

- dation products [1]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33: 667-672.
- [8] Monser L, Darghouth F. Rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of tetracyclines antibiotics and 6-Epi-doxycycline in pharmaceutical products using porous graphitic carbon column [1]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 23: 353-362.
- [9] Yekkala R J, Diana, Adams E, *et al.* Development of an Improved Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Doxycycline [1]. *Chromatographi*, 2003, 58(5/6): 313-316.
- [10] 《欧洲药典》. 第四版 [1]. 4. 0: 1090.

反相离子对色谱法测定不同规格益母草中盐酸益母草碱的含量

陈碧莲¹, 祝明¹, 黄卫国², 郭增喜¹ (1. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310014; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要 目的:建立了反相离子对色谱法测定益母草中盐酸益母草碱含量的方法。方法: Agilent SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4% 辛烷磺酸钠的 0.1% 磷酸溶液(24: 76); 检测波长: 277 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹。结果: 盐酸益母草碱进样量在 0.028 66 ~ 1.433 μg 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率为 98.0%, RSD 为 0.6%。结论: 此方法简便、灵敏度高, 重现性好, 可用于益母草的质量控制。

关键词: 反相离子对色谱; 益母草; 盐酸益母草碱

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2011) -2-111-3

Determination of Leonurine Hydrochloride in Different Specifications of Herba Leonuri by Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography

Chen Bi-lian¹, Zhu Ming¹, Huang Wei-guo², Guo Zeng-xi¹ (1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004; 2. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine. Hangzhou 310053)

Abstract Objective: A method was developed for determination of leonurine hydrochloride in Herba Leonuri by reversed-phase ion-pair chromatography. **Methods:** The separation was performed on an Agilent SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.4% sodium octanesulfonate of 0.1% phosphoric acid solution (24: 76) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 277 nm. **Results:** There was a good linear relationship with the range of 0.028 66-1.433 μg. The average recovery was 98.0% (RSD = 0.6%). **Conclusion:** The method is simple, sensitive and reliable, it can be used as quantitative analysis method for Herba Leonuri.

Key Words: Reversed-phase ion-pair chromatography; Leonurine hydrochloride; Herba Leonuri

益母草为唇形科植物益母草(*Leonurus japonicus* Houtt.) 的新鲜或干燥地上部分, 为治疗妇科疾病的常用中药, 标准收载于《中国药典》2005 年一部 [1]。益母草的化学成分主要有生物碱类、二萜类、甾醇、黄酮类、有机酸等 [2], 其中生物碱以水苏碱(stachydrine) 和益母草碱(leonurine) 为主, 而目前对益母草药材的质量控制一般仅限于测定盐酸水苏碱的含量, 但药理研究结果表明益母草碱具有显著的药理活性, 具有抑制血小板聚集, 防止血栓的形成 [3] 等药理作用。

本实验建立了反相离子对色谱法测定益母

草中盐酸益母草碱含量的方法, 并测定了不同规格的益母草药材, 实验结果表明该方法简单, 准确可靠, 可为更有效控制益母草药材的质量提供可靠的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪; Mettler AE240 电子天平; SIGMA NSKI-15K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

1.2 试剂与样品

乙腈为色谱纯; 水为重蒸水; 其余试剂为分析

基金项目: 国家十一五“重大新药创制”专项(编号: 2009ZX09308-001)。

作者简介: 陈碧莲, 女, 副主任中药师。学科及研究方向: 中药分析。联系电话: 13735466572。

纯; 盐酸益母草碱对照品(生产厂家提供, 纯度大于 98%); 益母草药材(采自山东、江苏、浙江等地), 经本所郭增喜副主任中药师鉴定, 来源均为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.4% 辛烷磺酸钠的 0.1% 磷酸溶液(24:76); 检测波长: 277 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL · min⁻¹。在此色谱条件下益母草碱峰与其它组分峰能得到较好分离, 结果见图 1。

