

HPLC法测定补骨脂-青龙衣酊中补骨脂素的含量^Δ

唐 菱*,赵瑞亭[#](重庆市中医院药剂科,重庆 400011)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)06-0805-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.06.27

摘 要 目的:建立测定补骨脂-青龙衣酊中补骨脂素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Shim-pack VP-ODS C₁₈,流动相为甲醇-水(60:40, V/V),流速为 0.8 ml/min,检测波长为 246 nm,柱温为 25 ℃,进样量为 20 μl。结果:补骨脂素的检测质量浓度线性范围为 2.49~39.90 μg/ml;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2.00%;加样回收率范围为 97.23%~100.58%,RSD=1.17%(n=6)。结论:该方法快速简便、准确可靠,可用于补骨脂-青龙衣酊中补骨脂素的含量测定。
关键词 高效液相色谱法;补骨脂;青龙衣;补骨脂素

Content Determination of Psoralen in Psoralea-pericarpium Juglates Liniment by HPLC
TANG Ling, ZHAO Ruiting (Dept. of Pharmacy, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of psoralen in Psoralea-pericarpium juglates liniment. METHODS: HPLC was performed on the column of Shim-pack VP-ODS C₁₈ with mobile phase of methanol-water (60:40, V/V) at a flow rate of 0.8 ml/min, detection wavelength was 246 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of psoralen was 2.49-39.90 μg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.00%; recovery was 97.23%-100.58% (RSD=1.17%, n=6). CONCLUSIONS: The method is fast, simple, accurate and reliable, and can be used for the content determination of psoralen in Psoralea-pericarpium juglates liniment.
KEYWORDS HPLC; Psoralea; Pericarpium juglates; Psoralen

=====

量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(2):25.

[3] 马悦颖,尚明英,李沧海,等.桂枝汤有效成分苯丙烯类化合物干预 IL-1 β 刺激小鼠脑微血管内皮细胞释放 PGE₂ 的构效关系[J].药学学报,2007,42(7):798.

[4] 周硕,霍海如,郭建友,等.桂枝汤对体温整合调节作用的活性成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(9):865.

[5] Zhou S, Liang H, Cai SQ, et al. Studies on the chemical constituents of the active fraction of Gui-Zhi decoction [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2007, 16 (1):24.

[6] Huang H, Kuo K, Hsieh Y. Determination of cinnamaldehyde, cinnamic acid, paeoniflorin, glycyrrhizin and [6]-gingerol in the traditional Chinese medicinal preparation Kuei-chih-tang by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 771(1/2):267.

[7] 杨林,胡华明.HPLC测定桂枝汤不同配伍中桂皮酸和桂

皮醛的含量[J].浙江中医药大学学报,2009,33(6):879.

[8] 柏冬,范斌,牛晓红,等.HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸[J].中草药,2010,41(3):387.

[9] 柏冬,范斌,牛晓红,等.多波长高效液相色谱法同时测定桂枝汤中5种有效成分的含量[J].药物分析杂志,2010,30(1):1.

[10] 陈莹蓉,马越鸣,张宁.桂枝汤类方化学成分含量研究[J].中成药,2010,32(6):996.

[11] 王福霞,敖书华,杨林,等.桂枝汤中桂枝不同配伍对桂皮酸含量的影响[J].中国药房,2010,21(27):2522.

[12] 李梅珍,唐樑,黄玉宇,等.多指标正交实验优选桂枝汤最佳煎煮工艺[J].中华中医药学刊,2014,32(6):1451.

[13] 周红涛,骆亦奇,胡世林,等.赤芍与白芍的化学成分含量比较研究[J].中国药学杂志,2003,38(9):654.

[14] 张建军,李伟,王丽丽,等.赤芍和白芍功用及化学成分研究述评[C]//第六次临床中药学学术年会暨临床中药学科建设经验交流论文集.郑州:中华中医药学会,2013:391.

