

## HPLC 法测定癃闭舒片中补骨脂素和异补骨脂素

王志成<sup>1</sup>, 时圣明<sup>2</sup>, 史琳<sup>3\*</sup>, 毛雨葳<sup>3</sup>

1. 大连市食品药品检验所, 辽宁 大连 116021

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110866

**摘要:** **目的** 建立癃闭舒片中补骨脂素和异补骨脂素的定量方法。**方法** 对国内3个企业生产的6个批次的癃闭舒片, 采用HPLC法检测, Agilent TC-C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相是甲醇-水(43:57), 体积流量1.0 mL/min, 检测波长为246 nm, 柱温30℃。**结果** 补骨脂素回归方程为:  $Y=84.44X+9.994$ ,  $r=0.999\ 9$  ( $n=12$ )。异补骨脂素回归方程为:  $Y=82.434X+8.8952$ ,  $r=0.999\ 9$  ( $n=12$ )。补骨脂素和异补骨脂素的线性范围均在4.04~151.5 μg。**结论** 本方法操作简便、准确、专属性强、稳定, 可用于癃闭舒片中补骨脂素和异补骨脂素的含量测定。

**关键词:** 高效液相法; 癃闭舒片; 补骨脂素; 异补骨脂素; 含量测定

**中图分类号:** R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)01-0097-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.018

## Determination of psoralen and isopsoralen in Longbishu Pills by HPLC

WANG Zhi-cheng<sup>1</sup>, SHI Sheng-ming<sup>2</sup>, SHI Lin<sup>3,\*</sup>, MAO Yu-wei<sup>3</sup>

1. Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116021, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. College of Food Science, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China

**Abstract: Objective** To establish a method for the content determination of psoralen and isopsoralen in Longbishu Pills (LBSP).

**Methods** HPLC was performed on the Agilent TC-C<sub>18</sub>(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of MeOH-H<sub>2</sub>O (43:57), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength 246 nm, and the column temperature was 30℃. **Results** The element regression equation of psoralen was  $Y=84.44X+9.994$ ,  $r=0.999\ 9$  ( $n=12$ ). The element regression equation of isopsoralen was  $Y=82.434X+8.895\ 2$ ,  $r=0.999\ 9$  ( $n=12$ ). The concentrations of psoralen and isopsoralen were within the range of 4.04—151.5 μg. **Conclusion** The method is simple, reliable, and specific, with good reproducibility, and could be used to determine the content of psoralen and isopsoralen in Longbishu Pills.

**Key words:** HPLC; Longbishu Pills; psoralen; isopsoralen; content determination

癃闭舒片由补骨脂、益母草、金钱草、海金沙、琥珀和山慈菇6味中药组成。具有温肾化气、清热通淋、活血化瘀、散结止痛的功效。临床上用于治疗肾气不足、湿热瘀阻之癃闭所致尿频、尿急、尿赤、尿痛、尿细如线, 小腹拘急疼痛, 腰膝酸软等症; 前列腺增生有以上症候者也可应用。补骨脂为该方的君药, 主要功效成分为补骨脂素(psoralen)和异补骨脂素(isopsoralen)<sup>[1]</sup>。

目前, 国内有8个企业生产癃闭舒片, 执行不

同的药品标准, 均为国家食品药品监督管理局标准(试行)。各药品标准中均包括补骨脂的含量测定项, 但提取方法、色谱条件及含量限度均有差异。现通过对3个企业所生产的癃闭舒片中补骨脂的含量测定项的系统考察, 制定一个简单、可靠、通用的测定方法。

### 1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent DAD 检测器。电子天平 Sartorius BP211D②, BP211S。超

收稿日期: 2015-07-08

基金项目: 辽宁省自然科学基金优秀人才培养项目(2015020698)

作者简介: 王志成, 大连人, 硕士, 主管中药师, 从事药物分析。

\*通信作者 史琳, 沈阳人, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 从事天然药物化学及功能食品研究。E-mail: linnashi@126.com

声仪为昆山禾创超声仪器有限公司(40 kHz, 500 W)。甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为超纯水。补骨脂素对照品(批号 110739-200814, 质量分数 100%)、异补骨脂素对照品(批号 110738-200511, 质量分数以 100%计)购自中国食品药品检定研究院。癸闭舒片为市售,分别来源于通宝制药公司(批号 101101)、晨牌药业有限公司(批号 100301、100302、100303)、李之堂药业有限公司(批号 100808)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C<sub>18</sub>(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 流动相为甲醇-水(43:57); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 246 nm。

