

HPLC法同时测定补骨脂药材中补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚的含量^Δ

黄晓婧*,周晓英,文永盛[#](成都市食品药品检验研究院,成都 610045)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3400-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.25

摘要 目的:建立同时测定补骨脂药材中补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Shim-Pack VP-ODS,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为246 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:补骨脂二氢黄酮、补骨脂酚检测进样量线性范围分别为48.9~489 ng($r=0.999\ 8$),784~7 840 ng($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为95.30%~99.63%(RSD=1.45%, $n=9$)、96.89%~100.82%(RSD=1.36%, $n=9$)。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于补骨脂药材中补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚含量的同时测定;不同辐照剂量下药材样品中待测成分的含量均无明显变化。

关键词 补骨脂;补骨脂二氢黄酮;补骨脂酚;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Bavachin and Bakuchiol in *Psoralea corylifolia* by HPLC

HUANG Xiaojing, ZHOU Xiaoying, WEN Yongsheng (Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of bavachin and bakuchiol in *Psoralea corylifolia*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Shim-Pack VP-ODS column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 246 nm, the column temperature was 30 ℃, and the sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of bavachin and bakuchiol were 48.9-489 ng ($r=0.999\ 8$), 784-7 840 ng ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. Average recoveries ranged 95.30%-99.63% (RSD=1.45%, $n=9$), 96.89%-100.82% (RSD=1.36%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, stable and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of bavachin and bakuchiol in *P. corylifolia*.

KEYWORDS *Psoralea corylifolia*; Bavachin; Bakuchiol; Content determination; HPLC

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实^[1],具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功能,临床常用于治疗肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泻泄等^[2-3]。现代药理试验证明,补骨脂药材中2个重要的活性成分补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚具有抗氧化活性、保护肝脏、性激素样作用等,因此快速、准确定量测定这两个活性成分的含量对于补骨脂药材的质量评价具有重要的实际意义^[4-10]。笔者以不同剂量钴-60辐照补骨脂药材^[11-13],建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定该药材中补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚含量的方法,以期对补骨脂药材的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

^Δ 基金项目:国家药品标准提高暨2015年版药典科研项目;广东省科技计划项目(No.2010B030700002)

* 主管药师。研究方向:中药质量标准。E-mail:35944961@qq.com

通信作者:副主任药师。研究方向:中药质量标准。E-mail:cdwyscd@163.com

1260型HPLC仪,包括光电二极管阵列检测器(美国Agilent公司);AUX-220型电子分析天平(日本Shimadzu公司);AE-240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);JY98型超声波清洗仪(南京新辰生物科技有限公司)。

1.2 试剂

补骨脂二氢黄酮对照品(批号:2012032,纯度:98.35%)、补骨脂酚对照品(批号:YM0316SB13,纯度:98.00%)均购自上海源叶生物科技有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材及处理

3批次(批号:G130605-1、G130605-2、G130605-3)补骨脂药材样品(每批次各10个辐照剂量,共计30批, No. S1~S30)由广州市药品检验所送至广州辐锐高能技术有限公司辐照处理。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-Pack VP-ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~

30 min, 30%→60% A; 30~40 min, 60%→70% A; 40~50 min, 70%→80% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 246 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

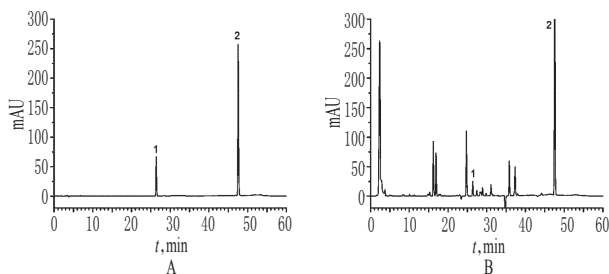
2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取待测成分对照品各适量, 精密称定, 加甲醇制成补骨脂二氢黄酮、补骨脂酚质量浓度分别为 48.9、392 μg/mL 的单一对照品溶液。其中, 补骨脂酚为油状, 难以准确称量, 以整支装量 20 mg 溶解, 按含量 98.00% 计算, 质量浓度为 392 μg/mL。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品 0.12 g, 精密称定, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 准确加入甲醇 25 mL, 超声 (功率: 250 W, 频率: 53 kHz, 下同) 处理 40 min, 取出, 冷却至室温, 摇匀, 静置, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下待测成分对照品溶液、供试品溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。结果, 理论板数以补骨脂酚峰计 > 120 000; 分离度 > 1.5, 各成分基线分离良好。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 补骨脂二氢黄酮; 2. 补骨脂酚
A. substance control; B. test sample; 1. bavachin; 2. bakuchiol