Δ 基金项目:重庆市卫生局科研资助课题(No.2006-b-11)
* 主管药师,硕士。研究方向:医院制剂及其质量。电话:023-67538624。E-mail:2000tangling@163.com
通信作者:主任药师。研究方向:医院制剂及其质量。电话:023-63715677。E-mail:499362737@qq.com

(收稿日期:2015-07-13 修回日期:2015-09-04)
(编辑:张 静)

中医理论认为,白癜风是由于肝肾不足、精亏血少、瘀血阻络所造成的^[1-3],患病率为0.5%~2%^[4]。补骨脂-青龙衣酊是重庆市中医院自主研发的医院制剂,临床上用于治疗白癜风^[5],主要由补骨脂、青龙衣等药材组成,兼具补肾助阳的功效。补骨脂与长波紫外线发生光敏反应可产生黑色素^[6-8]。青龙衣中的核桃青皮素具有染色的作用^[9],涂擦于患处可使皮肤着色与周边正常肤色接近,改善外观^[10]。虽然,国内已有许多补骨脂含量测定的报道^[11-13],但这些方法只是单独测定补骨脂药材中的含量,或者所测药物样品前处理复杂。补骨脂-青龙衣酊为中药复方制剂,制剂中除含有补骨脂外,尚有其他中药成分。因此,为保证制剂质量和临床用药安全,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法建立了测定补骨脂-青龙衣酊中补骨脂素含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-10AT型HPLC仪,包括LC-10AT泵、SPD-10A(190~600 nm)型检测器、N-2000型双通道色谱工作站(日本Shimadzu公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

补骨脂-青龙衣酊(重庆市中医院药剂科自制,批号:100301、100501、100901);补骨脂素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110739-200511,纯度>98%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水溶液(60:40,V/V);流速:0.8 ml/min;检测波长:246 nm;柱温:25℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取补骨脂素对照品适量,置于100 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为0.199 5 mg/ml的补骨脂素对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取样品5 ml,置于5 ml量瓶中,水浴(98~100℃)5 min,蒸干,加甲醇溶解,置于100 ml棕色量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得供试品贮备液。取上述供试品贮备液5 ml,置于50 ml棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,放置5 min,取上清液用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按补骨脂-青龙衣酊配方比例和处方工艺制备缺补骨脂素的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 专属性试验

分别精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对

照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,供试品溶液与对照品溶液在保留时间为10.6 min处有相同的特征峰,而阴性对照溶液无此特征峰;补骨脂素峰与相邻峰分离度>1.5,且补骨脂素的峰形对称,表明补骨脂素出峰处无其他吸收峰干扰。

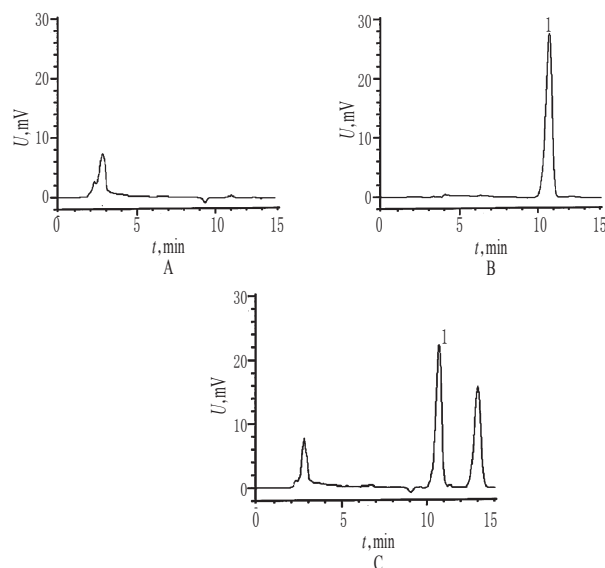


图1 高效液相色谱图

A.阴性对照;B.对照品;C.供试品;1.补骨脂素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.negative control;B.reference substance;C. test sample; 1.psoralen

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液1.25、2.5、5.0、10.0、20.0 ml,分别置于100 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度分别为2.49、4.99、9.98、19.95、39.90 μg/ml的系列对照品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以补骨脂素质量浓度(x,μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得补骨脂素的回归方程为 $y=140\ 858x+36\ 531$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,补骨脂素的检测质量浓度线性范围为2.49~39.90 μg/ml。

2.5 定量限和检测限考察

按信噪比为10:1计算,补骨脂素的定量限为0.98 μg/ml;按信噪比为3:1计算,补骨脂素的检测限为0.56 μg/ml。

2.6 精密度试验

取“2.4”项下补骨脂素质量浓度为9.98 μg/ml的标准溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,补骨脂素峰面积的RSD=0.80%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品(批号:100901)溶液适量,于放置0、2、4、6、8、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,补骨脂素峰面积的RSD=1.48%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:100901)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算补骨脂素的含量。结果,补骨脂素的平均含量为1.13 mg/ml,RSD=1.16%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:100901)5.0 ml,共6份,分别精密加入“2.2.1”项下补骨脂素对照品各适量,再按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

