

HPLC 法测定关节康片中补骨脂素和异补骨脂素的含量

黄月纯^{*}, 樊粤光, 唐洪梅, 孙亦群, 曾惠芳
(广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立关节康片中补骨脂素和异补骨脂素的含量方法。方法: 采用 Hypersil ODS 色谱柱(250 × 4.0mm, 5 μ m); 以甲醇-水(43: 57)为流动相; 检测波长为 245nm; 流速为 1mL/min; 柱温为室温。结果: 补骨脂素与异补骨脂素分别在 0.0127~0.4064 μ g($r=0.9999$)、0.01152~0.3686 μ g($r=0.9999$) 范围内线性关系良好, 加样回收率分别为 97.9% (RSD=2.1%), 102.3% (RSD=1.9%)。结论: 方法简便、结果准确, 可用于关节康片的质量控制指标之一。

[关键词] 关节康片; 补骨脂素; 异补骨脂素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)03-0020-02

关节康片中含有补骨脂、羌活、独活、全蝎、牛膝、当归等多味药组成, 具有补肾壮骨, 通络止痛的功效, 主治退行性关节病, 颈椎病, 腰腿痛。为控制该产品质量, 建立了补骨脂药材及关节康片中补骨脂素、异补骨脂素的含量测定方法, 可作为关节康的质控标准之一。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(HP-1100, 安捷伦); 二极管阵列检测器(DAD)。

1.2 试剂 关节康片(广州中医药大学第一附属医院制剂室生产); 补骨脂素对照品(739-200209); 异补骨脂素对照品(738-200108)(购自中国药品生物制品检定所); 补骨脂药材, 分别购于广州致信药业有限公司, 广州杏林药业有限公司, 广州市药材公司等。甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS (250 × 4.0mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水(43: 57); 柱温: 室温; 检测波长: 245nm; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 10 μ L。结果表明在此条件下补骨脂中的两个主要成分能与其他成分达到较好的分离效果, 理论塔板数均大于 2500, 关节康片中的阴性无干扰。结果见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取补骨脂素、异补骨脂素适量, 用甲醇溶解并分别配制成每

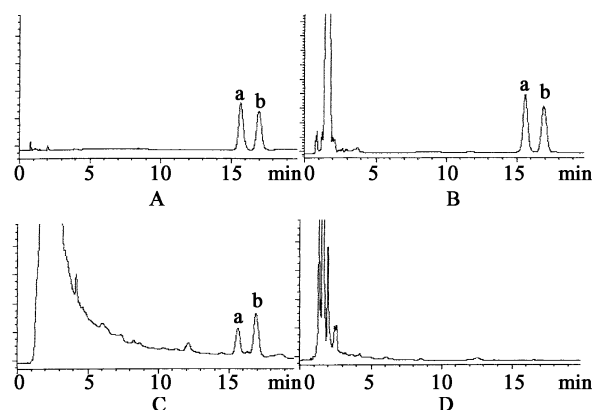


图 1 关节康片的 HPLC 图谱

A 为对照品; B 为补骨脂药材; C 为关节康片; D 为阴性对照
a 为补骨脂素; b 为异补骨脂素

1mL 各含 10 μ g 的混合对照品溶液。

2.3 药材供试品溶液的制备 取补骨脂药材细粉约 0.1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25mL, 称重, 浸泡过夜, 超声处理 30min, 取出, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 样品供试品溶液的制备 取本品除去包衣, 研细, 精密称取约 2.5g 的量, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25mL, 称重, 超声处理 30min, 取出, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 线性关系考察 分别精密称取补骨脂素、异补骨脂素适量, 用甲醇溶解并配制成每 1mL 各含 50.8 μ g, 46.08 μ g 的混合对照品溶液。分别精密吸取上述混合对照品溶液 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8mL 至 10mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得系列浓度的混合对照品溶液。精密吸取各浓度的对照品溶液 10 μ L, 按上述色谱条件测定峰面积, 以进样量(μ g)为横坐标,

[收稿日期] 2005-05-09

[通讯作者] 黄月纯, Tel: (020) 36591724; E-mail: huangyuechun@

以峰面积(A)为纵坐标,求得补骨脂素的回归方程为 $Y = 7409.753X + 4.299$, $r = 0.9999$, 线性范围为 $0.0127 \sim 0.4064 \mu\text{g}$ 。异补骨脂素为 $Y = 7148.395X + 2.649$, $r = 0.9999$, 线性范围为 $0.01152 \sim 0.3686 \mu\text{g}$ 。