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下补骨脂二氢黄酮对照品溶液 1、2、4、6、8、10 μL 和补骨脂酚对照品溶液 2、3、4、5、10、20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分进样量 (x , ng) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归, 得补骨脂二氢黄酮、补骨脂酚回归方程分别为 $y=1.889 6x+7.087 0$ ($r=0.999 8$)、 $y=0.957 4x+8.625 4$ ($r=0.999 9$)。结果表明, 补骨脂二氢黄酮、补骨脂酚检测进样量线性范围分别为 48.9~489、784~7 840 ng。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下待测成分对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 补骨

脂二氢黄酮和补骨脂酚峰面积的 RSD 分别为 0.78%、0.94% ($n=6$), 表明仪器精密良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液 (No.S15) 适量, 分别于室温下放置 0、1、2、4、8、12 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚峰面积的 RSD 分别为 1.4%、1.6% ($n=6$), 表明供试品溶液室温放置 12 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品 (No.S15) 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, 记录峰面积并计算样品含量。结果, 补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚含量的平均值分别为 0.272、12.870 mg/g, RSD 分别为 1.5%、1.7% ($n=6$), 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 (No.S15) 0.1 g, 共 6 份, 分别加入低、中、高质量的待测成分对照品, 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 Recovery of recovery tests ($n=9$)

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, %			
补骨脂二氢黄酮	0.339 2	0.244 5	0.572 2	95.30	97.29	1.45			
	0.326 7	0.244 5	0.568 3	98.81					
	0.335 8	0.244 5	0.571 2	96.28					
	0.333 5	0.342 3	0.662 8	96.20					
	0.355 8	0.342 3	0.696 8	99.63					
	0.348 6	0.342 3	0.685 8	98.51					
	0.340 3	0.489 0	0.813 4	96.75					
	0.337 8	0.489 0	0.813 4	97.26					
	0.339 2	0.489 0	0.812 8	96.85					
	补骨脂酚	16.048 9	3.920 0	19.880 3			97.74	98.30	1.36
		15.456 9	3.920 0	19.261 2			97.05		
		15.587 1	3.920 0	19.385 1			96.89		
15.778 6		7.840 0	23.591 0	99.65					
16.834 1		7.840 0	24.738 2	100.82					
16.152 6		7.840 0	23.898 2	98.80					
16.100 4	11.760 0	27.736 1	98.94						
15.984 5	11.760 0	27.462 4	97.60						
16.152 5	11.760 0	27.587 1	97.23						

2.9 样品含量测定

取不同辐照剂量的 3 批次样品各适量, 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, 记录峰面积并计算样品含量, 结果见表 2。由表 2 可知, 补骨脂药材样品中补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚的含量在不同剂量辐照后无明显变化。

表2 药材样品含量测定结果($n=3$)Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=3$)

辐照剂量, kGy	补骨脂二氢黄酮			补骨脂酚		
	G130605-1	G130605-2	G130605-3	G130605-1	G130605-2	G130605-3
0	0.253	0.248	0.247	11.971	11.834	11.821
3	0.254	0.244	0.248	12.175	11.564	11.794
6	0.253	0.254	0.247	12.111	12.150	11.872
8	0.246	0.252	0.251	11.862	12.079	12.028
10	0.247	0.247	0.245	11.830	11.806	11.681
25	0.248	0.248	0.235	11.902	11.907	11.417
3+10	0.243	0.245	0.239	11.608	11.696	11.504
6+10	0.244	0.248	0.242	11.655	11.823	11.638
8+10	0.241	0.240	0.242	11.476	11.457	11.555
10+10	0.242	0.242	0.239	11.597	11.594	11.502

