

HPLC法同时测定腰痛胶囊中4种成分的含量^Δ

罗春颖^{1*}, 黄晓婧², 史立川¹, 蒲旭峰^{2#} (1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 成都市食品药品检验研究院, 成都 610000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)36-5123-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.36.22

摘要 目的: 建立同时测定腰痛胶囊中芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent-C₁₈, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为240 nm(芍药苷、补骨脂素、异补骨脂素)、290 nm(桂皮醛), 柱温为35 ℃, 进样量为10 μL。结果: 芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素检测质量浓度线性范围分别为0.004 02~0.100 6 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.024 50~0.612 7 mg/mL($r=0.999\ 8$)、0.005 24~0.131 0 mg/mL($r=0.999\ 9$)、0.005 11~0.127 8 mg/mL($r=0.999\ 9$); 定量限分别为37.17、1.47、21.76、25.57 ng, 检测限分别为11.15、0.44、6.53、7.67 ng; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%; 加样回收率分别为99.02%~100.83%(RSD=0.68%, $n=6$)、98.58%~100.99%(RSD=0.83%, $n=6$)、99.78%~101.69%(RSD=0.89%, $n=6$)、100.06%~102.46%(RSD=0.92%, $n=6$)。结论: 该方法操作简单、结果准确, 适用于腰痛胶囊中芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素含量的同时测定。

关键词 腰痛胶囊; 芍药苷; 桂皮醛; 补骨脂素; 异补骨脂素; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of 4 Constituents in Yaotong Capsules by HPLC

LUO Chunying¹, HUANG Xiaojing², SHI Lichuan¹, PU Xufeng² (1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Chengdu Institute of Food and Drug Control, Chengdu 610000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of paeoniflorin, cinnamaldehyde, psoralen and isopsoralen in Yaotong capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 240 nm (paeoniflorin, psoralen, isopsoralen) and 290 nm (cinnamaldehyde). The column temperature was 35 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of paeoniflorin, cinnamaldehyde, psoralen and isopsoralen were 0.004 02-0.100 6 mg/mL($r=0.999\ 8$), 0.024 50-0.612 7 mg/mL($r=0.999\ 8$), 0.005 24-0.131 0 mg/mL($r=0.999\ 9$), 0.005 11-0.127 8 mg/mL($r=0.999\ 9$), respectively. LOQ were 37.17, 1.47, 21.76, 25.57 ng, respectively; LOD were 11.15, 0.44, 6.53, 7.67 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 99.02%-100.83%(RSD=0.68%, $n=6$), 98.58%-100.99%(RSD=0.83%, $n=6$), 99.78%-101.69%(RSD=0.89%, $n=6$), 100.06%-102.46%(RSD=0.92%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and suitable for simultaneous determination of paeoniflorin, cinnamaldehyde, psoralen and isopsoralen in Yaotong capsules.

KEYWORDS Yaotong capsule; Paeoniflorin; Cinnamaldehyde; Psoralen; Isopsoralen; HPLC; Content determination

腰痛胶囊是由补骨脂、赤芍、肉桂等药材组成的中药复方制剂, 具有补肾活血、强腰止痛的功效, 临床上主要用于治疗肾虚腰痛、腰肌劳损等。该制剂收载于国家食品药品监督管理局国家药品标准(标准文号: YBZ06902006-2015Z), 但仅以芍药苷的含量作为其质量控制指标; 且现有文献多为研究测定腰痛片中相关成分含量测定的方法^[1-4], 尚未有测定腰痛胶囊中多个成分含量的报道。鉴于此, 本课题组参考相关文献^[5-8], 采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定腰痛胶囊中赤

芍的主要成分(芍药苷)、肉桂的主要成分(桂皮醛)、补骨脂的主要成分(补骨脂素和异补骨脂素)含量的方法, 以期完善该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters-2998型HPLC仪, 包括二极管阵列检测器、Empower pro自动进样色谱工作站(美国Waters公司); AE240型电子分析天平(日本Shimadzu公司); AE220型电子分析天平(德国Sartorius公司); SK250H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); Milli-Q Advantage A10型纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

