[Key words] Longzuan Tongbi granule; HPLC; sinomenine; psoralen

类风湿关节炎 (RA) 是一种病因未明的以炎性滑膜炎为主的慢性自身免疫性疾病。表现为外周关节的非特异性炎症, 患病的关节及其周围组织被进行性破坏, 若得不到及时有效的治疗, 可导致关节畸

[收稿日期] 20151207(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81460765); 广西卫生厅中管局课题 (GZZJ13-09); 南宁市技术创新项目 (南工信科技[2013]9号)

[第一作者] 农毅清, 副主任药师, 从事保健食品及新产品的研究与开发, Tel:15807818876, E-mail:15807818876@163.com

[通讯作者] * 蒋林, 教授级高级工程师, 从事药品及保健食品的新产品研发, Tel:18677155109, E-mail:1009100482@qq.com

形,发生功能障碍,严重者,功能丧失。全世界的平均患病率大约为 1%,我国的患病率大约在 0.32%~0.36%^[1]。目前还没有能根治此病的药物。临床上现常用的药物主要是价格昂贵、长期服用毒副作用大的非甾体类抗炎药、激素类药物和生物制剂等。因此,开发有效且毒副作用低的治疗类风湿性关节炎药物势在必行。壮药龙钻通痹颗粒是广西中医药大学自主研发的民族药制剂,由飞龙掌血、大钻、八角枫、两面针、青风藤、九龙藤、鸡血藤、五指毛桃 8 味壮族药组成,通过疏通龙路、火路之瘀滞,起到补虚祛毒的功效,在临床上用于治疗活动期类风湿关节炎^[2]。其中青风藤具有祛风散瘀、利湿止痛的功效,五指毛桃具有健脾益气,化湿舒筋之功,为补气之品。现代研究表明青风藤含有的青藤碱有镇痛、抗炎、镇静、消肿等作用^[3],五指毛桃主要成分补骨脂素作为评价五指毛桃质量的重要依据已成共识^[4-5]。前期,课题组已开展抗炎与工艺方面研究^[6-9],为有效的控制药品质量,本实验采用高效液相色谱法,以青藤碱和补骨脂素的含量作为龙钻通痹颗粒质量的定量指标,建立二者的高效液相含量测定方法。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(包括岛津色谱工作站,日本岛津),ME104E 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司),RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),KQ-100 型数控超声波清洗器(昆山市市超声仪器有限公司)。

对照品青藤碱(批号 110774-200507),补骨脂素(批号 110739-201416)购自中国食品药品检定研究院;龙钻通痹颗粒(广西中医药大学制药厂技术研发中心自制,批号 20140101,20140102,20140103;每包 10 g),甲醇色谱纯,三乙胺分析纯,蒸馏水实验室自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1%三乙胺(47.5:52.5),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 246 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 青藤碱储备溶液:精密称取青藤碱 20.20 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得。

补骨脂素储备溶液:精密称取补骨脂素 6.09 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,

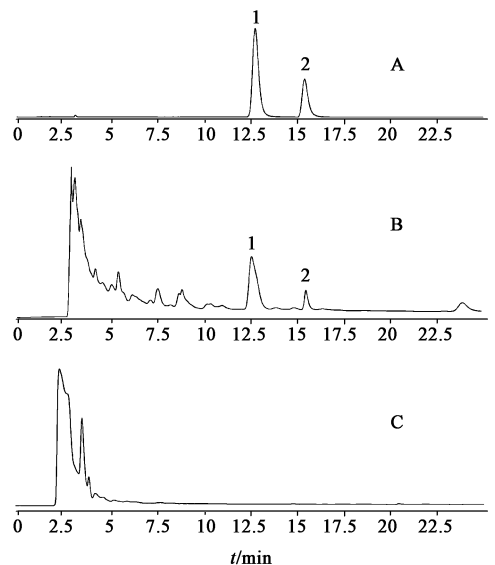
即得。

青藤碱、补骨脂素混合对照品溶液:精密量取青藤碱对照品储备溶液 5 mL、补骨脂素对照品储备溶液 1 mL,于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,配成含青藤碱 1.01 g·L⁻¹,补骨脂素 0.024 36 g·L⁻¹的混合对照品溶液。即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 分别称取龙钻通痹颗粒约 1 g,精密称定,置于锥形瓶中,加入甲醇 50 mL 超声提取 40 min(功率 100 W,频率 25 kHz),过滤,颗粒残渣用甲醇洗 3 次,合并滤液,滤液浓缩至大约 6 mL 左右,转移置 10 mL 量瓶中,蒸发皿用少量甲醇多次清洗并定容于 10 mL 量瓶,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按龙钻通痹颗粒剂处方及工艺制成缺青风藤和五指毛桃的阴性样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,色谱图见图 1。阴性样品在目标成分的色谱峰位置峰面积与供试品峰面积之比 < 5%。结果表明阴性样品对检测无干扰,该方法专属性良好。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 青藤碱; 2. 补骨脂素
图 1 龙钻通痹颗粒样品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Longzuan Tongbi granule