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

为了能使补骨脂药材中各主要成分达到完全分离,笔者先后选用了甲醇-水、乙腈-水在不同梯度下进行洗脱,发现乙腈-水分离效果最好,可作为补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚含量测定的流动相。通过二级管阵列检测器检测,发现补骨脂二氢黄酮在235 nm波长处有最大吸收,补骨脂酚在260 nm有最大吸收波长,结合2015年版《中国药典》(一部)补骨脂测定方法,最终将本试验的检测波长定为246 nm。

3.2 提取溶剂与提取方法的考察

预试验中,笔者分别加入甲醇、50%甲醇溶液、70%乙醇溶液各20 mL进行超声处理。结果,提取溶剂为50%甲醇溶液时,药材样品中补骨脂酚含量较低,其他溶液作为提取溶剂时,待测成分含量相差不大,因此最简便的甲醇作为提取溶剂。同时考察了不同提取方法,加热回流30、60 min或超声处理30、40、60 min,发现超声处理40、60 min时,待测成分提取率相差不大,均高于加热回流,为节约试验时间即以超声处理40 min作为提取方法。

综上所述,本研究建立了补骨脂药材中补骨脂二氢黄酮和补骨脂酚的含量测定方法,简便可行,可为补骨脂药材质量控制提供更多依据。同时可以看出,不同剂量辐照后的药材样品中,补骨脂二氢黄酮、补骨脂酚的含量均无明显变化。

参考文献

- [1] 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, 2015:187.
- [2] 曹金一, 刘京晶, 郭宝林, 等. 补骨脂药理作用与临床应用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(6):89-92.
- [3] 邱蓉丽, 李璘, 乐巍. 补骨脂的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2010, 33(10):1656-1659.
- [4] Lee H, Li H, Ru JH, *et al.* Bavachin from psoralea corylifolia improves insulin-dependent glucose uptake through insulin signaling and AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 527-535.
- [5] Seo E, Oh YS, Jun HS. Psoralea corylifolia L. seed extract attenuates nonalcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice[J]. *Nutrients*. 2016, 8(2):83-89.
- [6] Weng ZB, Gao QQ, Wang F. Positive skeletal effect of two ingredients of Psoralea corylifolia L. on estrogen deficiency-induced osteoporosis and the possible mechanisms of action[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015(417):103-113.
- [7] 王天晓, 尹震花, 康文艺. 补骨脂抗氧化、抑制 α -葡萄糖苷酶和抗菌活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14):2328-2332.
- [8] 于悦, 王亚静, 高旭, 等. 补骨脂酚研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(2):174-176.
- [9] 韦妍妍, 张紫佳, 王铮涛, 等. 补骨脂对去卵巢大鼠雌激素样作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):158-161.
- [10] 苗琳, 马尚伟, 柴丽娟, 等. 补骨脂酚拮抗AR转录活性抑制雄激素诱导的前列腺癌细胞LNCaP的增殖[J]. 天津中医药, 2013, 30(5):291-293.
- [11] 李月梅, 刘月红.⁶⁰Co- γ 射线辐照前后大黄饮片中5种成分的含量变化研究[J]. 中国药房, 2013, 24(3):746-748.
- [12] 周晓英, 黄晓婧.《中国药典》补骨脂项下含量测定方法的探讨[J]. 中国药品标准, 2015, 16(1):3-5.
- [13] 黄晓婧, 周晓英. 钴-60辐照对补骨脂药材指纹图谱的影响[J]. 中国药物评价, 2015, 32(6):159-161.

(收稿日期:2016-09-25 修回日期:2017-03-24)

(编辑:张静)