

文章编号:1006-6144(2008)03-0347-03

## 高效液相法测定益母草中益母草碱含量研究

江帆<sup>1,2</sup>, 聂晶<sup>2</sup>, 余建清<sup>1</sup>, 邱国福<sup>1</sup>, 胡先明<sup>\*1</sup>

(1. 武汉大学药学院, 武汉 430072; 2. 湖北省医药工业研究院, 武汉 430061)

**摘要:**建立一种高效液相色谱(HPLC)检测鲜益母草及其制剂中益母草碱含量的方法。色谱柱为依利特 Hypersil 柱,流动相为 0.00125 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-CH}_3\text{CN}$  (87/13, V/V), 流速 1 mL/min, 柱温 35℃, 检测波长为 276 nm。益母草碱的标准曲线回归方程是  $y = 227.394x + 1.292.605$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 5$ )。该方法测定益母草及其制剂中益母草碱的含量, 具有简便、准确及可靠的优点。

**关键词:**益母草; 益母草碱; 高效液相色谱

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A

益母草 (*Herba Leonuri*) 为唇形科植物, 其主要有效成分为丁香酸、益母草碱等<sup>[1]</sup>。益母草碱具有活血化淤、利尿消肿的作用, 是中医妇科良药。它能够抑制血小板的聚集, 防止血栓的形成<sup>[2]</sup>; 可扩张外周血管, 降低血管阻力, 具有一定的抗高血压, 降低冠脉阻力, 增加冠脉血流量, 保护心脏等药理作用<sup>[3]</sup>。益母草碱的测定方法有雷氏盐剩余比色法<sup>[4]</sup>、雷氏盐沉淀溶解比色法<sup>[5]</sup>、紫外分光光度法<sup>[6]</sup>、薄层扫描法<sup>[7]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)法<sup>[8,9]</sup>等。

本实验采用高效液相法对含益母草制剂中的益母草碱进行含量测定, 结果表明, 该方法较其他方法更准确可靠, 从而为益母草及其制剂的质量控制提供了更可靠的方法。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器、试剂及材料

LC-10AT 型液相色谱仪(日本, 岛津公司)。

益母草碱对照品(武大检测中心合成, 纯度为: 99.81%); 甲醇、磷酸为分析纯, 乙腈为色谱纯, 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂分厂), 水为双蒸水。

益母草购自武汉龙泰药业有限公司。

#### 1.2 色谱分析条件

色谱柱为依利特 Hypersil (250 × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 流动相为乙腈 0.025 mol/L 磷酸二氢钾 (pH 3.5) (13/87 V/V); 检测波长为 276 nm。理论塔板数按益母草碱峰计算不低于 2 000。

空白干扰试验分别精密吸取对照品溶液 20 μL, 供试品溶液与缺益母草空白溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪测定。

#### 1.3 益母草碱的提取及鉴别

取益母草粉末 31.4 g, 加水煎煮三次, 第一次用 360 mL, 第二次加水 280 mL, 第三次加水 200 mL, 合并水提取液。于水提取液中加入 0.1 mol/L 的 HCl 10 mL, 振摇, 加入 70% 乙醇 80 mL, 静置。取上层清液, 加入 2%  $\text{NaHCO}_3$  溶液 12 mL, 振摇, 用氯仿萃取两次, 每次 250 mL, 分出氯仿层, 挥干溶剂。残渣用 95% 乙醇定容至 2.3 mL, 作为供试品溶液。另取益母草碱对照品 1.0 mg, 加 95% 乙醇 1 mL, 定容, 作为对照品溶液。

收稿日期: 2007-07-26

修回日期: 2007-11-02

\* 通讯联系人: 胡先明, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物合成化学、天然产物化学及其药剂学研究。

吸取上述两种溶液各 2~4  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 置层析缸内, 以氯仿-正丁醇-水-盐酸 (4:1:0.4:1) 的上层溶液为展开剂, 上行法展开后, 取出, 晾干后以碘化铋钾溶液显色。结果显示供试品与对照品显相同颜色的斑点, 具有相近的  $R_f$  值, 表明供试品存在益母草碱成分。

#### 1.4 实验方法

对照品溶液的制备: 精密称取益母草碱对照品适量, 加甲醇制成浓度  $2.5 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$  的溶液, 即得。供试品溶液的制备: 精密量取益母草供试品 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 超声, 即得。阴性对照溶液的制备: 取本品阴性, 按对照品溶液的制备方法制备阴性样品溶液。

## 2 结果及讨论

### 2.1 检测波长的选择

精密称取益母草碱对照品, 配制成 0.25 mg/mL 的甲醇溶液, 以甲醇为空白, 在 190~800 nm 波长范围内扫描益母草碱对照品溶液。吸收光谱显示, 在 276 nm 处益母草碱对照品有最大吸收峰, 故选择 276 nm 为检测波长。

### 2.2 回收率试验

精密称取适量含益母草碱的同一批样品 6 份, 分别精确加入一定对照品, 按供试品溶液的提取方法操作, 测定其含量并计算回收率, 测得平均回收率为 97.02%, 其相对标准偏差 (RSD) 为 1.04%, 见表 1。

