

HPLC法同时测定益肤丸中香豆素类化合物的含量

李小玲^{1*},刁娟娟²,李新霞^{2#}(1.新疆医科大学第二附属医院药剂科,乌鲁木齐 830028;2.新疆医科大学中心实验室分析测试中心,乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4299-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.40

摘要 目的:建立同时测定益肤丸中香豆素类化合物含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-3,流动相为乙腈-水(49:51, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为320 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯检测质量浓度线性范围分别为5.16~206.4 μg/ml($r=0.999\ 9$)、37.40~1 495.89 μg/ml($r=0.999\ 9$)、9.95~318.34 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为96.05%~103.19%(RSD=2.18%, $n=9$)、96.90%~103.09%(RSD=2.07%, $n=9$)、95.50%~103.57%(RSD=2.15%, $n=9$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性较好,可用于益肤丸中香豆素类化合物含量的同时测定。

关键词 益肤丸;蛇床子素;异欧前胡素;二氢欧山芹醇当归酸酯;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Coumarin Compounds in Yifu Pill by HPLC

LI Xiaoling¹, DIAO Juanjuan², LI Xinxia²(1.Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830028, China; 2.Analysis and Testing Center of Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the simultaneous determination of coumarin compounds in Yifu pill. **METHODS:** HPLC was performed on the column of Inertsil ODS-3 with mobile phase of acetonitrile-water (49:51, V/V) at a flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was 320 nm, column temperature was 30 ℃, injection volume was 20 μl. **RESULTS:** The linear range was 5.16-206.4 μg/ml for osthole ($r=0.999\ 9$), 37.40-1 495.89 μg/ml for isoimperatorin ($r=0.999\ 9$) and 9.95-318.34 μg/ml for columbianadin ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.0%; recoveries were 96.05% -103.19% (RSD=2.18%, $n=9$) for osthole, 96.90% -103.09% (RSD=2.07%, $n=9$) for isoimperatorin, 95.50% -103.57% (RSD=2.15%, $n=9$) for columbianadin. **CONCLUSIONS:** The method is simple with good precision, stability and reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of coumarin compounds in Yifu pill.

KEYWORDS Yifu pill; Osthole; Isoimperatorin; Columbianadin; Content determination; HPLC

由于比沙可啶不溶于水^[6]且采用顶空气相色谱法测定样品时,一般使用二甲亚砜和DMF作为提取溶剂^[2]。结果,二甲亚砜作为提取溶剂时,样品在二甲亚砜中的溶解性较差且对其他峰干扰较大;DMF作为提取溶剂时,二氯甲烷和乙酸乙酯在DMF中的溶解性较好,且DMF沸点高,对其他峰的干扰较小。因此,笔者采用DMF作为本试验的提取溶剂。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,可用于同时测定比沙可啶原料药中二氯甲烷和乙酸乙酯的残留量。

参考文献

[1] 王卉,杜春波,沈立,等.RP-HPLC法测定比沙可啶片剂含量及有关物质[J].药学进展,2005,29(12):565.
[2] 张奕华,侯秀清,黄赐福.比沙可啶合成工艺研究[J].中国药师,1999,2(1):7.
[3] 李颖,刘世宽,郝志刚.结肠定位给药制剂:比沙可啶速释片的研制[J].山东医药工业.2000,19(3):7.
[4] 张军辉,刘英华,李金岭,等.比沙可啶的合成工艺研究[J].精细化工中间体,2012,42(2):30.
[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年

* 主管药师。研究方向:中成药质量标准。电话:0991-4609105。
E-mail:lixiaoling008@sohu.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:新药研发。电话:0991-4365034。E-mail:LXX6668@163.com

版.北京:中国医药科技出版社,2015:74.

[6] 祝波,赵鲁青,陈安珍,等.顶空采样-毛细管气相色谱法分析格列美脲原料药中的溶剂残留[J].色谱,2009,27(6):755.
[7] 孙悦,王卫,唐素芳.顶空气相色谱法测定盐酸帕罗西汀中残留的有机溶剂及基质效应考察[J].药物分析杂志,2010,30(5):963.
[8] 冯敏,王森,王曦,等.顶空气相色谱法测定西尼地平原料药中残留的三乙胺和哌啶[J].华西药学杂志,2014,29(5):596.
[9] 汪斌,郑璐,姚仲青,等.顶空气相色谱法测定胡黄连苷Ⅱ原料药中7种有机溶剂残留量[J].中国药房,2015,26(27):3 859.
[10] 谷央丽,沈丽娟,傅应华.顶空毛细管气相色谱法测定头孢克肟颗粒中乙醇残留量[J].中国药师.2013,16(1):63.
[11] 吴朝华,王秀梅,顾保明,等.顶空毛细管气相色谱法测定盐酸丁卡因原料药中的残留溶剂[J].药物分析杂志,2011,31(6):1 188.
[12] 张晶蓉.顶空气相色谱法测定富马酸喹硫平的残留溶剂[J].天津药学,2015,27(5):17.

