

超临界流体色谱法测定补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素含量

陆峰*, 刘荔荔, 李玲, 吴玉田

(第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海 200433)

摘要 目的:建立超临界流体色谱法用于测定补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的含量,并研究其影响因素。方法:用改性的超临界 CO₂ 萃取中药补骨脂,超临界流体色谱法测定其中的香豆素成分(补骨脂素和异补骨脂素)含量。色谱条件:15 cm×1 mm×3 μm 氨基柱,流动相为含 5% 甲醇的 CO₂,柱温 40℃,柱头压 27.6 MPa,UV 247 nm 检测。结果:在选定固定相条件下,流动相对组分的洗脱和选择性影响最大,柱温、柱压次之。补骨脂素的回收率为 96.9%(RSD=1.8%),异补骨脂素的回收率为 95.1%(RSD=1.6%)。结论:与超临界流体萃取法联用,本法可用于香豆素类化合物的分离分析。

关键词 超临界流体色谱法;补骨脂素;异补骨脂素;超临界流体萃取法

超临界流体色谱法(supercritical fluid chromatography, SFC)兼有气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)的某些优势^[1],是近年来发展的色谱法重要分支之一。补骨脂作为一种较常用中药,成分含量测定的报道不多。本文用超临界流体萃取法(supercritical fluid extraction, SFE)萃取补骨脂中的香豆素成分(补骨脂素和异补骨脂素),并首次用填充柱 SFC^[2]测定其含量,同时研究温度、压力、流动相等因素对色谱结果的影响。

材 料 和 方 法

药品和试剂 补骨脂药材由上海长海医院提供,并由本院生药教研室李彬鉴定;补骨脂素(psoralen)、异补骨脂素(isopsoralen)对照品购自中国药品生物制品检定所;SFE 和 SFC 所用 CO₂ 购自上海 BOC 气体公司;蒽(内标物)和氯仿为分析纯;甲醇为 HPLC 级。

仪器 SFX 2-10 萃取器, model 100DX/DM 注射泵,泵控制器, V⁴ MWD 检测器(ISCO, USA), eppendorf CH-30 色谱柱加热器。

SFE 条件 萃取溶剂为 CO₂, 加入氯仿 0.06 ml 作改性剂,压力为 38.5 MPa,温度为 70℃,静态萃取 1 min,动态萃取 7 ml,限流管温度 80℃,甲醇作吸收溶剂。

SFC 条件 用 Spherisorb NH₂ 柱(150 mm×1 mm×3 μm, Alltech, USA),流动相为含 5% 甲醇的

CO₂,柱头压 27.6 MPa,柱温 40℃,进样量为 0.5 μl,流速为 0.10 ml·min⁻¹,采用 50 cm×15 μm 石英毛细管作限流管,检测器 AUFS 0.05,247 nm 检测。

结 果 与 讨 论

1 固定相/流动相对保留的影响

以超临界 CO₂(含少量改性剂)为基本流动相的 SFC 是正相色谱,一些极性较弱的化合物在 C₁₈ 柱上几乎不保留。本实验中补骨脂素和异补骨脂素很快从 C₁₈ 柱上洗脱,几乎没有分离效果,所以未用 C₁₈ 柱而改用正相 NH₂ 柱。

改性剂浓度对组分的保留影响很大。在 NH₂ 柱上,用纯 CO₂ 作流动相时,补骨脂素和异补骨脂素在 60 min 内未洗脱;而在高浓度改性剂时,因两者结构较相似,几乎同时洗脱。本实验用 5% 甲醇时洗脱效果良好,见图 1。

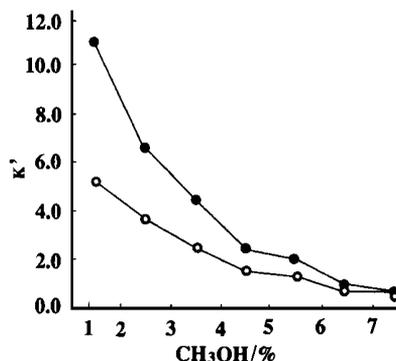


Fig 1 Capacity ratio of psoralen and isopsoralen vs methanol percentage in CO₂. NH₂ column, 27.6 MPa, 40℃, 0.10 ml·min⁻¹, UV 247 nm. ○ — ○ Psoralen; ● — ● Isopsoralen.

2 温度、压力对 SFC 的影响

温度和压力对保留也有影响。本实验在 20.7 ~ 34.5 MPa 压力范围和 30 ~ 60 °C 温度范围内考察

了这两个因素的影响。保留时间随压力增大而缩短 (图 2A); 随温度升高而延长 (图 2B)。

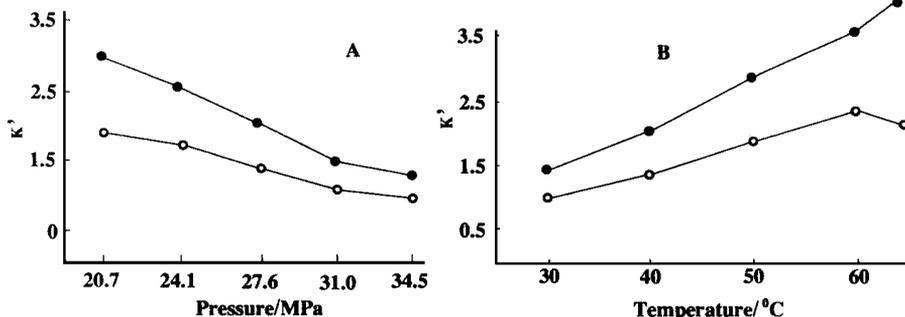


Fig 2 Capacity ratio of psoralen and isopsoralen vs pressure (A, 40 °C) and temperature (B, 27.6 MPa). 5% methanol in CO₂. • — • Psoralen; ○ — ○ Isopsoralen.