腰痛胶囊(长春海外制药集团有限公司, 批号:

Δ 基金项目: 国家药品标准提高研究课题(No.2015-26)

* 药师, 硕士研究生。研究方向: 中药新制剂、新剂型、新技术。

E-mail: Luochunyingcly@163.com

通信作者: 主任中药师, 博士。研究方向: 中药分析及中药新药。电话: 028-61800231。E-mail: pxf68@263.net

20160701、20161201、20170302,规格:0.3 g/粒);芍药苷对照品(批号:110736-201539,纯度:96.4%)、桂皮醛对照品(批号:110710-201619,纯度:99.4%)、补骨脂素对照品(批号:110739-201416,纯度:99.9%)、异补骨脂素对照品(批号:110738-201614,纯度:99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0 min,10% B;0~15 min,10%→25% B;15~35 min,25%→32% B;35~40 min,32%→90% B);流速:1.0 mL/min;检测波长:240 nm(芍药苷、补骨脂素、异补骨脂素)、290 nm(桂皮醛);柱温:35℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芍药苷对照品5.22 mg、桂皮醛对照品30.82 mg、补骨脂素对照品6.56 mg、异补骨脂素对照品6.40 mg,加甲醇制成质量浓度分别为0.100 6、0.612 7、0.131 0、0.127 8 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品内容物1.2 g,研细,精密称定,置于100 mL量瓶中,加50%甲醇溶液适量,超声(功率:250 W,频率:53 kHz,下同)处理50 min,冷却至室温,再加50%甲醇溶液定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照品溶液 根据样品的处方比例和制备工艺,分别制备缺补骨脂、赤芍和肉桂的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数均≥5 000。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量作为线性混合对照品溶液 I,再取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、0.8、0.6、0.4、1 mL,分别置于1、1、1、1、25 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得线性混合对照品溶液 II~VI。取上述线性混合对照品溶液 I~VI适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

