

高效液相色谱法测定天杞补肾胶囊中马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的含量

王玉林,夏方亮

(滨州市食品药品检验检测中心,山东 滨州 256600)

摘要:目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定天杞补肾胶囊中马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的含量测定方法。**方法** 用 C_{18} 柱为固定相,以甲醇-水(42:58)为流动相,检测波长为240 nm。**结果** 马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素分别在5.06~126.5、0.527 5~13.187 0、0.480 8~12.020 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, R^2 分别为1.000、1.000、1.000($n=6$),其平均回收率分别为98.93%、100.09%和98.97%。**结论** 该方法具有较高的准确性和专属性。

关键词:天杞补肾胶囊;马钱苷;补骨脂素;异补骨脂素

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2016.10.013

Determination of loganin, psoralen and isopsoralen in tianqibushen capsules by HPLC

WANG Yulin, XIA Fangliang

(Food and Drug Inspection and Testing Center, Binzhou, Shandong 256600, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of Loganin, Psoralen and Isopsoralen in Tianqibushen Capsules by HPLC. **Methods** The C_{18} column was used, the mobile phase was methanol-water(42:58), and the detection wavelength was 240 nm. **Results** The standard curves of Loganin, Psoralen and Isopsoralen were linear in the ranges of 5.06~126.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R^2=1.000$, $n=6$), 0.527 5~13.187 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R^2=1.000$, $n=6$) and 0.480 8~12.020 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R^2=1.000$, $n=6$) respectively, and the average recoveries were 98.93%, 100.09% and 98.97%. **Conclusion** The method is highly accurate and specific.

Key words: Tianqibushen capsule; Loganin; Psoralen; Isopsoralen

天杞补肾胶囊由哈尔滨同一堂药业有限公司生产,处方中有淫羊藿、阳起石、补骨脂、山茱萸、枸杞子等多味中药材,临床用于肾阴阳两虚,症见腰膝酸软、头晕耳鸣、倦怠乏力等。原质量标准采用高效液相色谱法测定淫羊藿苷的含量,只能对方中的淫羊藿进行质量控制,为提高本品质量标准,增强对方中其他药材的质控力度,本研究采用高效液相色谱法测定处方中山茱萸主要成分马钱苷和补骨脂主要成分补骨脂素、异补骨脂素的含量,可作为原标准的有效补充。马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素能很好分离,理论板数较高,处方中的其他药材成分无干扰,回收率高。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, Prominence SPD-20A/UV-VIS 检测器;天杞补肾胶囊为哈尔滨同一堂药业有限公司生产,批号 04140402、04140409、04140512;马钱苷对照品(批号 111640-200604,纯度为 100.0%)、补骨脂素对照品(批号 110739-201416,纯度为 99.9%)、异补骨脂素对照

品(批号 110738-201313,纯度为 100.0%)均购自中国食品药品检定研究院,甲醇为色谱纯(美国 TE-DIA 公司),水为纯化水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:依利特 Sinocrom ODS-BP (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(42:58)^[1-3];流速:1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:240 nm;进样量:10 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取马钱苷对照品 25.3 mg 置 50 mL 量瓶中、补骨脂素对照品 13.20 mg 置 250 mL 量瓶中、异补骨脂素对照品 12.02 mg 置 250 mL 量瓶中,加甲醇适量使溶解并稀释至刻度,作为对照品贮备液。精密量取三份对照品贮备液各 1 mL,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品内容物,混匀,研细,取约 0.8 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30

min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方比例配制不含山茱萸或补骨脂的样品,同“2.2.2”项下供试品溶液的制备项下方法制备阴性样品溶液。

