

HPLC 测定益肾灵颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量

★ 桂劲松 韦汉燕 戴平 朱开梅 (桂林医学院药学院 桂林 541004)

摘要:目的:建立用高效液相色谱法测定益肾灵颗粒中补骨脂素和异补骨脂素含量的方法。方法:采用 C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm);甲醇-0.025 mol/L 磷酸水溶液(55:45)为流动相,流速为 1.0 ml/min;检测波长为 245 nm。柱温:35℃;结果:补骨脂素在 0.01724~0.1724 μg 具有良好的线性关系,平均回收率为 100.3%, $RSD=0.017$ ($n=6$);异补骨脂素在 0.0258~0.258 μg 具有良好的线性关系,平均回收率为 99.99%, $RSD=0.019$ ($n=6$)。结论:该方法简便灵敏,重现性好,是控制益肾灵颗粒内在质量的有效方法。

关键词:益肾灵颗粒;补骨脂素;异补骨脂素;高效液相色谱

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**B

益肾灵颗粒收载于 2005 年版的药典中,由枸杞子、女贞子等十三味药构成,具有温阳补肾的功效,用于肾气亏虚、阳气不足所致的阳痿、早泄、遗精和弱精症^[1],药典中益肾灵颗粒没有制定含量测定标准。补骨脂为益肾灵处方中的主药,补骨脂的主要活性成分为补骨脂素和异补骨脂素。为了有效、准确地控制益肾灵颗粒的质量,本实验选用补骨脂为含量指标成分,采用高效液相色谱法,建立了一种分离率高、稳定性好、分析速度快的益肾灵颗粒中补骨脂素的含量测定方法,为控制制剂质量提供了可靠的方法。

1 仪器与试剂

美国 BECKMAN 高效液相层析系统:125 Solvent Module 压力泵,166 Detector 分析仪。超声仪(T460/A,Transsonic,德国);补骨脂素标准对照品(739-2000209)和异补骨脂素标准对照品(0738-200309)购自中国药品生物制品检定所;试剂均为分析纯(AR),益肾灵颗粒由桂林三金集团提供,批号为 060401、070501 与 070601。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Beckman 公司的十八烷基硅烷键合胶柱 ODS 分析柱(45 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温为 35℃;流动相为甲醇-0.025 mol/L 磷酸水溶液(55:45),检测波长为 245 nm;进样量 10 μl。在此条件下补骨脂素和异补骨脂素与其它成分

达到基线分离,经计算理论塔板数大于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备 分别取补骨脂素和异补骨脂素约适量,精密称定,置于 50 ml 的容量瓶中以甲醇适量溶解并超声 10 分钟后再加甲醇至刻度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,制成混合储备溶液(补骨脂素和异补骨脂素浓度分别为补骨脂素和异补骨脂素浓度分别为 0.086 2, 0.129 0 mg/ml)。

2.3 供试品溶液的制备 取本品约 2.5 g 研细,精密称定,置于 25 ml 的容量瓶中,加入甲醇适量,超声处理 30 分钟,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,用滤纸滤过,再经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 取以处方比例缺补骨脂共十二味药材,加水煎煮 2 次,每次 2 小时,合并煎液,滤过,滤液静置 12 小时,滤取上清液,浓缩至相对密度为 1.18(80℃)的清膏,取清膏,加适量的糖粉,搅匀,制成颗粒,低温干燥,制成 2 500 g,即得。再按“2.3”项下方法,制成阴性样品溶液。

2.5 专属性试验 取阴性对照溶液、对照溶液及供试品溶液,按上述色谱条件测定,结果阴性对照溶液在与补骨脂素、异补骨脂素对照品相同保留时间处,未显示色谱峰,认为无干扰。

2.6 线性关系考察 分别精密吸取“2.2”项下制得的储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 分别置于 25 ml 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别吸取上述对照品溶液 10 μl 按上述色谱条件进行测

定。以峰面积的积分值为纵坐标 Y , 进样量为横坐标 X (μg), 绘制标准曲线, 计算回归方程: 补骨脂素: $Y = 159.76X - 0.3003$, $r = 0.9998$, 线性范围为 $0.01724 - 0.1724 \mu\text{g}$, 在此范围内线性关系良好; 异补骨脂素: $Y = 139.4X - 0.3635$, $r = 0.9998$, 线性范围为 $0.0258 - 0.258 \mu\text{g}$, 在此范围内线性关系良好。

2.7 精密度实验 吸取上述“2.2”项下制得的混合储备溶液 $10 \mu\text{l}$, 连续进样 5 次, 测定峰面积的积分值。结果补骨脂素的 RSD 为 0.906% ; 异补骨脂素的 RSD 为 0.841% 。

