

HPLC 测定癸闭舒片中补骨脂素和异补骨脂素的含量

张蕊^{1*}, 冯晓川¹, 徐延昭²

(1. 北京积水潭医院中药房, 北京 100035; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的:应用高效液相色谱法测定癸闭舒片(LBSP)中补骨脂素和异补骨脂素的含量。方法: C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液(45:55)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 246 nm。结果:补骨脂素在 0.144 0~0.720 0 μg 进样量与峰面积呈良好的线性关系($r = 0.999\ 8$), 平均加样回收率为 99.16%, RSD 1.21% ($n = 6$); 异补骨脂素在 0.136 2~0.681 0 μg 进样量与峰面积呈良好的线性关系($r = 0.999\ 8$), 平均加样回收率为 98.52%, RSD 1.58% ($n = 6$)。结论:该方法测定结果准确、灵敏、重复性好。

[关键词] 癸闭舒片; 补骨脂素; 异补骨脂素; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0142-03

Determination of Psoralen and Isopsoralen in LBSP by HPLC

ZHANG Rui^{1*}, FENG Xiao-chuan¹, XU Yan-zhao²

(1. Chinese Pharmacy of Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determination of the content of psoralen and isopsoralen in Longbishu pills (LBSP). **Method:** An C₁₈ column was used as the chromatographic column. The mobile phase consisted of methanol-0.02 mol·L⁻¹ Sodium Dihydrogen Phosphate Solution (45:55), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was at 246 nm. **Result:** There was a good linear relationship between the concentration of psoralen and peak area value when the concentrations of psoralen was within the range of 0.144 0-0.720 0 μg ($r = 0.999\ 8$). The average recovery was 99.16%, RSD 1.21% ($n = 6$). There was a good linear relationship between the concentration of isopsoralen and peak area value when the concentrations of isopsoralen was within the range of 0.136 2-0.681 0 μg ($r = 0.999\ 8$). The average recovery was 98.52%, RSD 1.58% ($n = 6$). **Conclusion:** The method was accurate, sensitive, reproducible and may be used in the determination of psoralen and isopsoralen in LBSP.

[Key words] LBSP; psoralen; isopsoralen; HPLC; determination

癸闭舒片为中药复方制剂,是由癸闭舒胶囊改剂型而成,由补骨脂、山慈菇、海金沙、金钱草、琥珀等天然药物组成^[1-2],具有温肾化气、清热通淋、活血化瘀、散结止痛之功效。用于肾气不足、湿热瘀阻之癸闭所致尿频、尿急、尿痛、尿细如线、小腹拘急疼痛、腰膝酸软等症的治疗。补骨脂为方中君药,为保证临床疗

效,我们采用高效液相色谱法对补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素进行含量测定,以控制本品的内在质量。

1 仪器与试剂

LC-10ATVP 型高效液相色谱仪(日本岛津), SPD-10AVP 型紫外可见检测器, ANASTAR 型色谱数据工作站, 补骨脂素对照品(批号 110739-200314, 中国食品药品检定研究院), 异补骨脂素对照品(批号 110738-200309, 中国食品药品检定研究院)。甲醇(色谱纯, 北京益利精细化学品有限公司), 磷酸二氢钾(分析纯, 北京亚太龙兴化工有限公司), 乙腈(色谱纯, 天津康科德科技有限公司),

[收稿日期] 20120420(005)

[通讯作者] * 张蕊, 学士, 中药师, 从事中药制剂与医院药学,
Tel: 010-63728848, E-mail: zph1716@gmail.com

正丁醇(分析纯,天津康科德科技有限公司),水为重蒸馏水。

2 方法与结果^[3-9]

2.1 色谱条件及系统适应性 C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(45:55)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 246 nm。在此条件下补骨脂素与异补骨脂素及其他组分均达到基线分离, 理论塔板数以补骨脂峰计算应不低于 3 000。

2.2 检测波长的选择 分别取补骨脂素和异补骨脂素对照品适量, 加甲醇溶解制成每 1 mL 各含 0.05 mg 的溶液, 照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版一部附录 VA)^[1], 在 200 ~ 400 nm 波长处进行紫外扫描, 结果补骨脂素和异补骨脂素均在 247 nm 处有最大吸收, 参照《中国药典》2010 年版一部补骨脂的含量测定方法^[1], 选用 246 nm 作为检测波长。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取补骨脂素和异补骨脂素对照品各适量, 分别加甲醇制成质量浓度为 0.048 0(补骨脂素), 0.045 4 g·L⁻¹(异补骨脂素)的对照品溶液。