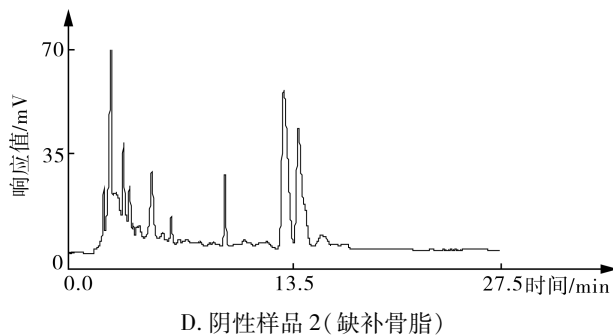
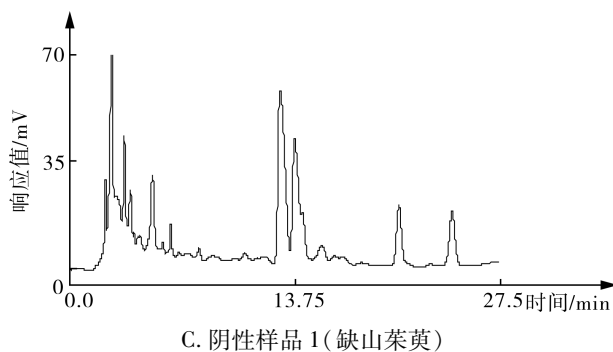
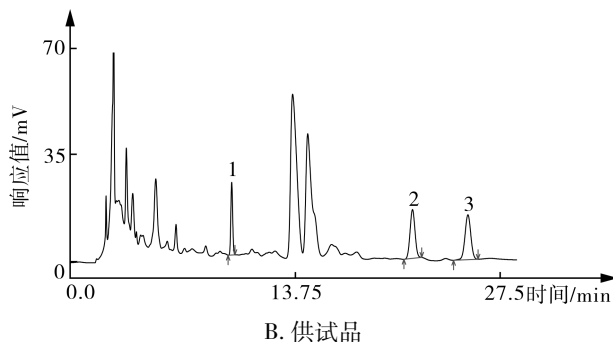
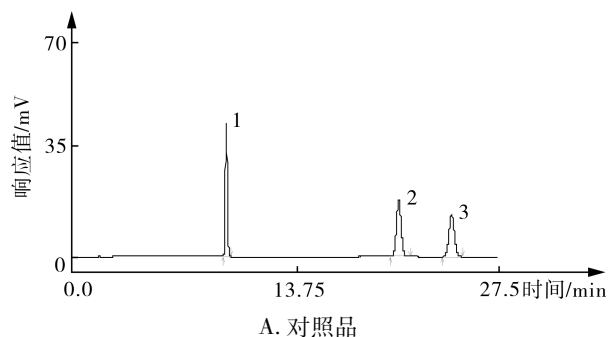
2.3 专属性试验 取“2.2.1 对照品溶液”、“2.2.2 供试品溶液”和“2.2.3 阴性样品溶液”,按“2.1 色谱条件”进样测定,记录色谱图,马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素具有较高的分离度和理论板数,马钱苷保留时间约为 10.8 min,理论板数高于 25 000,补骨脂素保留时间约为 23.0 min,理论板数高于 20 000,异补骨脂素保留时间约为 26.7 min,理论板数高于 22 000。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 精密量取马钱苷、补骨脂素、异补骨脂素对照品贮备液各 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,进样量 10 μ L,以马钱苷、补骨脂素、异补骨脂素的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),得回归方程分别为:马钱苷: $Y = 8512.1X - 1074.7, R^2 = 1.000 (n=6)$;补骨脂素: $Y = 81855X - 1652, R^2 = 1.000 (n=6)$;异补骨脂素: $Y = 77279X - 856.64, R^2 = 1.000 (n=6)$ 。结果表明,马钱苷浓度在 5.06 ~ 126.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、补骨脂素浓度在 0.527 5 ~ 13.187 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、异补骨脂素浓度在 0.480 8 ~ 12.020 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性良好。

2.5 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液,注入液相色谱仪,连续进样 5 次,进样量 10 μ L,记录马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的峰面积,RSD 分别为 0.07%、0.05%、0.05%。

2.6 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液,按“2.1 色谱条件”分别于 0、3、6、12、24 h 进样,进样量 10 μ L,记录马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的峰面积,RSD 分别为 0.16%、0.25%、0.19%,表明供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.7 重复性试验 称取批号为 04140402 的天杞补肾胶囊内容物 6 份,每份约 0.8 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1 色谱条件”测定马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的平均含量并计算 RSD,结果为:马钱苷平均含量 2.751 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 0.22%;补骨脂素平均含量 0.291 6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 0.12%;异补骨脂素平均含量 0.328 9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 为 0.21%。



注:1:马钱苷;2:补骨脂素;3:异补骨脂素。

图1 天杞补肾胶囊 HPLC 图

2.8 加样回收率试验 称取已知含量的天杞补肾胶囊(马钱苷含量 2.751 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,补骨脂素含量 0.2916 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,异补骨脂素含量 0.328 9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)6 份,每份约 0.4 g,精密称定,分别精密加入“2.2.1”项下马钱苷对照品贮备液 2 mL、补骨脂素对照品贮备液 2 mL、异补骨脂素对照品贮备液 3 mL,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备得浓度约为样品浓度 100% 的供试品溶液,按上述方