2.4 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL 按 2.1 项下色谱条件分别进样测定。以对照品的进样质量为横坐标(X),以峰面积积分为纵坐标(Y)进行线性回归,得出青藤碱的回归方程为 $Y = 837\ 051 X + 63\ 093$ ($r = 0.999\ 7$),青藤碱进样量在 1.01~12.12 μg 与峰面积线性关系良好;补骨脂素的回归方程为 $Y =$

7 000 000X - 15 445 ($r=0.999 8$), 补骨脂素进样量在 0.024 36 ~ 0.292 32 μg 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 按照 2.1 项下的色谱条件, 连续进样 6 次测定。以峰面积计算, 青藤碱与补骨脂素峰面积 RSD 分别为 0.9%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批次的龙钻通痹颗粒样品 1 g, 平行称定 6 份, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法操作, 制备供试品溶液 6 份, 每份精密吸取 10 μL , 按 2.1 项下色谱条件测定。结果青藤碱和补骨脂素的质量分数分别为 4.12, 0.052 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 3.1%, 4.0%。

2.7 稳定性试验 精密称取龙钻通痹颗粒适量, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 吸取 10 μL , 进样测定。结果表明, 龙钻通痹颗粒供试品溶液中青藤碱、补骨脂素在 24 h 内峰面积值基本一致, 其 RSD 分别为 1.7%, 2.7%, 表明龙钻通痹颗粒供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验 精密称取已知含量的龙钻通痹颗粒 0.5 g, 共 9 份, 分别加入相当于样品中青藤碱和补骨脂素含量 80%, 100%, 120% 的青藤碱和补骨脂素对照品, 按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液并进样分析, 计算回收率, 结果见表 1。

2.9 样品含量测定 取不同批号的龙钻通痹颗粒, 按照 2.2.2 项下方法制备成供试品溶液后, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 按回归方程计算各组分含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 前处理的考察 参考文献[10-11], 试验对提取溶剂的种类和用量、提取时间通过比较各提取溶液中待测成分的色谱峰的峰面积, 分别进行了考察, 结果表明 95% 乙醇、70% 乙醇、甲醇 3 种溶剂中, 甲醇提取青藤碱和补骨脂素最完全。以甲醇为溶剂超声提取, 比较 30, 50, 70 mL 溶剂量; 30, 40, 50 min 超声时间。结果发现, 甲醇 50 mL, 超声提取 40 min 趋于稳定, 基本提取完全。综合考虑确定最佳的提取条件为甲醇 50 mL 超声提取 40 min。

3.2 流动相的考察 参考文献[12, 13], 试验考察了甲醇-乙胺、乙腈-0.1% 磷酸水等不同流动相体系, 比较了乙腈-0.1% 磷酸 (1:99), 乙腈-0.4% 冰乙酸 (2:98), 甲醇-含 0.1% 三乙胺的 0.1% 磷酸 (2:98), 甲醇-0.1% 三乙胺为 (50:50), 甲醇-0.1% 三乙胺 (47.5:52.5) 等流动相, 结果表明采用甲醇-0.1%

表 1 龙钻通痹颗粒中 2 种成分加样回收率试验

Table 1 Two components recovery test of Longzuan Tongbi granule

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加样量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD) /%
青藤碱	0.511 1	2.104	2.091	4.156	98.14	100.49 (3.0)
	0.518 6	2.135	2.091	4.193	98.43	
	0.507 4	2.088	2.091	4.149	98.57	
	0.500 3	2.059	1.667	3.775	102.94	
	0.499 8	2.057	1.667	3.765	102.46	
	0.505 1	2.079	1.667	3.741	99.70	
	0.520 4	2.142	2.576	4.797	103.07	
	0.519 8	2.139	2.576	4.688	98.96	
	0.520 9	2.144	2.576	4.775	102.14	
补骨脂素	0.511 1	0.027	0.026	0.052	96.16	97.00 (1.9)
	0.518 6	0.027	0.026	0.053	96.30	
	0.507 4	0.027	0.026	0.053	96.30	
	0.500 3	0.026	0.021	0.046	95.24	
	0.499 8	0.026	0.021	0.046	95.24	
	0.505 1	0.026	0.021	0.047	100.00	
	0.520 4	0.027	0.032	0.058	96.88	
	0.519 8	0.027	0.032	0.058	96.88	
	0.520 9	0.027	0.032	0.059	100.00	