(收稿日期:2016-01-11 修回日期:2016-08-18)

(编辑:刘 柳)

益肤丸由党参、羌活、独活等16味中药材组成,具有健脾化湿、活血润肤止痒的功效,常用于慢性湿疹、银屑病、神经性皮炎、皮肤瘙痒等症的治疗,原方以煎剂在临床使用多年,因其疗效显著,后制成丸剂作为新疆昌吉州中医医院的院内中药制剂,目前尚无质量可控方法。存在于益肤丸中的羌活、独活均有祛风除湿、止痛抗炎作用,而产生该药理活性的物质主要为香豆素类化合物^[1-2]。异欧前胡素、蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯^[3]分别为羌活和独活中的香豆素类化合物,其含量的多少与益肤丸药效有一定的联系。因此,本研究利用高效液相色谱法(HPLC)在同一色谱条件下同时测定以上3种香豆素类化合物的含量,建立含量测定方法,从而确定量效关系,为益肤丸质量控制方法的建立提供更加准确的试验数据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括SPD-M20A二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);AB135-S型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);HH-S4型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

1.2 药品与试剂

益肤丸(新疆昌吉回族自治州中医医院自制,批号:20140201、20140202、20140301,规格:60 g/瓶);蛇床子素对照品(批号:110822-201308,纯度:100%);二氢欧山芹醇当归酸酯对照品(批号:111583-201304,纯度:98.3%)均购自中国食品药品检定研究院;异欧前胡素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:A0012,纯度:≥99%);乙腈为色谱纯,甲醇、95%乙醇均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(49:51,V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:320 nm;柱温:30℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取蛇床子素对照品10.32 mg,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为206.4 μg/ml的蛇床子素对照品贮备液;精密称取异欧前胡素对照品15.11 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为1 495.8 μg/ml的异欧前胡素对照品贮备液;精密称取二氢欧山芹醇当归酸酯对照品10.12 mg,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为397.92 μg/ml的二氢欧山芹醇当归酸酯对照品贮备液。分别精密吸取上述蛇床子素对照品贮备液2.5 ml、异欧前胡素对照品贮备液0.6 ml、二氢欧山芹醇当归酸酯对照品贮备液0.5 ml,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品5 g,加硅藻土2.5 g,研匀,置圆底烧瓶中,加甲醇75 ml,加热回流45 min,滤过,再加甲醇

50 ml,加热回流0.5 h,滤过,合并滤液,滤液蒸干,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按益肤丸处方比例和制备工艺制备缺羌活、独活的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,蛇床子素的保留时间约为33 min,理论板数为19 619;分离度为1.7,拖尾因子为1.05。异欧前胡素的保留时间约为38 min,理论板数为18 984;分离度为1.6,拖尾因子为1.04。二氢欧山芹醇当归酸酯的保留时间约为42 min,理论板数为19 553;分离度为1.7,拖尾因子为0.99。

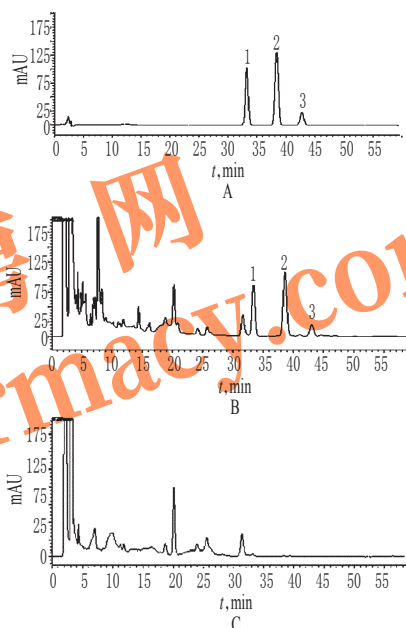


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.蛇床子素;2.异欧前胡素;3.二氢欧山芹醇当归酸酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.osthole; 2.isoimperatorin; 3.columbianadin

2.4 线性关系考察

分别量取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,加甲醇制成质量浓度分别为5.16、10.32、20.64、51.6、103.2、206.4 μg/ml的系列蛇床子素对照品溶液,加甲醇制成质量浓度分别为37.40、74.79、149.59、299.18、747.95、1 495.89 μg/ml的系列异欧前胡素对照品溶液,加甲醇制成质量浓度分别为9.95、19.90、39.79、79.58、159.17、318.34 μg/ml的系列二氢欧山芹醇当归酸酯对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯回归方程分别为 $y=72\,898.611x+2\,858.811\,5$ ($r=0.999\,9$)、 $y=56\,920.295\,1x+89\,098.993\,5$ ($r=0.999\,9$)、 $y=53\,724.346\,8x+8\,786.074\,6$ ($r=0.999\,9$)。结果

