

HPLC法同时测定蟾龙定喘合剂中5种成分的含量

孙 辉^{1*},何胜利^{2#}(1.南阳市中心医院急诊内科,河南 南阳 473009;2.遂成药业股份有限公司,河南 新郑 451150)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3880-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.46

摘要 目的:建立同时测定蟾龙定喘合剂中补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Welch Materials C₁₈,流动相为乙腈-甲醇(1:1, V/V)-水(梯度洗脱),流速为0.9 ml/min,检测波长为246 nm(补骨脂素和异补骨脂素)、270 nm(朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷),柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的检测质量浓度线性范围分别为8.24~164.80 μg/ml($r=0.999\ 7$)、5.15~103.00 μg/ml($r=0.999\ 3$)、4.06~81.20 μg/ml($r=0.999\ 6$)、5.88~117.60 μg/ml($r=0.999\ 5$)、4.90~98.00 μg/ml($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.385、0.179、0.124、0.218、0.348 μg/ml,检测限分别为0.127、0.059、0.041、0.072、0.115 μg/ml;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为97.93%~100.06%(RSD=0.80%, $n=6$)、96.91%~100.16%(RSD=1.37%, $n=6$)、96.95%~99.63%(RSD=0.98%, $n=6$)、96.69%~99.33%(RSD=1.03%, $n=6$)、96.76%~98.53%(RSD=0.70%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、结果可靠,适用于同时测定蟾龙定喘合剂中补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的含量。

关键词 高效液相色谱法;蟾龙定喘合剂;补骨脂素;异补骨脂素;朝藿定B;朝藿定C;淫羊藿苷

Simultaneous Determination of 5 Components in Chanlong Dingchuan Mixture by HPLC

SUN Hui¹, HE Shengli²(1.Dept. of Emergency Medicine, Nanyang Center Hospital, Henan Nanyang 473009, China; 2.Suicheng Pharmaceutical Co., Ltd., Henan Xinzheng 451150, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of psoralen, isopsoralen, epimedin B, epimedin C and icariin in Chanlong dingchuan mixture. METHODS: HPLC was performed on the column of Welch Materials C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - methanol (1:1, V/V)-water (gradient elution) at a flow rate of 0.9 ml/min, the detection wavelength was 246 nm (psoralen, isopsoralen) and 270 nm (epimedin B, epimedin C and icariin), column temperature was 30 ℃, injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 8.24-164.80 μg/ml for psoralen ($r=0.999\ 7$), 5.15-103.00 μg/ml for isopsoralen ($r=0.999\ 3$), 4.06-81.20 μg/ml for epimedin B ($r=0.999\ 6$), 5.88-117.60 μg/ml for epimedin C ($r=0.999\ 5$) and 4.90-98.00 μg/ml for icariin ($r=0.999\ 8$); the limits of quantitation were 0.385 μg/ml, 0.179 μg/ml, 0.124 μg/ml, 0.218 μg/ml and 0.348 μg/ml, limits of detection were 0.127 μg/ml, 0.059 μg/ml, 0.041 μg/ml, 0.072 μg/ml and 0.115 μg/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 97.93%-100.06% (RSD=0.80%, $n=6$), 96.91%-100.16% (RSD=1.37%, $n=6$), 96.95%-99.63% (RSD=0.98%, $n=6$), 96.69%-99.33% (RSD=1.03%, $n=6$) and 96.76%-98.53% (RSD=0.70%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and reliable, and suitable for the simultaneous determination of psoralen, isopsoralen, epimedin B, epimedin C and icariin in Chanlong dingchuan mixture.