表 1 回收率试验结果

Table 1 Recovery test

Sample (g)	Content ( $\mu\text{g}$ )	Added ( $\mu\text{g}$ )	Found ( $\mu\text{g}$ )	Recovery (%)	Average (%)	RSD (%)
15.24	0.0620	0.048	0.1090	97.98	97.02	1.04
14.98	0.06137	0.048	0.1081	97.49		
15.08	0.06178	0.060	0.1189	95.26		
15.36	0.06293	0.060	0.1209	96.65		
15.05	0.06166	0.072	0.1314	96.87		
15.02	0.06154	0.072	0.1320	97.85		

取对照品溶液, 平行进样 6 次测定, 结果的 RSD 为 1.56%, 表明此方法精密度良好。

### 2.3 重复性试验

取同一批样品 6 份, 按拟定方法测定, 6 次测定结果的 RSD 为 0.68%, 表明重现性良好。

取同一样品 6 份, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 其 RSD 为 1.19%。

### 2.4 专属性试验

吸取益母草碱对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定。结果表明, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 有相同的吸收峰, 而无益母草碱的空白色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 则未见明显色谱峰出现, 表明在该 HPLC 测定条件下, 益母草碱的测定无明显干扰。

### 2.5 标准曲线和回归方程

精密吸取 2.5、5、7.5、10、12.5 mL 0.25 mg/mL 对照品溶液, 置于 100 mL 容量瓶中, 用流动相稀至刻度, 各吸取 20  $\mu\text{L}$  依次注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 以峰面积积分值 ( $y$ ) 为纵坐标, 进样量 ( $x, \mu\text{g}$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线, 其曲线的回归方程为  $y = 227394x + 1292605$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 5$ )。益母草碱在 0.125~0.625  $\mu\text{g}$  范围呈良好的线性关系。

### 2.6 供试品溶液的稳定性

精密吸取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 每隔 2 h 进样测定 1 次, 共进样测定 5 次, 其峰面积积分值在 8 h 内基本不变, 其 5 次测定结果的 RSD 为 1.84%, 表明稳定性良好。

### 3 结论

从文献<sup>[11]</sup>上获得不同地区益母草中生物碱含量差异甚大,益母草碱在生药中含量很低约,一般在0.01%~0.05%之间,总体而言,产于北方者生物碱含量较高,而产于南方者普遍较低。考虑到益母草药材的质量差异,故规定本品中每袋含生物碱以益母草碱计不得少于15.0 mg。目前,益母草及其制剂的质量控制多以紫外分光光度法和薄层扫描法,这两种方法相对来说误差较大,用高效液相色谱法测定其含量,结果准确可靠。可用于益母草饮片制备、益母草制剂生产过程的质量控制。

### 参考文献:

- [1] CONG Yue(丛悦), WANG Jin-hui(王金辉), GUO Hong-ren, et al(郭洪仁等). Chinese Journal of Medicinal Chemistry(中国药物化学杂志) [J], 2003, **13**(6):349.
- [2] ZHOU Yuan-peng(周远鹏), LIU Wen-hua(刘文化), SHAO Guo-xian(邵国贤). Chin. Pharm. J. (中国药学杂志) [J], 1996, **31**(5):271.
- [3] Pang S, Tsuchiya S, Horie S, et al. Jpn. J. Pharmacol [J], 2001, **86**(2):215.
- [4] Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中国药典)(一部) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1977.
- [5] Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中国药典)(一部) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1977.
- [6] Lu R G. Acta Pharm Sin(药学报) [J], 1986, **21**(9):522.
- [7] Zhang L, Shi Y Z, Yu Z Y, et al. J. China Pharm. Univ. (中国药科大学学报) [J], 1996, **27**(1):16.
- [8] Jiang S Y. Chin. J. Pharm. Anal. (药物分析杂志) [J], 2001, **21**(4):243.
- [9] Qin Y P, Mao X R, Liang M Z, et al. West China Pharm. Sci. (华西药理学杂志) [J], 2003, **18**(4):288.
- [10] CHAO Zhi(晁志), MA Li-ling(马丽玲), ZHOU Xiu-jia(周秀佳). J. First Mil. Med. Univ. (第一军医大学学报) [J], 2004, **24**(11):1223.

## Determination of Leonurus Contents in Herba Leonuri Using High Performance Liquid Chromatography

JIANG Fan<sup>1,2</sup>, NIE Jing<sup>2</sup>, YU Jian-qing<sup>2</sup>, QIU Guo-fu<sup>1</sup>, HU Xian-ming<sup>\*1</sup>

(1. College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072;

2. Hubei Pharmaceutical Industry Research Institute, Wuhan 430061)

**Abstract:** The leonurus contents in Herba Leonuri was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), in which the mobile phase was 0.00125 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{CH}_3\text{OH}$  (87:13, V/V) with a flow rate 1 mL/min and the UV detection wavelength was at 276 nm. The regression equation of the calibration curve for lenurine was  $y = 227\,394x + 1\,292\,605$  ( $r = 0.9999$ ,  $n = 5$ ). The result showed that HPLC is a convenient and feasible method for determination of the alkaloid content in Yimucao.

**Keywords:** Herba Leonuri; Leonurus contents; HPLC