

补骨脂素、异补骨脂素在补骨脂注射液中的含量测定及其热稳定性考察

丘小惠,袁小红,林爱华 (广州中医药大学第二临床医学院,广州 510120)

摘要:目的 建立补骨脂注射液中补骨脂素和异补骨脂素高效液相含量测定方法,并探讨补骨脂素和异补骨脂素浓度变化的可能因素。方法 用 Nucleosil C_{18} 色谱柱,柱温 35°C ;检测波长 247nm ;流动相:甲醇-0.1%冰醋酸(55:45)。结果 线性范围分别为:补骨脂素: $1.1 \sim 11\mu\text{g}$, $r=0.999\ 0$;异补骨脂素: $2.6 \sim 26\mu\text{g}$, $r=0.999\ 1$ 。平均回收率为 98.01% ($\text{RDS}=3.37\%$)、 96.90% ($\text{RDS}=2.44\%$)。 100°C 加热 5h补骨脂素、异补骨脂素含量无差异。改变 pH 值条件加热处理,补骨脂素、异补骨脂素浓度比有改变。结论 本方法可用于补骨脂注射液中补骨脂素、异补骨脂素的含量测定。pH 值的改变,可导致补骨脂素和异补骨脂素的转化或降解。

关键词:补骨脂素;异补骨脂素;加热;转化

中图分类号: R917.798.1

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2006)04-0333-03

Assay of psoralen and isopsorale in Fructus Psoraleae injection and the study on the stability to heat

QIU Xiao-hui, YUAN Xiao-hong, LIN Ai-hua (The Second College of Clinic Medicine of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for assay of psoralen and isopsorale in Fructus Psoraleae injection. To observe the factors which the content change. **METHODS** Separation was performed on a Nucleosil C_{18} column, column temperature was 35°C . The UV detect wavelength was set at 247nm . The mobile phase consisted of methanol-0.1% acetic acid(55:45). **RESULTS** The linear range of psoralen was $1.1\mu\text{g} \sim 11\mu\text{g}$ ($r=0.999\ 0$), of isopsorale was $2.6\mu\text{g} \sim 26\mu\text{g}$ ($r=0.999\ 1$). The average recoveries were 98.01% ($\text{RDS}=3.37\%$) and 96.90% ($\text{RDS}=2.44\%$). After being heated at 100°C for 5 hours, the content measurement of them were not different from before. But it were different with the change of pH. **CONCLUSION** The method could be applied to determine

作者简介:丘小惠,副主任药师,硕士生导师。联系电话:81887233 - 37403,13668958409。地址:广东广州大德路 111 号 广东省中医院中药制剂实验室 (510120)

nate the content of psoralen and isopsoralen in Fructus Psoraleae injection . The result showed that psoralen couldn't be transformed into isopsoralen only by heating. The transformation or decomposition would be made by the change of pH.

KEY WORDS: psoralen; isopsoralen; heating; transformation

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实。补骨脂注射液是我院应用多年的传统制剂,采用醇提水沉工艺制备,用于支气管哮喘的治疗疗效确切。补骨脂素和异补骨脂素属呋喃香豆素类,是补骨脂的主要有效成分之一。本实验建立了补骨脂注射液及原药材中补骨脂素和异补骨脂素的 HPLC含量测定方法,发现补骨脂注射液与药材提取液中补骨脂素和异补骨脂素的浓度比例明显发生逆转。有文献报道^[1],补骨脂在提取精制过程中,补骨脂素可部分转化成异补骨脂素,在水提醇沉过程中随着加热时间的延长,补骨脂素含量成比例下降,异补骨脂素升高,认为两者之间存在转化。本实验在补骨脂注射液及原药材中补骨脂素和异补骨脂素的 HPLC法含量测定方法研究基础上,对补骨脂素和异补骨脂素水溶液及其在不同 pH值条件下的热稳定性进行了考察,探讨补骨脂素和异补骨脂素浓度变化的可能因素。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Waters高效液相色谱仪 (996 二极管阵列检测器、600 泵、2010数据处理软件);电子恒温水浴锅 (广东省汕头市医用设备厂);DELTA 320 pH计 (METLER TOLEDO)。

