

· 研究报告 ·

高效液相色谱法测定壮骨颗粒中补骨脂素与异补骨脂素的含量

蒲瑾, 徐良燕, 陈若华 (第二军医大学第一附属医院特需诊疗科, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定壮骨颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(45:55), 检测波长为 245 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μl。采用 70% 乙醇水浴方法提取壮骨颗粒中的补骨脂素和异补骨脂素。结果 补骨脂素与异补骨脂素在 3.75~40 μg/ml 范围内呈良好的线性关系, 对方法精密性(n=6)、重复性(n=6)和稳定性(12 h)进行考察, 相对标准偏差(RSD)均小于 2%。加样回收率(n=6)为 94%~105%。结论 该测定方法简便、快速、准确, 可用于壮骨颗粒的临床快速质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 壮骨颗粒; 补骨脂素; 异补骨脂素

[中图分类号] R284

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)05-0441-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.05.015

HPLC method to assay the content of psoralen and angelicin in Zhuanggu granules

PU Jin, XU Liangyan, CHEN Ruohua (The First Affiliated Hospital of the Second Military Medical University, VIP Department, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To develop a HPLC method for psoralen and angelicin content assay in Zhuanggu granules. **Methods** Agilent Zorbax C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with methanol and water (45:55) as mobile phase. The detection wavelength was set at 245 nm. The flow rate was 1.0 ml/min and column temperature at 25 °C. The injection volume was 10 μl. Psoralen and angelicin were extracted with 70% ethanol under water bath. **Results** The linearity was obtained over 3.75~40 μg/ml for psoralen and angelicin. The RSDs were less than 2%. The average recovery was between 94% and 105%. **Conclusion** This simple and accurate HPLC method was suitable for the quality control of Zhuanggu granules.

[Key words] HPLC; Zhuanggu granules; psoralen; angelicin

壮骨颗粒是在医院协定处方基础上研发配制的纯中药制剂, 由党参、山药、补骨脂、地黄等药材组成, 方中诸药伍用可祛瘀生新, 加速骨痂生长, 促进骨折的临床愈合, 恢复新骨及关节功能的正常化。其中, 补骨脂具有补肾壮阳, 固精缩尿, 温脾止泻, 纳气平喘等功效。而补骨脂素与异补骨脂素是补骨脂中的主要成分, 具有抗骨质疏松活性^[1], 促进成骨细胞的生成功能, 增强骨更新^[2]等药理活性, 与处方中补骨脂的功效相符。在《中华人民共和国药典》^[3]中, 补骨脂素与异补骨脂素也是补骨脂的质量控制成分, 多种含有补骨脂的中药制剂亦是补骨脂素与异补骨脂素作为含量测定的指标性成分^[4,5]。因此, 本研究采用高效液相色谱法测定上述 2 种成分的含量, 对壮骨颗粒进行快速检测, 以控制其质量。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱仪, Empower 3 工作站[沃特世科技(上海)有限公司]; KQ-400KDE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AUW120D 型电子天平(日本岛津公司)。补骨脂素(批号: 110739-201217)、异补骨脂素(批号: 110738-201315)标准品均由中国食品药品检定研究院提供; 壮骨颗粒由通化市中医院制剂室提供; 甲醇为色谱纯; 水为重蒸去离子水; 其它试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(45:55), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 245 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 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 0.010 5 g, 异补骨脂素对照品 0.010 1 g, 置 10 ml

[作者简介] 蒲瑾, 本科, 医师。研究方向: 中医学。Tel: 13482282312; E-mail: 565994824@qq.com

[通讯作者] 陈若华, 博士, 主任医师, 教授。研究方向: 肿瘤学。Tel: 13601666610; E-mail: Rhchen1964@sohu.com

容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得到1.05 mg/ml 补骨脂素与1.01 mg/ml 异补骨脂素混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 称取壮骨颗粒5 g,加70%乙醇200 ml,水浴提取30 min,提取液减压浓缩,过滤,滤液移至50 ml容量瓶中,加水至刻度,摇匀。取适量过微孔滤膜(0.45 μm),即得。

