

# HPLC法同时测定补乌酊中4种补骨脂类成分的含量

夏天一\*, 陈 顺, 高守红#, 游春华, 张 凤, 陆文铨, 朴淑娟, 陈万生(上海长征医院药材科, 上海 200003)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4734-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.45

**摘要** 目的:建立同时测定补乌酊中4种补骨脂类成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.2%冰醋酸(梯度洗脱),流速为1 ml/min,检测波长为246 nm,柱温为30 ℃,进样量为15 μl。结果:异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素的检测质量浓度线性范围分别为13.00~208、26.00~416、24.50~392、37.88~606 μg/ml ( $r \geq 0.999 6$ );精密度、稳定性、重复性试验的RSD < 2.00%;加样回收率分别为95.22%~97.23%、100.24%~104.64%、102.28%~104.39%、97.68%~100.17%,RSD分别为0.87%、1.62%、1.47%、0.97% ( $n=6$ )。结论:该方法操作简便、重复性好,可作为控制补乌酊质量的方法。

**关键词** 高效液相色谱法;补乌酊;异补骨脂素;补骨脂甲素;补骨脂定;补骨脂乙素;含量

## Simultaneous Determination of the Content of 4 Psoralen Compounds in Buwu Tincture by HPLC

XIA Tian-yi, CHEN Shun, GAO Shou-hong, YOU Chun-hua, ZHANG Feng, LU Wen-quan, PIAO Shu-juan, CHEN Wan-sheng (Dept. of Pharmacy, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 4 psoralen compounds in Buwu tincture. METHODS: HPLC was performed on the column of Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile-0.2% Acetic acid by gradient elution at flow rate of 1 ml/min, detection wavelength was 246 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 15 μl. RESULTS: The linear range was 13.00-208 μg/ml for angelicin, 26.00-416 μg/ml for bavachin, 24.50-392 μg/ml for psoralidin and 37.88-606 μg/ml for isobavachalcone, respectively ( $r \geq 0.999 6$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were less than 2.00%; recoveries were 95.22% -97.23% (RSD=0.87%,  $n=6$ ), 100.24% -104.64% (RSD=1.62%,  $n=6$ ), 102.28% -104.39% (RSD=1.47%,  $n=6$ ) and 97.68% -100.17% (RSD=0.97%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and reproducible, and can be used for the quality control of Buwu tincture.

**KEYWORDS** HPLC; Buwu tincture; Angelicin; Bavachin; Psoralidin; Isobavachalcone; Content

补乌酊为第二军医大学附属长征医院自主研发的医院制剂,由补骨脂和乌梅经70%乙醇浸泡制得,临床上主要用于治疗白癜风。补乌酊处方中君药补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn.的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,补骨脂具有广泛的药理活性,除了具有抗氧化<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3-5]</sup>、增强生物体免疫<sup>[6]</sup>、预防心血管疾病<sup>[7]</sup>等功效外,还具有光敏特点<sup>[8]</sup>,这是其治疗白癜风的药理基础<sup>[9-10]</sup>。目前对补骨脂及其复方制剂的含量测定报道多局限于补骨脂素和异补骨脂素<sup>[11-12]</sup>,且目前该制剂仅采用薄层鉴别法来进行质量控制,很难全面反映补乌酊质量的优劣,因此亟需建立一种准确可靠、经济快速的检测方法来完成其质量标准。本试验建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定补乌酊中异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素的含量,以为补乌酊质量标准的建立提供科学依据。

## 1 材料

\* 硕士研究生。研究方向:药物分析与临床药学。电话:021-60748767。E-mail:yoyosummer31823@126.com

# 通信作者:主管药师,硕士。研究方向:药物分析与临床药学。电话:021-60748767。E-mail:gaoshouhong@126.com

## 1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1322A型在线脱气机、G1311A型输液泵、G1329A型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1315B-DAD型检测器、Chemstation色谱工作站(美国Agilent公司);CPA225D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);SK7200H型超声仪(上海科导超声仪器有限公司;功率:350 W,频率:53 kHz)。

## 1.2 药品与试剂

补乌酊(第二军医大学附属长征医院,批号:140901、140805、140627、140526、140422、140211、131223、131120、131014、130930,规格:10 ml/支)。异补骨脂素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110738-201012,纯度:100.0%)、补骨脂甲素对照品(批号:MB6544)、补骨脂乙素对照品(批号:MB7009)、补骨脂定对照品(批号:MB6543)均购至大连美仑生物技术有限公司,纯度均>98%;甲醇、乙腈、正丁醇、甲基叔丁基醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、冰醋酸、甲酸均为色谱纯,乙醚为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

## 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2%冰醋酸(B), 梯度洗脱, 洗脱程序见表1; 流速: 1 ml/min; 检测波长: 246 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 15 μl。按上述条件进样测定, 理论板数以异补骨脂素峰计> 3 300, 分离度>1.5, 详见图1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0	45	55
5	45	55
6	35	65
13	35	65
14	55	45
30	67	33