KEYWORDS HPLC; Chanlong dingchuan mixture; Psoralen; Isopsoralen; Epimedin B; Epimedin C; Icarin

蟾龙定喘合剂由补骨脂、淫羊藿、麻黄、蟾蜍、地龙、五味子、桂枝、红参、黄芪、当归、白芍、陈皮、清半夏、杏仁、干姜、猪胆汁、炙甘草、桔梗、紫苏叶等19味中药材组成,为中药复方制剂,有散寒化痰、补肺益肾、止咳定喘的功效,可用于肺肾气虚性慢性支气管炎、虚寒性支气管哮喘、痰白多沫等证。该制剂收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》(第二册)^[1],原蟾龙定喘合剂质量标准只对麻黄作了规定,不能有效控制蟾龙定喘合剂的质量。补骨脂和淫羊藿为蟾龙定喘合剂方中的主要药物,补骨脂具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功效;淫羊藿具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。因此,为更好地控制蟾龙定喘合剂的质量,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定补骨脂的主要成分补骨脂素和

异补骨脂素,淫羊藿的主要成分朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的含量。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1315B可变波长检测器(美国Agilent公司);BP-211D型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ3200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:40 W,频率:150 kHz)。

1.2 药品与试剂

蟾龙定喘合剂(内蒙古仁泽药业有限公司,批号:20140401、20140709、20150317,规格:100 ml/瓶);补骨脂素对照品(批号:110739-201416,纯度:99.9%)、异补骨脂素对照品(批号:110738-201313,纯度:100.0%)、朝藿定C对照品(批号:111780-200801,纯度:100.0%)和淫羊藿苷对照品(批号:110737-200415,纯度:100.0%)均购自中国食品药品检定研究院;朝藿定B对照品(上海纯优生物科技有限公司,批号:

*主治医师。研究方向:急诊内科临床及相关药物。E-mail:sun-huixs@163.com

#通信作者:工程师。研究方向:药物制剂及质量标准。电话:0371-62599489。E-mail:13803995445@163.com

110623-73-9,纯度:98.0%);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welch Materials C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-甲醇(1:1,V/V)(A)-水(B);流速为0.9 ml/min,梯度洗脱(洗脱程序见表1);检测波长:246 nm(补骨脂素和异补骨脂素)^[2-4]、270 nm(朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷)^[5-7];柱温:30℃;进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0~11	28.0	72.0
11~28	28.0→34.0	72.0→66.0
28~51	34.0→50.0	66.0→50.0
51~60	50.0→28.0	50.0→72.0

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷对照品适量,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇制成补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷质量浓度分别为0.824、0.515、0.406、0.588、0.490 mg/ml的单一对照品贮备液。分别吸取上述各单一对照品贮备液2.5、2.0、2.5、2.5、1.5 ml,置于同一50 ml量瓶中,用甲醇定容,摇匀,制成补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷的质量浓度分别为0.041 2、0.020 6、0.020 3、0.029 4、0.014 7 mg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品1.5 ml,置于50 ml量瓶中,加甲醇定容,称定质量,超声处理10 min,取出放冷至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和配方比例,分别取缺补骨脂和淫羊藿的其余药材,按“2.2.2”项下方法制备补骨脂阴性对照溶液和淫羊藿阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、补骨脂阴性对照溶液和淫羊藿阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数均≥3 000。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下各单一对照品贮备液0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,制得系列线性溶液。取上述溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x,μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD),结果详见表3。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷峰面积的RSD分别为

0.78%、0.85%、0.98%、1.03%、1.12%(n=6),表明仪器精密度良好。

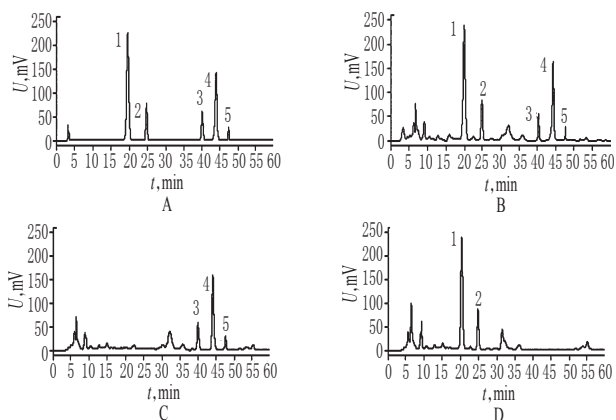


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.补骨脂阴性对照;D.淫羊藿阴性对照;1.补骨脂素;2.异补骨脂素;3.朝藿定B;4.朝藿定C;5.淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C. negative control of psoralen; D.negative control of icariin; 1.psoralen; 2.isopsoralen; 3.epimedin B; 4.epimedin C; 5.icariin