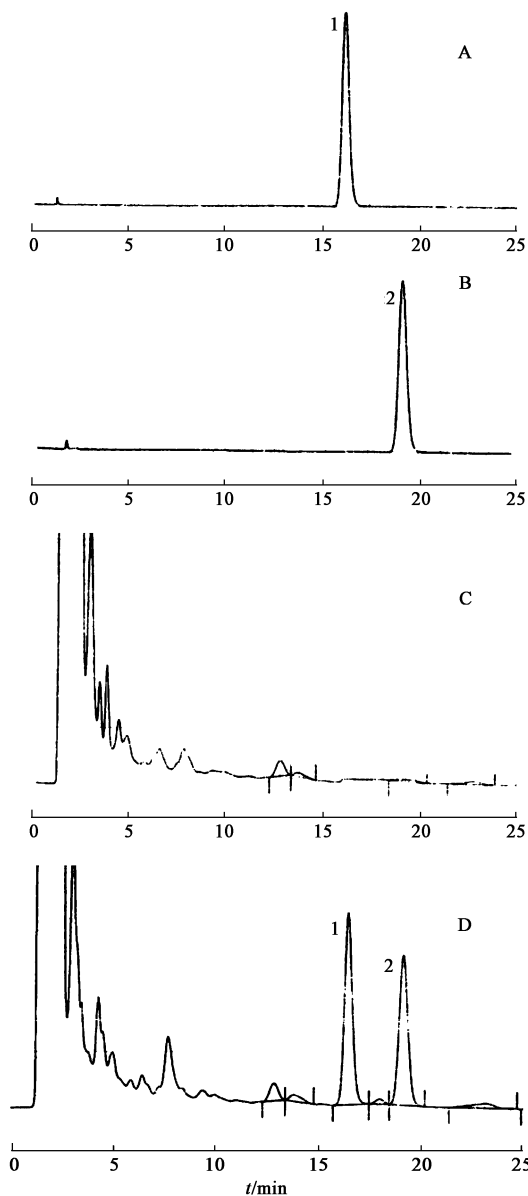
2.4 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 水饱和的正丁醇, 超声 40 min, 过滤, 精密量取续滤液 5 mL, 蒸干, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.5 阴性对照溶液的制备 按处方比例称取除补骨脂以外的其余药味, 按制备工艺制成缺补骨脂的阴性样品, 按上述供试品制备方法制成缺补骨脂的阴性溶液。

2.6 线性关系考察 精密吸取对照品溶液(补骨脂素 0.048 0 g·L⁻¹, 异补骨脂素 0.045 4 g·L⁻¹) 3, 6, 9, 12, 15 μL, 按拟定的色谱条件测定, 以峰面积积分为纵坐标, 补骨脂素、异补骨脂素量为横坐标分别绘制标准曲线, 计算得回归方程。补骨脂素 $Y = 3\,554\,295.1X + 47\,301.9$ ($r = 0.999\,8$); 异补骨脂素 $Y = 3\,621\,986.0X + 17\,969.3$ ($r = 0.999\,8$)。结果表明补骨脂素在 0.144 0 ~ 0.720 0 μg 进样量与峰面积呈良好的线性关系; 异补骨脂素在 0.136 2 ~ 0.681 0 μg 进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 阴性对照试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行分析, 结果供试品溶液色谱

中, 在与补骨脂素对照品和异补骨脂素对照品相同保留时间处有吸收峰, 而阴性对照溶液在与补骨脂素对照品和异补骨脂素对照品相同保留时间处未显吸收峰, 故认为无干扰, 见图 1。



A. 补骨脂素对照品; B. 异补骨脂素对照品; C. 缺补骨脂阴性对照;
D. 样品; 1. 补骨脂素; 2. 异补骨脂素

图 1 癸闭舒片的 HPLC

2.8 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 按上述色谱仪条件测定补骨脂素和异补骨脂素的峰面积。结果表明, 本方法精密度良好, 补骨脂素 RSD 0.27%, 异补骨脂素 RSD 0.60%。

2.9 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 按上述色谱条件分别于配制后 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 精密吸取 10 μL, 测定其峰面积, 考察样品溶液的稳定性, 结果表明, 供试品溶液 8 h 内基本稳定, 补骨脂素 RSD