2.5 定量限(LOD)与检测限(LOQ)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD,

结果见表2。

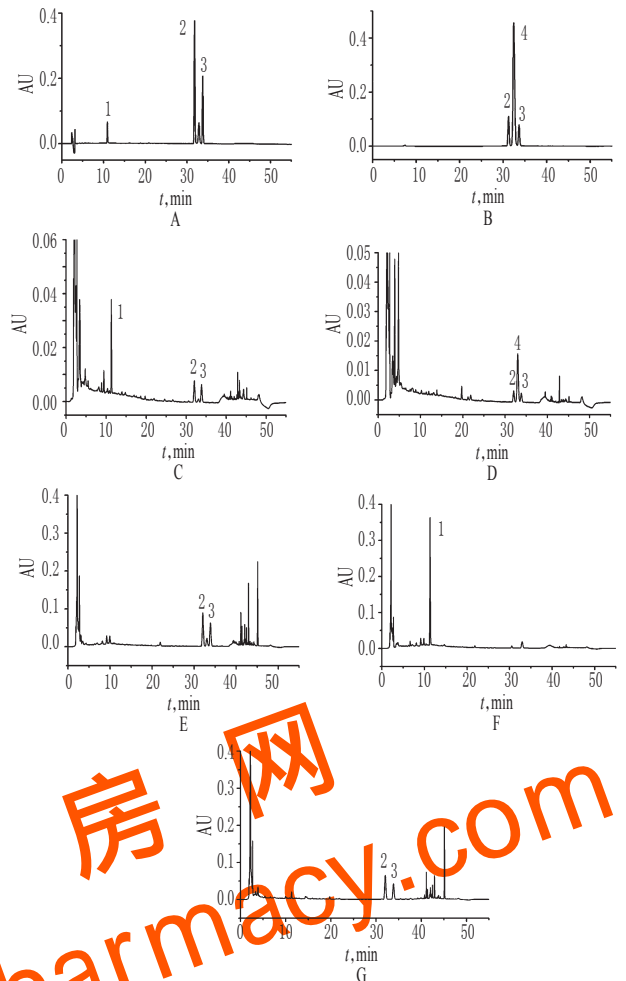


图1 高效液相色谱图
A.混合对照品(240 nm);B.混合对照品(290 nm);C.供试品(240 nm);
D.供试品(290 nm);E.缺赤芍的阴性对照(240 nm);F.缺补骨脂的阴性对照(240 nm);G.缺肉桂的阴性对照(290 nm);1.芍药苷;2.补骨脂素;
3.异补骨脂素;4.桂皮醛

A.mixed control (240 nm); B.mixed control (290 nm); C. test sample (240 nm); D. test sample (290 nm); E. negative control without *Radix Paeoniae Rubra* (240 nm); F. negative control without *Psoralea corylifolia* (240 nm); G. negative control without *Myristica fragrans* (290 nm);
1. paeoniflorin; 2. psoralen; 3. isopsoralen; 4. cinnamaldehyde

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围,mg/mL
芍药苷	$y=1 \times 10^6 x + 9497.7$	0.999 8	0.004 02~0.100 6
桂皮醛	$y=1 \times 10^6 x + 96 621$	0.999 8	0.024 50~0.612 7
补骨脂素	$y=7 \times 10^4 x + 828.22$	0.999 9	0.005 24~0.131 0
异补骨脂素	$y=7 \times 10^4 x - 5 059.6$	0.999 9	0.005 11~0.127 8

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素峰面积的RSD分别为1.40%、0.20%、0.50%、0.40%(n=6),表明仪器精密度良好。

表2 LOQ与LOD测定结果(ng)

待测成分	LOQ	LOD
芍药苷	37.17	11.15
桂皮醛	1.47	0.44
补骨脂素	21.76	6.53
异补骨脂素	25.57	7.67

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20160701)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素峰面积的RSD分别为0.80%、0.99%、0.39%、0.43%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20160701)内容物粉末约1.2 g,共6份,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,芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素含量的平均值分别为2.678 0、0.470 8、0.223 0、0.216 0 mg/g, RSD分别为1.06%、1.37%、0.79%、1.14%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:20160701)约0.6 g,共6份,分别置于100 mL量瓶中,各加入一定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3。

2.10 样品含量测定

取3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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

本课题组采用二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内对混合对照品溶液进行光谱扫描,发现芍药苷在232 nm波长处、补骨脂素与异补骨脂素在246 nm波长处、桂皮醛在290 nm波长处具有强吸收。综合考虑,芍药苷、补骨脂素和异补骨脂素在240 nm波长处均有较大吸收,因此最终确定本试验的检测波长分别为240 nm(芍药苷、补骨脂素和异补骨脂素)、290 nm(桂皮醛)。

3.2 提取溶剂的考察

本课题组考察了甲醇、50%甲醇溶液、乙醇、50%乙醇溶液对待测成分提取率的影响。结果发现,50%甲醇溶液作为提取溶剂时,芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素的总含量最大,因此选择50%甲醇溶液为本试验的提取溶剂。

3.3 提取方法及时间的考察

本试验比较了回流法和超声法对待测成分提取率

表3 加样回收率试验结果($n=6$)