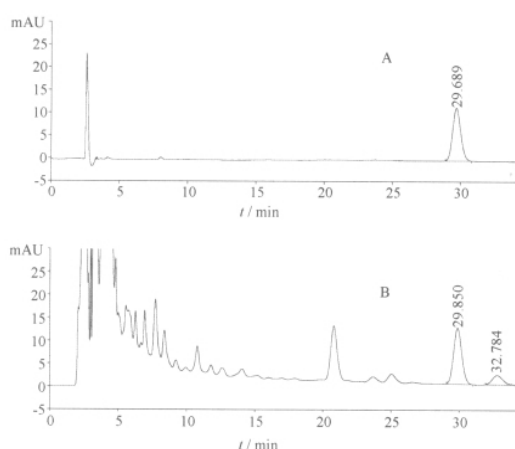


图 1 益母草高效液相色谱图

A. 盐酸益母草碱对照品; B. 益母草药材

2.2 对照品溶液的制备

取盐酸益母草碱对照品适量, 精密称定, 加 70% 乙醇制成每 1 mL 含 30 μg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过三号筛)约 1 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定重量, 用 70% 乙醇补足减失重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取盐酸益母草碱对照品溶液(0.028 66 mg · mL⁻¹) 1, 3, 5, 8, 10, 20 μL 及盐酸益母草碱对照品溶液(0.286 6 mg · mL⁻¹) 5 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以峰面积为纵坐标, 以进样量(μg)为横坐标, 进行线性回归, 得线性方程为: $Y = 1\,730.776\,6X - 3.613\,5$, $r = 1.000\,0$, 表明盐酸益母草碱在 0.028 66 ~ 1.433 μg 进样量范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 所得峰面积的 RSD 为 0.6% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 称取同一批样品各 6 份, 按拟定的含量测定方法提取测定, 结果平均含量为 0.777 mg · g⁻¹, 相对标准偏差(RSD) = 1.2% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

2.4.4 回收率试验 精密称取已知含量的样品约 0.5 g, 添加盐酸益母草碱对照品适量, 按上述色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1。结果表明本法具有良好的回收率。

表 1 回收率试验结果

试验 编号	取样量 /g	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.503 2	0.391 1	0.429 9	0.809 6	97.36	98.0	0.6
2	0.498 4	0.387 4		0.808 0	97.85		
3	0.502 5	0.390 5		0.811 1	97.82		
4	0.506 1	0.393 3		0.818 1	98.80		
5	0.506 7	0.393 8		0.818 3	98.75		
6	0.496 9	0.386 2		0.805 7	97.58		

2.4.5 耐用性试验 ①稳定性试验: 取同一份供试品溶液, 在 0, 3, 8, 12, 18, 28, 42 h 分别进样, 记录峰面积, RSD 为 1.2%, 表明供试品溶液中的盐酸益母草碱至少在 42 h 内保持稳定。②流动相酸度变化试验: 实验中比较了 3 种不同浓度的磷酸溶液: 0.05%, 0.1%, 0.15%, 结果表明酸度在 0.05% ~ 0.15% 浓度范围变动, 对供试品的色谱行为影响不

大。③柱温变化试验: 实验中比较了不同柱温: 20℃、30℃、40℃, 结果表明柱温对色谱行为有较大的影响, 柱温在 30℃ 时分离效果最佳。④色谱柱品牌变化试验: 分别采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Kromasil KR100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 种不同品牌色谱柱对样品进

行测定,结果所测得的样品含量偏差在 3.0% 以内且均分离良好。

2.5 不同采收期益母草及益母草中不同药用部位含量测定结果

《中国药典》2005 年版中干益母草药材采集时间为夏季茎叶茂盛、花未开或初开时采割,但目前市场有部分商品是用收取种子(茺蔚子)后的老茎(如表 2 中 1 号样品),另外市场上还存在较多的童子益母草(一般为春季幼苗期采割),所以收集了不同采收期益母草药材共 8 批,同时为初步测定盐酸益母草碱在不同药用部位的分布情况,取同一批益母草药材的茎和叶按“2.3”项下操作,在上述色谱条件下测定其中盐酸益母草碱的含量,结果见表 2。