0.31% ,异补骨脂素 RSD 0.44% 。

2.10 重复性试验 取同一批样品,按上述方法制备 5 份供试品溶液,分别测定其含量,结果表明本方法重复性较好,补骨脂素 RSD 1.26% ,异补骨脂素 RSD 1.05% 。

2.11 回收率试验 取已知含量的同一批号的样品(补骨脂素含量 $0.5903 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、异补骨脂素含量 $0.5380 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),除去包衣,研细,取 1.0 g,精密称定,分别精密加入补骨脂素对照品溶液($0.5897 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、异补骨脂素对照品溶液($0.5427 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 mL,按供试品溶液制备方法制成加样供试液。精密吸取加样供试液 10 μL ,注入液相色谱仪,按上述方法测定,计算回收率,见表 1,2。

表 1 补骨脂素回收率试验

称样量 /g	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.014 4	0.598 8	1.188 7	100.03		
0.992 3	0.585 8	1.167 1	98.58		
0.995 1	0.587 4	1.175 5	99.73		
1.001 7	0.591 3	1.179 7	99.78	99.16	1.21
1.004 9	0.593 2	1.165 0	96.96		
0.998 7	0.589 5	1.178 5	99.88		

注:补骨脂素对照品溶液加入量均为 1 mL,即 0.589 7 mg。

表 2 异补骨脂素加样回收率试验

称样量 /g	样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.014 4	0.545 7	1.087 5	99.83		
0.992 3	0.533 9	1.063 1	97.51		
0.995 1	0.535 4	1.075 8	99.58		
1.001 7	0.538 9	1.059 7	95.96	98.52	1.58
1.004 9	0.540 6	1.082 4	99.83		
0.998 7	0.537 3	1.071 2	98.38		

注:异补骨脂素对照品溶液加入量均为 1 mL,即为 0.542 7 mg。

2.12 样品测定 取 3 批样品(样品来源:天津药业集团新郑股份有限公司,批号分别为 120316,120317,120318),按上述供试品溶液制备方法制备,测定并计算本品中的补骨脂素和异补骨脂素含量,结果 3 个批号的样品中补骨脂素含量分别为 0.177,0.183,0.171 mg/片,异补骨脂素含量分别为 0.161,0.170,0.159 mg/片。

3 讨论

流动相的选择分别以甲醇-水(55:45)、乙腈-水(36:64)和甲醇-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液

(45:55)为流动相,结果甲醇-水(55:45)分离效果不好,未达到基线分离;乙腈-水(36:64)补骨脂素和异补骨脂素与其他色谱峰均不能达到基线分离。而甲醇-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(45:55),补骨脂素和异补骨脂素与其他色谱峰均能达到基线分离。故选用甲醇-0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(45:55)为流动相。

超声提取时间的确定分别对超声 20,40,60 min 进行试验,结果表明 40,60 min 结果相差不大,40 min 补骨脂素和异补骨脂素就能完全溶出,而 20 min 明显低于 40,60 min,因此选择超声 40 min 为补骨脂素和异补骨脂素的提取时间。

提取溶剂的选择分别用甲醇、50% 甲醇和水饱和的正丁醇作为提取溶剂,结果水饱和的正丁醇提取的供试品色谱中补骨脂素和异补骨脂素含量均高于甲醇、50% 甲醇提取的供试品。因此选用水饱和的正丁醇为提取溶剂。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:174,附录 30,附录 36.

[2] 国家药典委员会.国家药品标准新药转正标准第 17 册[S].北京:人民卫生出版社,2006:143.

[3] 叶英响.HPLC 测定癉闭舒片中补骨脂素的含量[J].中国中药杂志,2010,35(21):2850.

[4] 李守拙,潘海峰.薄层扫描法对癉闭舒胶囊中补骨脂素和异补骨脂素的含量测定[J].中成药,2003,25(8):627.

[5] 殷智,张怀.HPLC 法测定益宫止血口服液中补骨脂素和异补骨脂素的研究[J].湖北民族学院学报:医学版,2001,18(3):18.

[6] 刘起华,文谨,孙玉雯,等.正交试验法优选补肾益髓颗粒提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):8.

[7] 席海为,马强,李强,等.HPLC 同时测定都梁滴丸中的阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):81.

[8] 向阳,张雪琼,黄敏,等.高效液相色谱法测定驱白巴布片片中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J].中国现代应用药学,2006,23(1):60.

[9] 张广利.RP-HPLC 法测定温胃舒泡腾颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J].安徽医药,2010,14(11):1288.

[责任编辑 邹晓翠]