2.8 重复性实验 同一批号 (070501) 的样品, 平行取样 6 份约 2.5 g , 精密称定, 加甲醇适量, 超声 30 分钟处理后定容于 25 ml 的容量瓶中, 摇匀, 先用滤纸滤过, 再经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。取上述 6 份供试品溶液分别进样 $10 \mu\text{l}$ 进行测定, 结果补骨脂素平均含量为 $63.40 \mu\text{g/g}$, RSD 为 2.27% ; 异补骨脂素的平均含量为 $50.10 \mu\text{g/g}$, RSD 为 1.69% 。

2.9 稳定性实验 取一批号为 (070501) 的样品约 2.5 g , 精密称定, 加甲醇适量, 超声处理 30 分钟溶解后定容于 25 ml 的容量瓶中, 先用滤纸滤过, 再经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 小时进样 $10 \mu\text{l}$ 进行测定, 结果补骨脂素 RSD 为 1.62% ; 异补骨脂素 RSD 为 1.36% 。表明供试品溶液在 8 小时内基本稳定。

2.10 加样回收率实验 取同一批号样品六份各约 2.5 g 分别置于 25 ml 的容量瓶中加适量的甲醇溶解并超声 10 分钟, 另取储备液适量分别加入上述六份样品溶液中, 加甲醇至刻度制成样品溶液六份, 先用滤纸滤过, 再经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得。取上述六份样品溶液 $10 \mu\text{l}$ 分别进样, 按制剂含量测定方法测定含量, 计算加样回收率。结果补骨脂素平均回收率 100.3% , RSD 为 1.7% , 异补骨脂素相应为 99.99% 、 1.99% 。

2.11 样品含量测试 见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=3$) $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	补骨脂素含量	异补骨脂素含量
20060401	0.063 0	0.049 3
20070501	0.063 4	0.050 1
20070601	0.063 2	0.049 7

3 讨论

3.1 检测波长的选择 补骨脂素于 209、245、290 nm 波长处分别有最大吸收; 异补骨脂素于 205、

246、298 nm 波长处分别有最大吸收。因二者在 245 nm 处有最大吸收, 灵敏度高, 可减少取样量, 减少对柱污染, 故本实验选择 245 nm 为检测波长。

3.2 流动相的选择 在以高效液相色谱法测定药品中补骨脂素与异补骨脂素含量时, 曾选用纯甲醇作为流动相, 但有效峰的保留时间以及补骨脂素与异补骨脂素的分离度不够理想, 根据文献记载在以 HPLC 法测定补骨脂中选用一些不同的流动相, 经比较, 以甲醇-水 (55:45) 为流动相时均得到较理想的保留时间与分离度。而流动相中若水的比例下降或柱温升高均会使补骨脂素与异补骨脂素的分离度降至 1.5 以下, 影响分离效果; 本实验先后以甲醇-水 (55:45)、甲醇-0.025 mol/L 磷酸水溶液 (55:45)、乙腈-水 (40:60)、乙腈-0.025 mol/L 磷酸水溶液 (30:70) 为流动相系统进行了考察, 在流动相为甲醇-0.025 mol/L 磷酸水溶液 (55:45) 系统时, 益肾灵颗粒供试品中补骨脂素、异补骨脂素与相邻组分分离度良好。

3.3 供试品溶液提取剂的选择 分别采用了甲醇、乙醇及 50% 甲醇, 不同浓度的甲醇水溶液进行超声提取作为提取溶剂, 结果显示甲醇提取较为完全。

3.4 供试品溶液提取方法的选择 本试验分别对超声处理法 (文献报道方法) 和索氏提取法 (中国药典 2005 年版一部) 进行了考察, 测定结果提示, 两种方法提取结果接近。鉴于超声处理方法简便、快速, 故确立超声处理法为供试品溶液制备方法。

3.5 供试品溶液提取时间的选择 对超声时间进行了考察, 益肾灵颗粒样品处理 20、30、40 分钟, 结果表明超声处理 30 分钟, 补骨脂素和异补骨脂素基本提取完全。

总之, 本法具有灵敏度高、稳定性与回收率好、特异性高、干扰少、样品处理简单、成本较低等特点, 所得补骨脂色谱峰形对称且无肩峰, 采用峰面积的积分值对进样量回归, 相关性较好。是控制本品质量的有效方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, I 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 129, 577-588.
- [2] 谢杰, 王波, 尹慧晶, 等. HPLC 测定益肾灵颗粒 (无蔗糖) 中淫羊藿苷的含量[J]. 中国中医药杂志, 2006, 13(7): 46-47.
- [3] 张壮丽, 刘力, 徐德生. 高效液相色谱法测定补肾益气颗粒中补骨脂素和异补骨脂素含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 17.
- [4] 王玉忠, 陈延晶, 张凤羽. HPLC 测定补骨脂酊中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 天津药学, 2007, 19(1): 21-23.

(收稿日期: 2008-12-09 责任编辑: 曹征)