### 2.2 对照品、供试品和阴性对照样品的配制

对照品溶液的配制 取补骨脂素对照品和异补骨脂素对照品各 10.10 mg, 精密称定, 分别置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 各精密移取 5 mL 分别置 50 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 各移取 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 作为对照品溶液。

供试品溶液的配制 取本品 10 片, 除去薄膜衣, 精密称定, 研细, 取约 0.50 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 60 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 作为供试品溶液。

阴性对照样品溶液的配制 取益母草 4.80 g, 金钱草 3.00 g, 海金沙 3.00 g, 山慈菇 2.40 g, 加水煎煮 2 次, 每次 100 mL, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至稠膏, 真空干燥, 粉碎成细粉, 加入琥珀细粉 0.30 g, 混匀。取上述细粉 1.00 g, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 60 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 作为阴性对照样品溶液。

### 2.3 试验条件的选择

**2.3.1 检测波长** 补骨脂素和异补骨脂素的紫外最大吸收波长为 246 nm, 参考《中国药典》2010 年版补骨脂的标准, 选用 246 nm 为检测波长。

**2.3.2 提取溶剂、提取方法及提取时间的选择** 考察甲醇和水饱和正丁醇作为提取溶剂, 测定结果(表 1) 差异不大, 选择甲醇作为提取溶剂。

以甲醇为溶剂, 考察了 25 mL 和 50 mL 两种溶剂体积, 超声 15、30、45、60 min 及超声 60 min

放置过夜, 以及索氏提取 2 h, 结果见表 2。根据以下测定结果, 选择 50 mL 甲醇超声 60 min 为宜。

表 1 不同溶剂提取后测定结果

Table 1 Determination results after extraction with different solvents

提取溶媒	补骨脂素/(mg·片 <sup>-1</sup> )	异补骨脂素/(mg·片 <sup>-1</sup> )
甲醇	0.31	0.25
水饱和正丁醇	0.28	0.23

表 2 不同提取方法测定结果

Table 2 Determination results with different extraction methods

提取方法	补骨脂素/(mg·片 <sup>-1</sup> )	异补骨脂素/(mg·片 <sup>-1</sup> )
超声 15 min	1.01	0.62
超声 30 min	1.10	0.67
超声 45 min	1.12	0.69
超声 60 min	1.18	0.72
超声 60 min 放置过夜	1.18	0.69
索氏提取 2 h	1.23	0.75
25 mL 甲醇超声 60 min	1.17	0.70
50 mL 甲醇超声 60 min	1.20	0.73

### 2.4 专属性试验

按“2.1”项下色谱条件进样对照品、供试品及补骨脂阴性对照样品, 结果阴性对照样品在与补骨脂素和异补骨脂素相同保留时间处, 未见色谱峰, 故认为阴性对照无干扰。且癸闭舒片样品与对照品在相同位置出峰, 补骨脂素和异补骨脂素与其他色谱峰分离良好, 无干扰。见图 1。

### 2.5 线性关系考察

分别精密量取质量浓度为 0.101 0 mg/mL 的对照品溶液 6、8、10、15 μL, 以及质量浓度为 50.50 μg/mL 及 10.10 μg/mL 的对照品溶液 4、6、8、10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标, 质量分数为横坐标, 绘制标准曲线。补骨脂素回归方程为:  $Y = 84.44X + 9.994$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 12$ ); 异补骨脂素回归方程为:  $Y = 82.434X + 8.8952$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 12$ )。表明补骨脂素和异补骨脂素均在 4.04~151.5 μg 呈良好的线性关系。