表 2 3 批龙钻通痹颗粒样品测定

Table 2 Two components determination results of 3 bards Longzuan Tongbi granule

批号	青藤碱	补骨脂素
20140101	4.116	0.052
20140102	4.114	0.052
20140103	4.117	0.051

三乙胺 (47.5:52.5) 系统较为理想, 分离度较好, 峰对称性较好, 并能达到基线分离, 因此采用甲醇-0.1% 三乙胺 (47.5:52.5) 作为本实验的流动相。

3.3 检测波长的选择 分别取青藤碱对照品溶液和补骨脂素对照品溶液, 在 190 ~ 400 nm 全波长紫外吸收光谱扫描, 发现青藤碱的最大吸收波长为 262 nm, 补骨脂素的最大吸收波长为 246 nm。但青藤碱在 246 nm 吸收也比较大, 考虑同时测定两者的含量灵敏度, 笔者选择了两者都有良好的紫外吸收强度的 246nm 为检测波长。

龙钻通痹颗粒剂是根据壮族医药理论组方民族药制剂, 组方原则多为主帮公母合用, 本实验采用

HPLC 同时测定了龙钻通痹颗粒剂中主药青风藤中青藤碱和公药五指毛桃中补骨脂素的含量,通过测定壮族药制剂中关键药味的指标成分,可更好的评价符合壮族医药理论及制剂质量。本实验采用的 HPLC 同时测定龙钻通痹颗粒剂中青藤碱和补骨脂素的含量,方法快速,简便,结果准确,重复性好,可作为龙钻通痹颗粒剂的质量评价方法。

[参考文献]

[1] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:886.

[2] 庞宇舟,邢沙沙,方刚,等. 壮药龙钻通痹方治疗类风湿关节炎的临床观察[J]. 中国民族医药杂志,2013,1(4):1-2.

[3] 李乐,张彩玲,宋必卫. 青藤碱的药理研究与临床应用[J]. 中药新药与临床药理,2006,4(17):310-313.

[4] 董青松,欧彪,陈乾平. 五指毛桃研究进展[J]. 广西医学,2006,28(6):950-952.

[5] 钟兆健,宋粉云,李书渊,等. 五指毛桃质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(5):12-14.

[6] 邢沙沙,庞宇舟,张青槐,等. 壮药龙钻通痹方对实验性关节炎大鼠模型抗炎因子 IL-4, IL-10 的影响[J]. 中国民族医药杂志,2013,12(19):44-45,79.

[7] 张青槐,庞宇舟,邢沙沙,等. 壮药龙钻通痹方对关节炎大鼠模型致炎因子 TNF- α 、IFN- γ 的影响[J]. 中国医疗前沿,2013,8(21):9-10,26.

[8] 李建颖,蒋祖玲,张青槐,等. 壮药龙钻通痹方对类风湿关节炎大鼠模型 MMP-13 的影响[J]. 贵阳中医学院学报,2014,36(1):36-38.

[9] 谭安蕾,庞宇舟,蒋林,等. 星点设计-效应面法优选壮药龙钻通痹颗粒的提取工艺[J]. 广西中医药,2014,1(37):74-76.

[10] 王晓平,黄翔,陆奇丰,等. HPLC 测定不同叶型五指毛桃中补骨脂素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):93-95.

[11] 陈曦. HPLC 法青风藤根中青藤碱含量的测定及其提取工艺的优化[J]. 安徽农业科学,2010,38(29):16236-16238.

[12] 茅向军,许乾丽. 高效液相色谱法测定痹克冲剂中青藤碱的含量[J]. 中国中药杂志,2003,28(2):177-178.

[13] 杨燕军,代军. HPLC 法测定五指毛桃中补骨脂素、佛手柑内酯、芹菜素的含量[J]. 南方医科大学学报,2010,30(11):2565-2566.

[责任编辑 顾雪竹]