法测定马钱苷、补骨脂素、异补骨脂素的含量,计算回收率,结果见表1~3。

表1 天杞补肾胶囊中马钱苷加标回收率试验结果

取样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.402 3	1.107	1.012	2.085	96.95	98.93	1.8
0.405 1	1.114	1.012	2.136	100.86		
0.403 7	1.111	1.012	2.114	99.23		
0.401 1	1.103	1.012	2.096	98.24		
0.402 8	1.108	1.012	2.089	97.19		
0.406 3	1.118	1.012	2.142	101.10		

表2 天杞补肾胶囊中补骨脂素加标回收率试验结果

取样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.402 3	0.117 3	0.105 5	0.221 4	98.80	100.09	1.6
0.405 1	0.118 1	0.105 5	0.224 7	100.91		
0.403 7	0.117 7	0.105 5	0.223 6	100.32		
0.401 1	0.117 0	0.105 5	0.224 3	101.57		
0.402 8	0.117 5	0.105 5	0.220 1	97.57		
0.406 3	0.118 5	0.105 5	0.225 6	101.37		

表3 天杞补肾胶囊中异补骨脂素加标回收率试验结果

取样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.402 3	0.133 2	0.144 2	0.278 8	101.73	98.97	1.9
0.405 1	0.133 2	0.144 2	0.276 5	99.30		
0.403 7	0.132 8	0.144 2	0.277 4	100.32		
0.401 1	0.131 9	0.144 2	0.274 1	98.47		
0.402 8	0.132 5	0.144 2	0.273 5	97.60		
0.406 3	0.133 6	0.144 2	0.273 0	96.38		

2.9 样品含量测定 取3批样品,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批4份,按“2.1”项下色谱条件对本品进行含量测定,计算平均含量和RSD,结果见表4。

表4 天杞补肾胶囊中马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的平均含量

批号	马钱苷		补骨脂素		异补骨脂素	
	含量 /mg·g ⁻¹	RSD /%	含量 /mg·g ⁻¹	RSD /%	含量 /mg·g ⁻¹	RSD /%
04140402	2.751	0.57	0.291 6	0.38	0.328 9	0.33
04140409	2.784	0.26	0.295 7	0.47	0.330 2	0.49
04140512	2.736	0.38	0.289 5	0.60	0.327 7	0.36

2.10 检测限(LOD)与定量限(LOQ) 取“2.2.1”项下马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的对照品贮备液,稀释一定倍数后进样测定,以信噪比3:1计算马钱苷、补骨脂素和异补骨脂素的检测限分别为0.253、0.132、0.120 ng;以信噪比10:1计算定量限分别为1.012、0.396、0.481 ng。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 将三种对照品贮备液用甲醇稀释后进行紫外图谱扫描,马钱苷在238 nm波长处有最大吸收,补骨脂素在246 nm和294 nm波长处有最大吸收,在327 nm处有一肩峰,异补骨脂素在247 nm和300 nm波长处有最大吸收,为提高定量的准确性,提高回收率,本文选用三种成分均响应较高的240 nm作为检测波长,试验取得了令人满意的结果。

3.2 流动相和色谱柱的选择 补骨脂素和异补骨脂素测定流动相多用甲醇-水^[4-5]或乙腈-水^[6],马钱苷多用乙腈-水^[7-8],也有文献采用四氢呋喃-乙腈-甲醇-0.05%磷酸溶液^[9]和甲醇-磷酸盐缓冲液^[10],本研究经试验筛选,采用C₁₈柱为固定相和甲醇-水为流动相对三种成分分离最好,保留时间适宜,理论板数较高且经济环保。

3.3 提取方法的选择 在提取方式上,本研究尝试了回流^[8]、超声^[4-6]等,并考察了回流时间和超声时间,实验结果表明,回流和超声的测定结果无明显差异,当超声时间小于20 min时,三种成分含量测定结果均偏低,超声30 min以上含量较高且稳定,故本文的提取方法定为超声30 min。

3.4 耐用性 分别用两根色谱柱依利特Sinochrom ODS-BP(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Thermo BDS HYPERSIL C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)在两台高效液相色谱仪(日本岛津LC-20AT、美国Agilent1260)上进行耐用性试验考察,试验结果表明,上述两种色谱柱和两个型号的高效液相色谱仪均可取得满意的实验结果。

参考文献

[1] 刘松青,成丹. 高效液相色谱法测定药材及中成药中补骨脂素与异补骨脂素含量[J]. 中草药,1994,25(7):355-356.

[2] 陈玉敏,刘云. 高效液相色谱法测定壮骨关节丸中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 药物分析杂志,1999,19(6):391-393.

[3] 王永林,王培民,孙挺,等. 高效液相色谱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):589-594.

[4] 郑菁,陈华庭,徐楚鸿. 反相高效液相色谱法测定强筋健骨胶囊中补骨脂素及异补骨脂素的含量[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(5):277-278.