1.2 材料

补骨脂素 (psoralen)、异补骨脂素 (isopsoralen)购自中国生物制品鉴定所。补骨脂药材由本院药学部购进,经董玉珍主任药师鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实。补骨脂注射液由本院中药制剂实验室制备。所用试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Nucleosil C₁₈柱,柱温 35℃;996 二极管阵列检测器,波长 247nm;流动相: 甲醇-0.1%冰醋酸 (55: 45),流速: 1 mL·min⁻¹,进样量 20μL。

2.2 标准曲线的制备

精密称取补骨脂素、异补骨脂素,用甲醇溶解并配制成含补骨脂素 0.02mg·mL⁻¹,异补骨脂素 0.05mg·mL⁻¹的标准品溶液,分别吸取 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0mL,用甲醇稀释定容至 10mL。按上述色谱条件进样 20μL,测量各组峰面积,以浓度和峰面积进行回归,计算回归方程。结果如下: 补骨脂素: A=178023C+35889, r=0.999 0,线性范围: 1.1μg~11μg;异补骨脂素: A=161413C+43059, r=0.999 1,线性范围: 2.6μg~26μg。

2.3 供试品溶液和药材溶液的制备与测定

精密量取补骨脂注射液 4mL,用乙酸乙酯萃取 3次,每次 5mL,合并 3次萃取液,挥干乙酸乙酯,用甲醇定容至 10mL,为供试品溶液。精密称取与 20020316批号补骨脂注

射液同批次的补骨脂药材细粉 (过 60目筛) 0.1g,置 50mL量瓶中,加甲醇近刻度,超声提取 30min,放置 12h,定容,摇匀,为药材醇溶液。吸取上清液 2.5mL,稀释至 10mL,为药材醇溶液供试液。另称取补骨脂药材细粉 100g,按照补骨脂注射液提取工艺操作,用乙醇浸泡、除醇、冷藏、分层,取水溶性部位制成 50mL药材水溶液。精密量取 4mL,以下操作同供试品溶液的制备,制得药材水溶液供试液。供试品溶液和药材供试液分别过滤,进样 20μL,测量峰面积,代入回归方程,计算补骨脂素、异补骨脂素含量及浓度比。结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果

Tab 1 Results of sample determination

样 品	补骨脂素 (μg·mL ⁻¹)	异补骨脂素 (μg·mL ⁻¹)	补骨脂素 / 异补骨脂素
20011014	18.66 ±0.80 (RSD = 4.3%)	36.55 ±0.36 (RSD = 1.0%)	0.51
20020316	17.20 ±0.76 (RSD = 4.4%)	24.39 ±0.24 (RSD = 1.0%)	0.70
药材醇溶液	26.30 ±1.05 (RSD = 4.0%)	23.44 ±0.51 (RSD = 2.2%)	1.12
药材水溶液	89.50 ±3.58 (RSD = 4.0%)	76.60 ±2.30 (RSD = 3.0%)	1.17

2.4 精密度试验

精密称取 20011014批号样品 5份,按供试品溶液的制备与测定项下操作,分别测定各组分含量,计算各组分平均值和 RSD,各组分 RSD = 4.3%。

2.5 加样回收率试验

精密称取补骨脂素、异补骨脂素,配制成含补骨脂素 13.57μg·mL⁻¹,异补骨脂素 31.07μg·mL⁻¹的标准溶液,吸取 2.5mL,取 20011014批号补骨脂注射液吸取 2.0mL,混合均匀,按供试品溶液的制备与测定项下操作,制备成加样回收率供试品液,同法测定各组分含量,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 回收率试验测定结果

Tab 2 Results of recovery test

组分名	样品中含 量 (μg)	标准品加 入量 (μg)	测得值 (μg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
补骨脂素	37.32	33.92	69.56	95.05	98.01 ±3.30	3.37
	37.32	33.92	69.80	95.75		
	37.32	33.92	69.90	96.05		
	37.32	33.92	71.83	101.74		
	37.32	33.92	71.74	101.47		
异补骨脂素	73.10	77.68	147.01	95.15	96.90 ±2.44	2.52
	73.10	77.68	146.97	95.09		
	73.10	77.68	147.08	95.17		
	73.10	77.68	150.82	100.05		
	73.10	77.68	150.03	99.03		