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围,μg/ml
补骨脂素	$y=1.3051 \times 10^5 x + 372.6$	0.999 7	8.24~164.80
异补骨脂素	$y=6.8416 \times 10^4 x - 263.8$	0.999 3	5.15~103.00
朝藿定B	$y=4.1964 \times 10^4 x - 402.8$	0.999 6	4.06~81.20
朝藿定C	$y=8.9705 \times 10^4 x + 372.9$	0.999 5	5.88~117.60
淫羊藿苷	$y=1.9173 \times 10^5 x - 459.7$	0.999 8	4.90~98.00

表3 检测限与定量限测定结果(μg/ml)

Tab 3 Determination results of quantitation limit and detection limit(μg/ml)

待测成分	LOQ	LOD
补骨脂素	0.385	0.127
异补骨脂素	0.179	0.059
朝藿定B	0.124	0.041
朝藿定C	0.218	0.072
淫羊藿苷	0.348	0.115

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:20150317)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、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、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷峰面积的RSD分别为0.80%、0.86%、1.05%、0.76%、0.69%(n=6),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:20150317)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷峰面积的RSD分别为0.76%、0.82%、0.56%、0.63%、0.70%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:20150317)6份,每份0.75 ml,分别置于50 ml量瓶中,精密加入“2.2.1”项下混合对照品溶液25 ml、甲醇20 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of the recovery tests(n=6)

待测成分	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, %
补骨脂素	0.75	1.020 0	1.030 0	2.035 8	98.62	99.05	0.80
	0.75	1.020 0	1.030 0	2.043 1	99.33		
	0.75	1.020 0	1.030 0	2.036 2	98.66		
	0.75	1.020 0	1.030 0	2.0287	97.93		
	0.75	1.020 0	1.030 0	2.050 6	100.06		
	0.75	1.020 0	1.030 0	2.046 9	99.70		
异补骨脂素	0.75	0.540 0	0.515 0	1.054 6	99.92	98.70	1.37
	0.75	0.540 0	0.515 0	1.039 1	96.91		
	0.75	0.540 0	0.515 0	1.055 8	100.16		
	0.75	0.540 0	0.515 0	1.042 4	97.55		
	0.75	0.540 0	0.515 0	1.052 6	99.53		
	0.75	0.540 0	0.515 0	1.045 4	98.14		
朝藿定B	0.75	0.472 5	0.507 5	0.973 2	98.66	98.43	0.98
	0.75	0.472 5	0.507 5	0.968 4	97.71		
	0.75	0.472 5	0.507 5	0.978 1	99.63		
	0.75	0.472 5	0.507 5	0.964 5	96.95		
	0.75	0.472 5	0.507 5	0.972 6	98.54		
	0.75	0.472 5	0.507 5	0.975 3	99.07		
朝藿定C	0.75	0.712 5	0.735 0	1.425 5	97.01	97.99	1.03
	0.75	0.712 5	0.735 0	1.442 6	99.33		
	0.75	0.712 5	0.735 0	1.438 5	98.78		
	0.75	0.712 5	0.735 0	1.423 2	96.69		
	0.75	0.712 5	0.735 0	1.433 7	98.12		
	0.75	0.712 5	0.735 0	1.432 9	98.01		
淫羊藿苷	0.75	0.360 0	0.367 5	0.721 2	98.29	97.69	0.70
	0.75	0.360 0	0.367 5	0.716 8	97.09		
	0.75	0.360 0	0.367 5	0.715 6	96.76		
	0.75	0.360 0	0.367 5	0.722 1	98.53		
	0.75	0.360 0	0.367 5	0.718 6	97.58		
	0.75	0.360 0	0.367 5	0.719 8	97.90		