2.6 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液(含补骨脂素 $10.16 \mu\text{g}/\text{mL}$, 异补骨脂素 $9.216 \mu\text{g}/\text{mL}$) $10 \mu\text{L}$, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 结果补骨脂素、异补骨脂素峰面积 RSD 分别为 1.1%、1.2%, 表示精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 分别在 0, 6, 12, 18, 24h 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 结果补骨脂素、异补骨脂素峰面积平均值分别为 504.963、679.091, RSD 分别为 1.0%、0.5%, 表明补骨脂素和异补骨脂素在 24h 内较稳定。

2.8 重复性试验 取同一批的样品(批号 20020928) 5 份, 按含量测定项下方法平行试验, 结果补骨脂素、异补骨脂素的含量 RSD 分别为 1.6%、1.6%, 表明方法具有良好的重复性。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号 20020928) 除去包衣, 研细, 精密称取约 1.25g, 加入一定量的补骨脂素、异补骨脂素对照品, 按供试品溶液的制备及含量测定方法同法操作, 结果见表 1。

表 1 关节康片加样回收率试验结果 ($n = 6$)

成分	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
补骨脂素	0.0922	0.0920	0.1824	98.0	97.9	2.1
	0.0922	0.0920	0.1799	95.3		
	0.0922	0.0920	0.1801	95.5		
	0.0922	0.0920	0.1831	98.8		
	0.0923	0.0920	0.1837	99.3		
	0.0922	0.0920	0.1847	100.5		
异补骨脂素	0.1318	0.1400	0.2755	102.6	102.3	1.9
	0.1317	0.1400	0.2780	104.5		
	0.1318	0.1400	0.2769	103.6		
	0.1318	0.1400	0.2743	101.8		
	0.1319	0.1400	0.2754	102.5		
	0.1318	0.1400	0.2700	98.7		

2.10 样品的测定 分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 按外标法计算含量, 结果见表 2。

2.11 补骨脂药材的测定 分别精密吸取对照品溶液及药材供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 按外标法计算含量, 结果见表 3。

表 2 样品含量测定结果(mg/片, $n = 2$)

批号	补骨脂素	异补骨脂素	总量	RSD(%)
20050110	0.0201	0.0307	0.0508	1.7
20040511	0.0092	0.0138	0.0230	0.5
20040624	0.0132	0.0248	0.0380	0.1
20040814	0.0170	0.0240	0.0410	1.1
20040909	0.0175	0.0308	0.0483	1.0
20041022	0.0210	0.0280	0.0490	1.3
20041105	0.0155	0.0276	0.0431	1.3
20050115	0.0136	0.0231	0.0367	2.4
20050121	0.0133	0.0234	0.0367	0.2
20050127	0.0132	0.0233	0.0365	0.2

表 3 补骨脂药材含量测定结果(%, $n = 2$)

批次	补骨脂素	异补骨脂素	总量	RSD(%)
1	0.377	0.331	0.708	3.3
2	0.345	0.314	0.659	0.9
3	0.698	0.595	1.293	3.6
4	0.394	0.346	0.740	3.4
5	0.455	0.382	0.837	2.1
6	0.390	0.352	0.742	1.9
7	0.408	0.378	0.786	1.2
对照药材	0.642	0.738	1.380	2.8

3 小结与讨论

补骨脂素和异补骨脂素对照品溶液在 $190 \sim 400 \text{nm}$ 波长范围内进行了光谱扫描, 结果表明均在 245nm 和 295nm 处有最大吸收, 245nm 灵敏度较高, 故选择 245nm 为测定波长。曾试验比较超声提取、回流提取、索氏回流的提取效果, 结果三种方法提取效果基本一致, 故采用简便的超声提取方法。补骨脂药材则浸泡过夜再超声提取效果较好。

文献[1]报道, 补骨脂素和异补骨脂素的含量分别在 $0.2\% \sim 0.7\%$ 和 $0.2\% \sim 0.6\%$ 之间。试验表明同一批药材中补骨脂素含量一般高于异补骨脂素含量, 而在关节康片制剂中则相反。文献[2]报道, 在工艺过程中, 随着加热时间的延长, 补骨脂素含量下降, 异补骨脂素含量升高。提示关节康片在制剂生产过程中, 可能发生了异构体的转化。

[参考文献]

- [1] 王永林, 王培民, 孙挺, 等. HPLC 法测定补肾益脑胶囊中补骨脂素和异补骨脂素含量[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(10): 589-591.
- [2] 苏子仁, 徐必达, 刘庆思, 等. 补骨脂素、异补骨脂素在骨康提取精制过程中的化学转化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(6): 1-2.