3 标准曲线

在上述最佳色谱条件下, 补骨脂素(A)、异补骨脂素(B)、内标蒽(C)的色谱图见图 3, 保留时间分别为 6.37, 5.00 和 4.00 min。

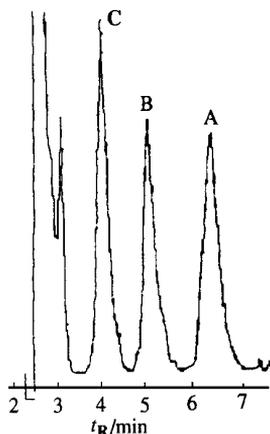


Fig 3 Chromatogram of psoralen (A), isopsoralen (B) and anthracene (C, internal standard). Condition as in Fig 1, 5% methanol in CO₂.

用甲醇分别配制对照品溶液和内标溶液: 补骨脂素 0.423 mg·ml⁻¹, 异补骨脂素 0.17 mg·ml⁻¹, 蒽 1.343 mg·ml⁻¹。分别精密吸取对照品溶液 25, 50, 100, 200, 400 和 600 μl 于 10 ml 量瓶中, 加入内标溶液 50 μl, 定容, 进行 SFC 分析。以对照品峰与内标峰面积之比(Y)对各自浓度(X, μg·ml⁻¹) 回归, 得回归方程。

补骨脂素: $Y = 23.49X + 1.37 \times 10^{-4}$, $r = 0.999$;

异补骨脂素: $Y = 20.04X + 0.016$, $r = 0.999$ 。

4 方法回收率

精密量取补骨脂素、异补骨脂素溶液各 150, 250 和 350 μl, 加入酸洗硅藻土 50 mg, 挥干溶剂, 按 SFE 条件萃取; 甲醇吸收液再加入内标溶液 50 μl, 定容、稀释, 各进样 3 次, 按 SFC 步骤测定, 计算上述 3 种浓度的回收率, 补骨脂素的回收率为 96.9% ($n = 9$, RSD = 1.8%); 异补骨脂素的回收率为 95.1% ($n = 9$, RSD = 1.6%)。

5 样品测定

分别取 3 批干燥药材粉碎, 过 100 目筛, 精密称取粉末 50 mg 按上述条件萃取; 在甲醇吸收液中加入适量内标液, 稀释后每份溶液进样 3 次, 按上述色谱条件测定, 代入标准曲线, 得 3 批药材中的补骨脂素、异补骨脂素含量分别为 0.77%, 0.70%; 0.86%, 0.82%; 0.65%, 0.53%。

以上结果表明: 流动相组成是影响分离的最重要因素, 加入改性剂可大大改善中等极性化合物的洗脱分离。系统的温度和压力对分离也有影响。与 SFE 联用, SFC 可以较方便地用于某些香豆素类化合物的分离分析。

参 考 文 献

- 1 Taylor LT. Trends in supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr Sci*, 1997, **35**: 374
- 2 Hanson M. Selectivity changes towards steroids in packed column SFC induced by temperature and pressure variation. *Chromatographia*, 1994, **39**: 431

DETERMINATION OF PSORALEN AND ISOPSORALEN IN *PSORALEA CORYLIFOLIA* L. BY SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY

Lu Feng (Lu F) , Liu Lili (Liu LL) , Li Ling (Li L) and Wu Yutian (Wu YT)

(*Department of Pharmaceutical Analysis , Second Military Medical University , Shanghai 200433*)

ABSTRACT AIM: To establish a supercritical fluid chromatographic (SFC) method for determination of the coumarin compounds , psoralen and isopsoralen , in *Psoralea corylifolia* L. , the influence factors on SFC were investigated . **METHODS:** Psoralen and isopsoralen were extracted from *Psoralea corylifolia* with modified supercritical carbon dioxide . The SFC system consists of a NH_2 column (150 mm \times 1 mm \times 3 μm) with carbon dioxide containing 5 % methanol and UV 247 nm detection . The optimized column temperature and pressure were 40 $^\circ\text{C}$ and 27.6 MPa , respectively . **RESULTS:** The composition of mobile phase was shown to have the greatest influence on retention and selectivity with suitable stationary phase . The recoveries of psoralen and isopsoralen are 96.9 % (RSD = 1.8 %) and 95.1 % (RSD = 1.6 %) respectively . **CONCLUSION:** SFC , combined with supercritical fluid extraction (SFE) , can be used to analyze coumarin compounds .

KEY WORDS supercritical fluid chromatography ; psoralen ; isopsoralen ; supercritical fluid extraction