### 2.6 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 100303), 连续测定 6 次, 结果补骨脂素和异补骨脂素峰面积的 RSD 值分别为 0.91%、1.26%。

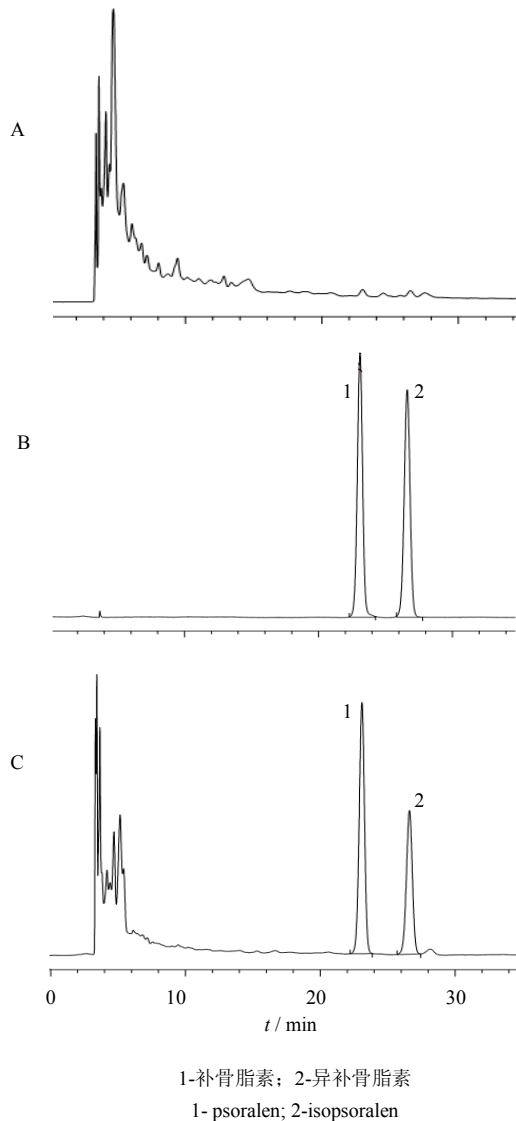


图1 阴性对照(A)、补骨脂素和异补骨脂素对照品(B)、癩闭舒片供试品(C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of psoralen negative control (A), psoralen and isopsoralen references (B), and sample of Longbishu Pills (C)

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 100303), 分别于配制后 0、2、4、8、16、24 h, 依法测定, 结果补骨脂素的 RSD 为 0.64%, 异补骨脂素的 RSD 为 0.71%。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号 100303), 平行制备 6 份, 进样测定, 结果补骨脂素的平均质量分数为 1.156 3 mg/片, RSD 为 0.54%, 异补骨脂素的平均质量分数为 0.753 7 mg/片, RSD 为 1.18%, 表明供试品溶液的重复性良好。

2.9 回收率试验

精密称取已测定的同一批样品(含补骨脂素 4.010 mg/g, 异补骨脂素 2.6045 mg/g) 0.25 g, 精密加入补骨脂素对照品溶液(含补骨脂素 101.0 μg/mL) 7 mL、异补骨脂素对照品溶液(含异补骨脂素 101.0 μg/mL) 5 mL, 平行制备 6 份, 依法测定, 结果补骨脂素的平均加样回收率为 96.7%, RSD 值为 4.21%; 异补骨脂素的平均加样回收率为 94.1%, RSD 值为 2.32%, 表明本方法具有良好的准确度。

2.10 测定结果

取 3 个生产厂家共 6 批样品, 按上述供试品溶液制备方法制备, 测定结果见表 3。6 批样品的中补骨脂素和异补骨脂素的质量分数的平均值为 1.52 mg/片, 可以参考以全部 6 批样品的测定结果平均值的 80% (1.20 mg/片) 作为限度值。按《中国药典》2010 年版补骨脂项下, 补骨脂素和异补骨脂素的总量不得少于 0.70%, 以此折算, 癩闭舒片中补骨脂素和异补骨脂素的总量理论上为 2.10 mg/片, 根据样品实际测定结果暂定含量限度为不得少于 1.20 mg/片, 折算转移率为 57.1%。

表 3 样品中补骨脂素和异补骨脂素的测定结果

Table 3 Concentration of psoralen and isopsoralen in samples

厂家	批号	补骨脂素/(mg·片 <sup>-1</sup> )	异补骨脂素/(mg·片 <sup>-1</sup> )	总量/(mg·片 <sup>-1</sup> )
通宝制药	101101	0.78	0.56	1.34
晨牌药业有限公司	100301	1.13	0.74	1.87
	100302	1.18	0.78	1.96
	100303	1.15	0.75	1.90
李之堂药业有限公司	100808	0.28	0.23	0.51