待测成分	取样量, g	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, %
芍药苷	0.618 3	1.655 8	1.555 5	3.196 8	99.07	99.65	0.68
	0.605 2	1.620 7	1.555 5	3.174 1	99.86		
	0.621 9	1.665 4	1.555 5	3.217 9	99.80		
	0.612 1	1.639 2	1.555 5	3.183 8	99.30		
	0.603 9	1.617 2	1.555 5	3.157 5	99.02		
	0.620 8	1.662 5	1.555 5	3.230 9	100.83		
桂皮醛	0.618 3	0.291 0	0.306 3	0.596 1	99.56	100.99	0.83
	0.605 2	0.284 9	0.306 3	0.589 6	99.47		
	0.621 9	0.292 7	0.306 3	0.600 5	100.48		
	0.612 1	0.288 1	0.306 3	0.590 1	98.58		
	0.603 9	0.284 3	0.306 3	0.589 7	99.71		
	0.620 8	0.292 2	0.306 3	0.601 6	100.99		
补骨脂素	0.618 3	0.137 8	0.107 6	0.245 2	99.78	100.71	0.89
	0.605 2	0.134 9	0.107 6	0.242 3	99.84		
	0.621 9	0.138 6	0.107 6	0.248 1	101.69		
	0.612 1	0.136 4	0.107 6	0.245 3	101.15		
	0.603 9	0.134 6	0.107 6	0.242 3	100.10		
	0.620 8	0.1384 6	0.107 6	0.247 8	101.67		
异补骨脂素	0.618 3	0.133 5	0.108 2	0.241 8	100.06	101.23	0.92
	0.605 2	0.130 7	0.108 2	0.239 4	100.44		
	0.621 9	0.134 3	0.108 2	0.245 1	102.46		
	0.612 1	0.132 2	0.108 2	0.242 1	101.62		
	0.603 9	0.130 4	0.108 2	0.239 5	100.82		
	0.620 8	0.134 0	0.108 2	0.244 4	101.99		

表4 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

样品批号	芍药苷	桂皮醛	补骨脂素	异补骨脂素
20160701	2.605 3	0.473 0	0.225 1	0.219 0
20161201	2.727 6	0.473 3	0.225 6	0.216 6
20170302	2.646 3	0.476 2	0.224 9	0.219 1

的影响,结果上述两种方法待测成分的提取率无明显差异,综合考虑超声法操作简便,因此选择超声法为本试验的提取方法;进一步考察超声处理时间(30、40、50、60 min),结果发现超声处理50 min时待测成分的含量最高,因此最终确定本试验的超声处理时间为50 min。

3.4 流动相及洗脱方式的考察

笔者考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液(13:87, V/V)3种流动相系统在等度洗脱与梯度洗脱条件下对本试验色谱的影响^[4,9-15]。结果发现,甲醇-水和乙腈-0.1%磷酸溶液(13:87, V/V)作为流动相等度和梯度洗脱条件下,芍药苷及桂皮醛色谱峰峰形较差;以乙腈-水为流动相梯度洗脱时,各色谱峰的分离度和峰型均良好且保留时间最为理想,因此确定本试验的流动相为乙腈-水,洗脱方式为梯度洗脱。

综上所述,本方法操作简单、结果准确,适用于腰痛胶囊中芍药苷、桂皮醛、补骨脂素、异补骨脂素含量的同时测定。

参考文献

[1] 赵江红,高超旭,郭建功,等.腰痛片的质量标准探讨[J].

电子舌技术在鉴别川牛膝中的应用^A

王斌^{1*}, 刘维², 裴瑾^{1#}, 王黎¹, 胡静¹, 唐小慧¹ (1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 四川省好医生药业集团有限公司, 成都 610036)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)36-5126-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.36.23

摘要 目的: 建立鉴别川牛膝“味”的方法。方法: 采用电子舌技术。采集温度为25℃, 采集时间为120 s, 采集周期为1 s, 搅动速度为1 r/s, 清洗液为纯化水。以电子舌传感器第120 s所得响应值为“味”分析数据, 通过主成分(PC)分析、判别因子(DF)分析对获取的“味”相关数据进行处理, 以此区分川牛膝药材及其混淆品, 以及川牛膝药材的不同产地、不同生长年限及其市售商品的不同批次。结果: 1批川牛膝药材及其4批混淆品判别因子(DF)相差较大; 四川宝兴、金口河、天全产药材样品可聚为一类; 1、2年生与3、4年生药材样品DF相差较大; 不同批次市售商品DF相差较大。结论: 川牛膝药材及其混淆品、不同产地川牛膝药材、不同生长年限川牛膝药材及其不同批次市售商品的“味”存在显著差异; 电子舌技术能快速区分上述类别药材的“味”。