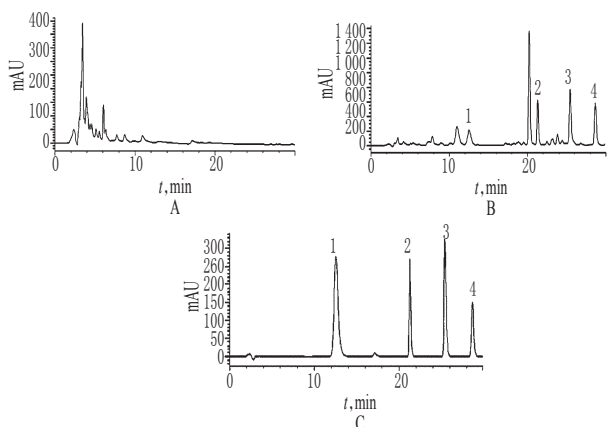


图1 高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 供试品; C. 混合对照品; 1. 异补骨脂素; 2. 补骨脂甲素; 3. 补骨脂定; 4. 补骨脂乙素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. negative control; B. test sample; C. mixed reference; 1. angelicin; 2. bavachin; 3. psoralidin; 4. isobavachalcone

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素对照品各1.04、2.08、1.96、3.03 mg, 分别置于同一1 ml量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取补乌酊(批号: 140901)、水各5 ml置于同一分液漏斗中, 震荡使之充分混匀; 用10 ml甲基叔丁基醚萃取, 静置分层; 吸取上层萃取液200 μl, 氮气挥干, 再用200 μl 10%甲醇复溶, 超声处理5 min, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取处方中除补骨脂外的全部药材各适量, 按补乌酊成品工艺及“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

## 2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液25、50、100、150、200、300、400 μl, 分别置于2 ml量瓶中, 用10%甲醇定容, 摇匀, 制得系列质量浓度的对照品溶液。分别吸取上述系列对照品溶液15 μl, 按“2.1”项下色谱条件依次进样测定, 记录峰面积, 平行进样3次。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, μg/

ml)为横坐标进行线性回归, 得异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素的回归方程分别为 $y=98.96x+10.19$  ( $r=0.9996$ )、 $y=36.69x-3.97$  ( $r=0.9998$ )、 $y=59.26x-174.48$  ( $r=0.9997$ )、 $y=30.65x-122$  ( $r=0.9998$ )。结果表明, 异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素的检测质量浓度线性范围分别为13.00~208、26.00~416、24.50~392、37.88~606 μg/ml。

## 2.4 精密度试验

精密量取异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素的混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次, 记录峰面积。结果, 异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素峰面积的RSD分别为1.04%、0.49%、0.52%、0.48% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度良好。

## 2.5 稳定性试验

精密称取补乌酊(批号: 140901)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于放置0、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, 异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素峰面积的RSD分别为1.75%、1.86%、1.52%、1.23% ( $n=5$ ), 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.6 重复性试验

精密称取补乌酊(批号: 140901)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, 6份供试品溶液中异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素的平均质量浓度分别为90.94、336.32、250.83、537.68 μg/ml, RSD分别为1.57%、0.95%、0.88%、1.36% ( $n=6$ ), 表明本方法重复性良好。

## 2.7 加样回收率试验

精密量取已知含量的补乌酊(批号: 140901)6份, 每份5 ml, 按各成分对照品质量浓度的100%加入异补骨脂素、补骨脂甲素、补骨脂定、补骨脂乙素对照品各适量, 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, 计算样品含量并计算加样回收率, 结果见表2。

## 2.8 样品含量测定

取10批样品各适量, 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, 计算样品的质量浓度, 结果见表3。

## 3 讨论

补乌酊为补骨脂与乌梅用70%乙醇浸泡制得。用水进行稀释, 能够降低溶液的黏稠度, 防止萃取过程中乳化现象的发生。本试验选取甲基叔丁基醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇、二氯甲烷、正己烷6种常见有机溶剂进行萃取效率的考察。结果, 上述有机溶剂均能够对4种待测化合物进行不同程度的萃取, 而甲基叔丁基醚和乙醚的萃取效率最高。最终, 本试验选用挥发性相对较小的甲基叔丁基醚作为萃取溶剂。

参照国家药典委员会《中药分析方法验证指导原则实施细则》的要求, 本试验选用不同厂家的色谱柱, 对待测化合物

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Determination results of recovery test(n=6)