### 3 讨论

本次试验分别从色谱条件筛选、提取溶剂(甲醇和水饱和正丁醇)、提取方法(超声处理、回流提取和索氏提取法)<sup>[2]</sup>、专属性试验、精密度、稳定性、重复性及回收率等多方面对癯闭舒片的测定方法进行了系统的考察。结果表明在以甲醇 50 mL, 超声 60 min 作为供试品制备方法时, 具有操作简单、提取效率高和无杂质干扰等优点。此前, 8 个生产厂家生产的癯闭舒片分别执行 8 个不同的试行标准, 在取样量、提取过程、色谱条件及含量限度方面均不一致, 此次实验将含量测定项目进行了统一规范, 从而简化了生产和监管方面工作量, 有助于提高工作效率, 节约资源。

现有文献报道以薄层-紫外法<sup>[3]</sup>或薄层扫描法<sup>[4]</sup>同时测定补骨脂和异补骨脂的量, 也有用高效液相色谱法进行测定的, 以甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(45:55)<sup>[5]</sup>、甲醇-水(55:45)<sup>[6,7]</sup>、甲醇-水(50:50)<sup>[8]</sup>、甲醇-水(60:40)<sup>[9]</sup>、乙腈-水(30:70~40:66 梯度洗脱)<sup>[10]</sup>等为流动相, 但对癯闭舒片中两种物质含量测定的报道较少。本研究表明以甲醇-水(43:57)为流动相完全可以达到实验要求, 并无杂质干扰, 回收率结果良好。

补骨脂具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的作用, 常用于肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泄泻的治疗<sup>[2]</sup>。补骨脂中含多种活性成分<sup>[1]</sup>, 香豆素类: 补骨脂素(proralen)、异补骨脂素(isoproralen)、花椒毒素(xanthotoxin)、补骨脂定(psoralidin)、补骨脂定(isopsoralidin)、补骨脂呋喃香豆素(bakuchicin)等<sup>[11]</sup>, 黄酮类: 黄芪苷(agtragalin)、补骨脂甲素(coryllifolin)、补骨脂二氢黄酮甲醚(bavachinin)等<sup>[2]</sup>。其中香豆素类成分补骨脂素(proralen)和异补骨脂素(isoproralen)的药理作用包括抗肿瘤、抗菌、促进皮肤色素增生、治疗增生性病变、杀灭白血菌细胞、抗衰老和止血<sup>[12]</sup>。有研究表明, 补骨脂素和异补骨脂素可用于治疗 T 细胞淋巴瘤和一些自动免疫性疾病<sup>[13]</sup>。具有生物活性的补骨脂素还可通过光加成反应与 DNA 的碱基键合<sup>[14]</sup>。补骨脂素和异补骨脂素作为补骨脂

的主要活性成分, 而补骨脂在癯闭舒片处方中又作为君药, 通过 HPLC 法对癯闭舒片中补骨脂素和异补骨脂素进行含量测定, 可以控制癯闭舒片的质量, 并对其生产工艺具有指导意义。

### 参考文献

- [1] 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): 217-219.
- [2] 中国药典 [S]. 一部, 2010.
- [3] 周吴萍, 杨辉, 黄琼, 等. 同时测定补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 234-237.
- [4] 李守拙, 潘海峰. 薄层扫描法对癯闭舒胶囊中补骨脂素和异补骨脂素的含量测定[J]. 中成药, 2003, 25(8): 627-629.
- [5] 张蕊, 马晓川. HPLC 测定癯闭舒片中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 142-144.
- [6] 王国振, 赵海. 癯闭舒片提取工艺优化和含量测定方法研究[J]. 河北中医药学报, 2014, 29(3): 46-49.
- [7] 叶英响. HPLC 测定癯闭舒片中补骨脂素的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2850-2851.
- [8] 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): 1545-1548.
- [9] 刘松青, 马文秀, 唐先哲, 等. 高效液相色谱法测定药材及中成药中补骨脂素与异补骨脂素含量[J]. 中草药, 1994, 25(7): 355-358.
- [10] 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): 1998-2000.
- [11] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [12] Liu R M, Li A F, Sun A L, et al. Preparative isolation and purification of psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1057: 225-228.
- [13] Dino J C, Ross S R. Synthesis of thio- and oxo-analogues of isopsoralen [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 2831-2837.
- [14] Tarek M E, Eman M E. Noncovalent attachment of psoralen derivatives with DNA: Hartree-Fock and density functional studies on the probes [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2003, 59: 2635-2644.