表明,蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯检测质量浓度线性范围分别为5.16~206.4、37.40~1 495.89、9.95~318.34 μg/ml。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积的RSD分别为2.87%、1.07%、2.98%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20140201)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、12、15、18、21、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,蛇床子素、异欧前胡素在24 h内稳定性良好,其峰面积的RSD分别为1.43%、0.98%(n=9);二氢欧山芹醇当归酸酯在15 h内基本稳定,其峰面积的RSD=1.31%(n=9),超过15 h后发生降解,其峰面积增大,RSD=29.4%。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20140201)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,蛇床子素、异欧前胡素、二氢欧山芹醇当归酸酯含量平均值分别为131.26、236.57、52.92 μg/g,RSD分别为2.16%、1.57%、2.15%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20140201)适量,共6份,分别加入低、中、高含量的蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯对照品,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1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量,g	样品含量,μg/g	加入量,μg/g	测得量,μg/g	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
蛇床子素	4.999 2	127.16	110.88	236.37	98.49	99.26	2.18
	5.000 0	131.96	110.88	246.38	103.19		
	4.999 2	135.32	110.88	245.50	99.37		
	5.001 1	132.22	138.60	265.34	96.05		
	4.999 8	133.70	138.60	269.14	97.72		
	4.999 9	128.73	138.60	267.37	100.03		
	4.999 8	127.14	166.32	290.25	98.07		
	5.000 3	131.95	166.32	301.18	101.75		
	5.000 2	135.95	166.32	299.99	98.63		
	4.999 2	238.20	239.34	470.13	96.90	100.13	2.07
异欧前胡素	5.000 0	231.15	239.34	466.54	98.35		
	4.999 2	254.19	239.34	496.50	101.24		
	5.001 1	239.48	299.18	530.56	97.29		
	4.999 8	237.46	299.18	542.08	101.82		
	4.999 9	248.10	299.18	547.17	99.96		
	4.999 8	238.17	359.02	596.81	99.89		
	5.000 3	231.13	359.02	601.26	103.09		
	5.000 2	254.14	359.02	622.71	102.66		
	4.999 2	51.33	42.28	95.12	103.57	99.19	2.15
二氢欧山芹醇当归酸酯	5.000 0	52.89	42.28	94.82	99.17		
	4.999 2	49.27	42.28	91.04	98.79		

续表1

Continued Tab 1

待测成分	取样量,g	样品含量,μg/g	加入量,μg/g	测得量,μg/g	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
二氢欧山芹醇当归酸酯	5.001 1	53.85	52.43	106.08	99.62	99.50	95.50
	4.999 8	53.62	52.43	103.69	95.50		
	4.999 9	49.45	52.43	101.08	98.47		
	4.999 8	51.32	62.57	113.70	99.70		
	5.000 3	52.89	62.57	115.79	100.53		
	5.000 2	52.26	62.57	113.21	97.41		

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“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,计算样品的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3,μg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3,μg/g)

样品批号	蛇床子素	异欧前胡素	二氢欧山芹醇当归酸酯
20140201	123.20	238.78	49.56
20140202	121.16	225.30	48.60
20140301	129.86	238.54	51.70

3 讨论

本试验因在同一色谱条件下同时测定益肤丸中蛇床子素、异欧前胡素和二氢欧山芹醇当归酸酯3种化合物,综合2015年版《中国药典》(一部)和相关文献方法^[3-6],最终确定采用文中色谱条件。

益肤丸中二氢欧山芹醇当归酸酯稳定性差,故用于益肤丸中香豆素类化合物含量测定的供试品溶液应在检测前临时制备。考虑到样品中化合物的稳定性,提取和滤液蒸干时,温度应不超过80℃,以避免热不稳定成分的降解。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性较好,可用于益肤丸中香豆素类化合物含量的同时测定。

参考文献

[1] 李云霞,高春华,沙明.中药羌活化学成分及药理作用研究进展[J].辽宁中医学院学报,2004,6(1):22.

[2] 段志富,陈建伟,李祥.伞形科药用植物中香豆素类成分及其药理作用研究现状[J].中国药房,2008,19(3):223.

[3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:182.

[4] 胡太德,陈绍成,谭君.重庆道地药材独活与全国其他产区独活主要药效成分含量对比研究[J].中国药房,2015,26(33):4 711.

[5] 段红,翟科峰,曹稳根,等.正交试验法优选祛风止痛片中制草乌、独活的合提工艺[J].中成药,2010,32(8):1 421.

[6] 谢惠艳,王英豪,王蓉蓉,等.正交试验优选羌活-独活药对的合提工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):10.

(收稿日期:2015-10-19 修回日期:2016-02-04)

(编辑:张 静)