2.2.3 阴性样品溶液 以相同处方比例,按壮骨颗

粒制备工艺制备不含补骨脂的阴性样品,再按照“2.2.2”项下方法制备得到阴性样品溶液。

2.3 系统适用性考察 取供试品溶液、对照品溶液及阴性样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样。结果表明,阴性样品溶液中无其他杂质峰对补骨脂素和异补骨脂素形成干扰,补骨脂素和异补骨脂素与其他色谱峰分离良好,分离度均大于1.5,理论塔板数大于5 000,见图1。

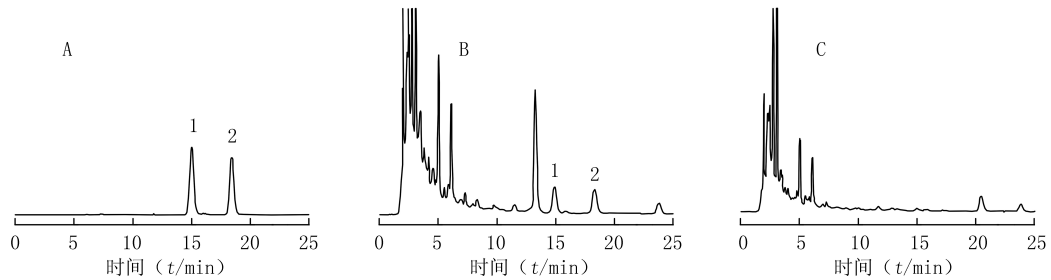


图1 壮骨颗粒 HPLC 色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性样品溶液;1.补骨脂素;2.异补骨脂素

2.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品储备液0.8、0.6 ml置10 ml容量瓶中,加甲醇至刻度,配制成80 μg/ml和60 μg/ml的对照品溶液。再取上述2种对照品溶液各5 ml至10 ml容量瓶中,以40%甲醇依次对半稀释,分别配制成40、30、20、15、10、7.5、5和3.75 μg/ml的溶液。精密吸取上述溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,测定补骨脂素与异补骨脂素峰面积值,以峰面积值(Y)为纵坐标,对照品浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。结果表明,补骨脂素在3.75~40 μg/ml范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y_1 = 81\,770 X_1 + 1\,189$ ($r = 0.999\,8, n = 3$);异补骨脂素在3.75~40 μg/ml范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y_2 = 78\,210 X_2 + 504$ ($r = 0.999\,7, n = 3$)。

2.5 精密度考察 取15 μg/ml的对照品混合溶液200 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,重复进样6次,连续3 d,记录补骨脂素与异补骨脂素的峰面积,其日内RSD分别为1.15%和0.84%,日间RSD分别为1.57%和1.91%。实验结果表明本方法精密度较好。

2.6 重复性考察 称取壮骨颗粒样品6份(批号20150113),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,按“2.4”项下的标准曲线方程计算补骨脂素与异补骨脂素含量,其RSD分别为1.27%和2.18%,表明本法重现性较好,符合含量测定要求。

2.7 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在0、

2、4、8、12 h按“2.1”项下色谱条件进样,记录补骨脂素与异补骨脂素峰面积值,其RSD分别为1.42%和1.61%,表明补骨脂素与异补骨脂素经提取在样品中12 h内稳定。

2.8 加样回收率考察 精密量取已知含量的壮骨颗粒样品5 g(批号20150113,补骨脂素含量为0.13 mg/g,异补骨脂素含量为0.09 mg/g),精密加入1 mg/ml补骨脂素与异补骨脂素混合对照品溶液0.6 ml,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,按“2.4”项下的标准曲线方程计算补骨脂素与异补骨脂素含量,求得回收率,结果见表1。

表1 壮骨颗粒的加样回收率试验结果(n=6)

成分	加入量 (m/mg)	原有量 (m/mg)	实测量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
补骨脂素	0.60	0.65	1.24	99.08	101.97	2.30
	0.60	0.65	1.27	102.31		
	0.60	0.65	1.25	99.23		
	0.60	0.65	1.27	103.69		
	0.60	0.65	1.27	102.77		
	0.60	0.65	1.28	104.77		
异补骨脂素	0.60	0.45	1.06	102.10	100.81	3.92
	0.60	0.45	1.01	94.09		
	0.60	0.45	1.07	103.33		
	0.60	0.45	1.08	105.35		
	0.60	0.45	1.04	98.80		
	0.60	0.45	1.06	101.20		

(下转第458页)