2.6 加热稳定性考察

2.6.1 不同加热时间稳定性考察 量取含一定量的补骨脂素、异补骨脂素标准品水溶液和“2.3”项下制备的补骨脂药材水溶液各 2mL 于具塞刻度试管共多份,于 100℃水浴加热不同时间,取出后用常水冷却至室温,按“2.3”项下供试品溶液的制备方法提取制备并测定,平行操作并测定二次。各溶液中的补骨脂素和异补骨脂素浓度比见表 3、表 4。

表 3 标准品水溶液热稳定性考察

Tab 3 Stability by heating of standard substance in water			
加热时间 (min)	补骨脂素 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	异补骨脂素 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	补骨脂素 / 异补骨脂素
0	20.60	13.09	1.58
20	21.25	13.58	1.56
40	21.32	13.62	1.57
60	21.27	13.86	1.53
80	22.44	14.16	1.58
100	22.26	13.98	1.59
120	21.55	13.31	1.62

表 4 补骨脂药材水溶液热稳定性考察

Tab 4 Stability by heating of water-extract of Fructus Psoraleae			
加热时间 (min)	补骨脂素 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	异补骨脂素 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	补骨脂素 / 异补骨脂素
0	89.50	76.60	1.17
60	88.60	75.68	1.17
120	86.30	72.74	1.19
180	87.87	75.16	1.17
240	87.65	73.87	1.19
300	87.56	72.82	1.20

比较不同加热时间补骨脂素、异补骨脂素浓度,各组无显著差异。表明单纯加热处理不足以导致补骨脂素、异补骨脂素之间的转化或降解。

2.6.2 不同 pH 值条件下热稳定性考察 配制一定浓度的补骨脂素、异补骨脂素标准品水溶液,分为 8 份,用酸碱将溶液调整为不同 pH 值,于 100℃水浴加热 2h,取出后用常水冷却至室温,各量取 5.0mL,按“2.3”项下供试品溶液的制备方法提取制备并测定,平行操作并测定二次。各溶液中的补骨

脂素和异补骨脂素浓度比见表 5。

表 5 不同 pH 值条件下热稳定性考察

Tab 5 Stability by heating of standard substance in water of different pH								
浓度比	pH 值							
	3.06	4.09	4.94	6.36 (原液)	6.97	7.94	8.98	10.09
补骨脂素 / 异补骨脂素	1.02	2.46	1.01	0.96	0.83	1.01	1.64	1.30

比较不同 pH 值条件下加热相同时间补骨脂素、异补骨脂素浓度比差异,结果与原液 (pH = 6.36) 比较 pH 值为 3.06、4.94、7.94 时各组浓度比差异不显著; pH 值为 6.97 时,补骨脂素相对异补骨脂素浓度降低, pH 值为 4.09、8.98、10.09 时补骨脂素相对异补骨脂素浓度升高。

3 讨论

补骨脂素与异补骨脂素同属呋喃香豆素类的同分异构体,补骨脂素为线型结构(6,7-呋喃香豆素),异补骨脂素为角型结构(7,8-呋喃香豆素)。呋喃香豆素类结构中的呋喃环与内酯环为不稳定结构,对酸碱、光等不稳定。补骨脂注射液中的补骨脂素和异补骨脂素的浓度比例与原药材提取液中的浓度比例明显发生逆转。推测在提取制备过程中随着加热时间的延长,两者之间存在转化。研究结果表明单纯加热处理显然不足以导致补骨脂素转化为异补骨脂素。而当溶液 pH 值改变后,补骨脂素与异补骨脂素浓度比例可发生变化,可能存在转化或降解。补骨脂注射液与原药材提取液中补骨脂素和异补骨脂素的浓度比例发生逆转,可能与注射液制备过程中原药液 pH 值的改变有关。

参考文献

[1] 苏子仁,徐必达.补骨脂素、异补骨脂素在骨康提取精制过程中化学转化的研究[J].中国实验方剂学杂志,1997,3(6):1-2.