表 2 样品中盐酸益母草碱含量测定结果

编号	规格	采收期	产地	批号	平均含量/%
1	益母草	9 月	安徽	2008.2	0.007
2	益母草	7 月	江苏	080812	0.160
3	益母草	7 月	浙江	080811	0.095
4	益母草	7 月	山东	080813	0.072
5	益母草	8 月	江苏	2009.2	0.033
6	童子益母草	4 月	江苏	1451	0.021
7	童子益母草	4 月	江苏	1450	0.023
8	童子益母草	5 月	安徽	YC0012008	0.170
9	益母草茎	7 月	浙江	080711	0.048
10	益母草叶	7 月	浙江	080711	0.149

3 讨论

3.1 实验中曾比较了乙腈-0.1% 磷酸系统、乙腈-磷酸盐缓冲液系统、乙腈-0.1% 二乙胺系统、甲醇-0.1% 二乙胺系统等常见的反相洗脱剂,结果盐酸益

母草碱均不能和杂质峰很好分离,考虑到盐酸益母草碱为生物碱类化合物,所以采用离子对试剂进行分离,经比较不同浓度的十二烷基磺酸钠和辛烷磺酸钠溶液,最终以乙腈-0.4% 辛烷磺酸钠的 0.1% 磷酸溶液(24:76) 分离效果最佳,故选择作为方法的流动相。

3.2 本实验对提取溶剂,提取方法和时间进行优化试验,结果显示 70% 甲醇、70% 乙醇提取效率最高,色谱行为也基本一致,所以选择了较为环保的 70% 乙醇作为提取溶剂,另超声提取效率较回流提取和索氏提取略低,而索氏提取与回流提取基本一致,由于索氏提取方法较烦琐且提取的杂质较多,故选择回流提取,再比较不同回流提取时间:1,2,3 h,结果回流 2 h 已提取完全,所以本实验选择回流 2 h。

3.3 对不同采收期益母草及益母草中不同药用部位测定结果表明,益母草叶中盐酸益母草碱含量明显高于茎,另外盐酸益母草碱的含量高低可能与采收季节有一定关系,如 3 份童子益母草样品中 8 号样品及 2 号样品较 6、7 号样品相对成熟,盐酸益母草碱的含量增加,但是要得出确凿的结论,有待于继续深入研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.《中国药典》.2005 年版.一部[S].2005:203.
- [2] 张炯,彭国平.益母草属化学成分研究进展[J].天然产物研究与开发,2003,15(2):162-166.
- [3] 周远鹏,刘文化,邵国贤.益母草碱、丁香酰肼醇及丁香酸氨基醇酯类化合物抗血小板聚集活性及其与结构的关系[J].中国药理学杂志,1996,31(5):271-274.

HPLC 法测定益心酮片中五种成分的含量

赵彩云¹, 王强² (1. 江苏省徐州药品检验所,徐州 221006;2. 中国药科大学,南京 210009)

摘要 目的:建立 HPLC 同时测定益心酮片中牡荆素-4"-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷的含量。方法:采用 HPLC 法,色谱柱为 Sepax HP C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5μm);流动相: A 为乙腈-四氢呋喃(20:1),B 为 0.5% 甲酸溶液,采用梯度洗脱;0~10 min,A 为 14%~17%,B 为 86%~83%;10~26 min,A 为 17%~18%,B 为 83%~82%;26~28 min,A 为 18%~14%,B 为 82%~86%;检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 32℃。结果:该方法加样回收率牡荆素-4"-O-葡萄糖苷为 99.61% (RSD=0.64%),牡荆素鼠李糖苷为 99.30% (RSD=0.49%),牡荆素为 98.97% (RSD=1.03%),芦丁为 99.45% (RSD=0.85%),金丝桃苷为 99.27% (RSD=0.96%)。结论:该方法准确可靠,重现性好,可用于益心酮片的质量控制。

作者简介: 赵彩云,女,副主任中药师。学科及研究方向:中药检验。联系电话:0516-85608573。