关键词 川牛膝; 电子舌技术; 鉴别; 主成分; 判别因子

Application of the Electronic Tongue in the Identification of *Cyathula officinalis*

WANG Bin¹, LIU Wei², PEI Jin¹, WANG Li¹, HU Jing¹, TANG Xiaohui¹ (1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Sichuan Good Doctor Pharmaceutical Group, Chengdu 610036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for “taste” identification of *Cyathula officinalis*. METHODS: The “taste” of *C. officinalis* was detected by using electronic tongue: sampling temperature of 25 °C, sampling time of 120 s, sampling period of 1 s, rolling speed of 1 r/s, cleaning solution of purified water. The response value of electronic tongue sensor at 120 s were used as “taste” analysis data and obtained “taste” related data was analyzed through principal component (PC) analysis and discriminant factor (DF) analysis. *C. officinalis* and its adulterants, *C. officinalis* from different regions, different ages and different batches were distinguished. RESULTS: There was significant difference in DF between one batch of *C. officinalis* and 4 batches of adulterants. The samples from Sichuan Baoxing, Jinkouhe, Tianquan could be clustered together. There was significant difference in DF be-

- 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 110-111. [8] 姜舜尧. HPLC法测定3种含补骨脂中成药中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 中成药, 2000, 22(4): 293-294.
- [2] 张俊燕. HPLC法测定腰痛片中阿魏酸的含量[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(3): 3-4. [9] 姜辉, 王玉, 付连浩. HPLC法同时测定精制冠心颗粒中5种成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(30): 4261-4264.
- [3] 梁艳芬. HPLC法同时测定腰痛片中芍药苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(1): 21-22. [10] 孙彦超, 李欣, 杜红岩, 等. RP-HPLC测定杜仲叶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1608-1609.
- [4] 李进飞, 郭景文, 史宪海. HPLC法同时测定腰痛片中芍药苷、川续断皂苷VI、补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1099-1104. [11] 彭密军, 张敏, 刘建兰, 等. 高效液相色谱法测定杜仲颗粒中京尼平苷酸和绿原酸的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(4): 300-302.
- [5] 王栋, 胡寿荣, 陈伟康. 腰疼丸中补骨脂素和异补骨脂素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(1): 16-17. [12] 刘慧, 张盛, 刘仲华. HPLC法同时测定杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1547-1549.
- [6] 陈斌, 陈伟, 杨根金, 等. SFE-CGC法测定腰痛片中主要成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(10): 50-52. [13] 周修腾, 何伟, 李勇, 等. 杜仲中松脂醇二葡萄糖苷的测定[J]. 中成药, 2013, 35(1): 118-120.
- [7] 田永华, 钱叶, 俞圆, 等. HPLC法测定腰痛片中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 中成药, 2007, 29(8): 12-13. [14] 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: 165-166.
- [15] 杜伟峰, 丛晓东, 蔡宝昌. HPLC-ESI/MS法测定续断“发汗”前后绿原酸和川续断皂苷VI的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 112-115.

^A 基金项目: 四川省中医局川牛膝种质资源保存和评价研究项目(No.2014F009); 四川省科技部道地药材牛膝、乌头、川芎特征数据的收集和整理(No.2015FY111500-140); 中药资源四川省青年科技创新研究团队项目(No.2015TD0028)

* 硕士研究生。研究方向: 中药资源及中药质量评价。E-mail: 371642163@qq.com

通信作者: 教授, 博士生导师。研究方向: 中药资源及中药质量评价。E-mail: peixjin@163.com

(收稿日期: 2017-05-08 修回日期: 2017-07-05)

(编辑: 刘柳)