2.10 样品含量测定

取3批样品适量,分别按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的含量,结果见表5。

表5 样品含量测定结果(n=6, mg/ml)

Tab 5 Results of contents determination of samples (n=6, mg/ml)

样品批号	补骨脂素	异补骨脂素	朝藿定B	朝藿定C	淫羊藿苷
20140401	1.33	0.71	0.60	0.93	0.47
20140709	1.29	0.67	0.58	0.89	0.42
20150317	1.36	0.72	0.63	0.95	0.48

3 讨论

笔者在试验过程中考察了多种流动相系统,包括乙腈-甲醇(1:2, V/V)-水^[8-9]、乙腈-甲醇(1:1, V/V)-水^[10-11]、乙腈-水^[12-14],以补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的出峰时间、峰形和分离度效果为评价指标进行综合评价,优选出最佳流动相。结果表明,乙腈-甲醇(1:1, V/V)-水为流动相时,文中所测5个成分的色谱峰出峰时间、峰形和分离度效果最

佳。故本试验选取乙腈-甲醇(1:1, V/V)-水为流动相。

综上所述,本方法操作简便、结果可靠,适用于同时测定蟾龙定喘合剂中补骨脂素、异补骨脂素、朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的含量。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第二册[S].(WS3-B-4048-98).1990.

[2] 李俊娟,李军.HPLC法测定补骨脂药材中补骨脂素和异补骨脂素[J].中成药,2012,34(8):1545.

[3] 童杰文,张盛,李娟,等.高效液相色谱法测定补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的分析[J].农产品加工,2015,376(1):44.

[4] 李凯,张太行,周宁,等.快速测定不同市售补骨脂药材中补骨脂素、异补骨脂素的含量[J].中医学报,2012,27(7):846.

[5] 陈婷,许亮,杨燕云,等.HPLC法测定朝鲜淫羊藿及市售淫羊藿中淫羊藿苷等四种成分研究[J].中华中医药学刊,2014,32(7):1621.

[6] 左建平,安显辉.不同采收季节的淫羊藿中朝藿定C和淫羊藿苷的含量比较[J].中国药业,2014,23(7):13.

[7] 杨蕾,戴幸星,徐娟,等.16批淫羊藿市售生品饮片质量考察[J].北京中医药大学学报,2013,36(12):841.

[8] 黄辉庆,袁小红,周健韬,等.HPLC法测定补骨脂微囊中补骨脂素及异补骨脂素的含量[J].中药新药与临床药理,2015,26(3):377.

[9] 杨娟,张华峰,牛丽丽,等.不同地区商品淫羊藿中朝藿定淫羊藿苷总黄酮含量变异及抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2014,35(16):96.

[10] 于桂兰,杜国辉,曹冬梅,等.HPLC法同时测定复方夏枯草搽剂中3个有效成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(4):603.

[11] 段萍,徐作刚,茅向军,等.金乌骨通胶囊质量标准研究[J].中成药,2013,35(12):2672.

[12] 李进飞,郭景文,史宪海.HPLC法同时测定腰痛片中芍药苷、川续断皂苷VI、补骨脂素和异补骨脂素含量[J].药物分析杂志,2015,35(6):1099.

[13] 张振巍,陈瑶,孙旭,等.加校正因子的自身对照法测定淫羊藿饮片中6种成分含量[J].中国药师,2015,18(6):904.

[14] 俞吉,朱瑞,董妍君,等.骨疏灵颗粒不同配伍对淫羊藿苷含量的影响[J].中国药房,2016,27(1):79.

(收稿日期:2015-09-30 修回日期:2016-07-03)

(编辑:刘柳)