取样量, ml	样品含 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回 收率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
5.0	5.65	5.61	11.182	98.61	98.48	1.17
5.0	5.65	5.73	11.221	97.23		
5.0	5.65	5.52	11.202	100.58		
5.0	5.65	5.69	11.267	98.72		
5.0	5.65	5.62	11.143	97.74		
5.0	5.65	5.70	11.238	98.04		

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并测定补骨脂素的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of contents determination of samples(n=3)

样品批号	补骨脂素,mg/ml	RSD, %
100301	1.20	0.80
100501	1.25	0.54
100901	1.13	1.16

3 讨论

文献报道以HPLC法测定不同药品中补骨脂素含量均采用C₁₈色谱柱,流动相有甲醇-水^[13-15]、乙腈-水^[16-17]、甲醇-0.6%醋酸^[18]、甲醇-0.015%磷酸^[19],补骨脂素保留时间约在12~31 min之间。笔者考察了上述流动相,发现增加水相的比例,流动相极性增大,出峰时间延长;且上述流动相在试验中都存在分离度不够或拖尾现象,这可能与本药物中其他成分的影响有关。故笔者通过调节流动相比比例,最终选用甲醇-水溶液(60:40,V/V)作为本研究的流动相。

综上所述,本方法快速简便、准确可靠,可用于补骨脂-青龙衣酊中补骨脂素的含量测定。

参考文献

[1] 乔树芳.白癜风中医发病机制和治疗研究新进展[J].皮肤病与性病,2009,31(3):26.
[2] 周峻伟,姚卫海,郭玉红,等.从肝论治白癜风病因病机浅

析[J].实用中医内科杂志,2009,23(10):6.
[3] 于晓梅.白癜风从肝肾论治90例临床观察[J].北京中医杂志,2002,21(6):345.
[4] Krüger C, Schallreuter KU. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/ adolescents and adults[J]. *Int J Dermatol*.2012,51(10):1 206.
[5] 赵瑞亭,陈晓明,侯晓军.补骨脂-青龙衣酊的制备工艺研究[J].中国药房,2008,19(30):2 349.
[6] 熊鸿燕.补骨脂素的光敏反应[J].中国消毒学杂志,2002,19(4):231.
[7] 吴疆,魏巍,袁永兵.补骨脂的化学成分和药理作用研究进展[J].药物评价研究,2011,34(3):217.
[8] 李洪武,朱文元.治疗白癜风复方中药体外对蘑菇酪氨酸酶活性的作用[J].临床皮肤科杂志,2000,29(3):133.
[9] 黄玥,胡卫平,赵东保,等.核桃青果皮色素成分分析及稳定性研究[J].中国农学通报,2012,28(30):272.
[10] 李淑芳,孙光春,鲍淑娟,等.核桃皮酊剂毒性试验研究[J].贵阳医学院学报,1997,22(4):356.
[11] 余平,刘长蛟,乔春峰,等.利用超高压技术提取补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素[J].食品科学,2011,32(20):39
[12] 卢彦芳,安静,蒋晔.微波萃取快速分析补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素[J].中国中药杂志,2011,36(9):1 158.
[13] 刘素玲,蔡益锐.HPLC法测定归芍通络合剂中补骨脂素、异补骨脂素的含量[J].中国药师,2012,15(5):668.
[14] 覃建明,莫文电,谭忠谋.RP-HPLC法测定老年咳喘片中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J].世界中医药,2010,5(3):221.
[15] 任青花,赵剑锋,赵承孝.白癜风浓缩丸质量标准的研究[J].山西医科大学学报,2012,43(4):268.
[16] 周岚,乙引,伍庆,等.HPLC同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定C、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素[J].中草药,2011,42(10):1 998.
[17] 宣铁锋.高效液相色谱法测定生发酊中补骨脂素和异补骨脂素含量[J].中国药业,2012,21(18):37.
[18] 张婷,龚志成,唐芬芬.补骨脂微乳液中补骨脂素与异补骨脂素的含量测定[J].医药导报,2012,31(12):1 619.
[19] 唐丽琴,张善堂,陈象青,等.HPLC法测定不同来源补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J].中国药师,2011,14(3):377.

(收稿日期:2015-09-09 修回日期:2015-12-16)

(编辑:刘 柳)