待测成分	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,%
异补骨脂素	0.455	0.46	0.898	96.30	96.18	0.87
	0.455	0.47	0.904	95.53		
	0.455	0.46	0.893	95.22		
	0.455	0.47	0.912	97.23		
	0.455	0.49	0.924	95.71		
	0.455	0.48	0.921	97.08		
补骨脂甲素	1.682	1.65	3.397	103.94	103.11	1.62
	1.682	1.63	3.349	102.27		
	1.682	1.66	3.419	104.64		
	1.682	1.69	3.443	104.20		
	1.682	1.65	3.336	100.24		
	1.682	1.70	3.439	103.35		
补骨脂定	1.254	1.32	2.632	104.39	103.31	1.47
	1.254	1.26	2.556	103.33		
	1.254	1.27	2.553	102.28		
	1.254	1.21	2.502	103.14		
	1.254	1.30	2.601	103.62		
	1.254	1.29	2.584	103.10		
补骨脂乙素	2.688	2.86	5.553	100.17	99.32	0.97
	2.688	2.75	5.411	99.02		
	2.688	2.51	5.202	100.16		
	2.688	2.63	5.315	99.89		
	2.688	2.46	5.091	97.68		
	2.688	2.55	5.212	98.98		

表3 样品含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{g/ml}$ )Tab 3 Results of lotent determination of samples( $\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{g/ml}$ )

批号	异补骨脂素	补骨脂甲素	补骨脂定	补骨脂乙素
140901	90.44±0.29	335.32±2.97	250.02±0.65	537.18±3.76
140805	91.19±0.53	328.67±1.47	246.95±1.90	529.24±4.09
140627	87.01±0.18	302.83±1.48	236.53±0.45	498.57±0.72
140526	88.29±0.39	295.67±2.47	227.20±0.99	473.70±2.95
140422	84.68±0.50	325.45±2.06	254.74±1.89	528.85±5.10
140211	87.29±4.78	315.92±0.76	232.31±3.09	500.20±1.81
131223	95.27±0.98	346.75±1.50	257.24±4.36	559.32±2.14
131120	86.07±0.24	324.80±3.14	245.47±0.92	527.82±2.65
131014	95.82±0.31	346.25±4.13	261.48±1.46	556.71±4.23
130930	70.31±0.19	305.90±3.00	219.38±0.61	509.53±2.23

的分离条件进行优化。在比较了 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>、Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> 和 Sepax Sapphire C<sub>18</sub> 3种色谱柱柱效后发现,不同品牌的色谱柱含量测定结果没有明显差别。最终,本试验选用较为经济实用的 Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱。

本试验将常规流动相甲醇-甲酸、甲醇-冰醋酸、乙腈-甲酸、乙腈-冰醋酸的洗脱效果进行比较。结果,乙腈-冰醋酸能够在缩短出峰时间的基础上实现待测物质的良好分离,并且乙腈的黏度小,能够有效降低系统压力;进一步对冰醋酸质量浓度考察后得出,0.2%冰醋酸分离效果最佳。最终,本试验选用乙腈-0.2%冰醋酸作为流动相。

综上所述,本方法操作简便、重复性好,可作为控制补骨脂酊质量的方法。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 174.
- [2] Haraguchi H, Inoue J, Tamura Y, *et al.* Antioxidative components of *Psoralea corylifolia* (Leguminosae) [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(6): 539.
- [3] Lu HH, Zhang LH, Liu DH, *et al.* Isolation and purification of psoralen and isopsoralen and their efficacy and safety in the treatment of osteosarcoma in nude rats[J]. *Afri Health Sci*, 2014, 14(3): 641.
- [4] Mohammadparast B, Rustaiee AR, Rasouli M, *et al.* In vitro enhancement of psoralen as an important anticancer compound in *Psoralea corylifolia* through precursor feeding[J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(5): 735.
- [5] Wu CY, Sun ZP, Ye YY, *et al.* Psoralen inhibits bone metastasis of breast cancer in mice[J]. *Fitoterapia*, 2013, 91: 205.
- [6] Bindhu F, Velmurugan S, Donio MBS, *et al.* Influence of *Agathi grandiflora* active principles inhibit viral multiplication and stimulate immune system in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against white spot syndrome virus infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 41(2): 482.
- [7] Rahman MA, Kim NH, Yang HJ, *et al.* Angelicin induces apoptosis through intrinsic caspase-dependent pathway in human SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 369(1/2): 95.
- [8] Cai SM, Fujii N, Saito T, *et al.* Simultaneous ultraviolet B-induced photo-oxidation of tryptophan/tyrosine and racemization of neighboring aspartyl residues in peptides[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65(6): 1 037.
- [9] Wang YF, Liu YA, Xiong W, *et al.* A UPLC-MS/MS method for in vivo and in vitro pharmacokinetic studies of psoralenoside, isopsoralenoside, psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* extract[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 609.
- [10] Yan DM, Chang YX, Wang YF, *et al.* In vivo pharmacokinetics of bakuchiol after oral administration of bakuchiol extraction in rat plasma[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3): 697.
- [11] 赵陆华, 黄朝瑜, 屠颖, 等. HPLC法同时测定补骨脂药材中6种成分的含量[J]. 中国天然药物, 2005, 3(4): 242.
- [12] 包贝华, 张爱华, 郭戎. 高效液相色谱法测定复方祛斑酊中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 江苏中医药, 2007, 39(12): 62.

(收稿日期: 2015-04-13 修回日期: 2015-08-25)

(编辑: 刘 柳)