

HPLC 法测定不同产地益母草中盐酸水苏碱的含量

徐冰 杜守颖* 翟永松 高瑛(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

摘要 目的:建立改性活性炭-中性氧化铝纯化方法,用 HPLC 法测定不同产地益母草中盐酸水苏碱的含量。方法:用三乙胺处理活性炭,制备载氮改性活性炭,益母草经乙醇提取后过改性活性炭-中性氧化铝柱,系统考察活性炭改性方式、用量、中性氧化铝用量、上样及洗脱流速、乙醇洗脱体积;采用 $-NH_2$ 柱在反相条件下测定不同产地益母草中盐酸水苏碱的含量。结果:在选定的色谱条件下盐酸水苏碱可以得到较好的分离,线性范围 2.046~20.46 μg ,平均回收率为 98.31%,RSD 为 1.434 1% ($n=6$)。11 个产地的益母草药材中盐酸水苏碱含量差异较大。结论:该方法测定准确、稳定、重复性好,可用于不同产地益母草药材及饮片的质量评价。

关键词: 益母草; 盐酸水苏碱; 改性活性炭; 高效液相色谱法

中图分类号: R921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2011)-4-264-5

Determination of Stachydrine Hydrochloride in Leonurus japonicus from Different Regions in China by HPLC

Xu Bing, Du Shou-ying*, Zhai Yong-song, Gao Ying(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102)

Abstract Objective: To develop a new purification method using modified activated carbon (MAC) and neutral alumina (Neutral Al_2O_3) column chromatography to quantify the Stachydrine Hydrochloride in *Leonurus japonicus* from various regions in China by HPLC. **Methods:** Activated carbon was modified by TEA. The purification conditions, such as the ways to modify the activated carbon, the amount of MAC and Neutral Al_2O_3 , the flow rate of elution, the volume of eluent, etc. were systematically investigated. **Results:** It was shown that Stachydrine Hydrochloride in the sample was well separated under the proposed chromatographic conditions. The calibration curve was linear in the range of 2.046-20.46 μg of Stachydrine Hydrochloride ($r=0.9999$). All the validation data, such as accuracy and precision, were within the required limits. Contents of Stachydrine Hydrochloride in *Leonurus japonicus* varied greatly from each other. **Conclusion:** The method was reliable, accurate, and was successfully applied to quantify the Stachydrine Hydrochloride content in *Leonurus japonicus* collected from different areas in China.

Key words: *Leonurus japonicus*; Stachydrine Hydrochloride; Modified activated carbon; HPLC

益母草(*Leonurus japonicus* Houtt.) 始载于《神农本草经》,列为上品。味苦辛,性微寒,归肝、肾、心包经,活血调经、利水消肿,为妇科疾病治疗之要药。益母草所含化学成分种类繁多,其中盐酸水苏碱^[1]、益母草碱^[2]等生物碱类成分已被证明是益母草的主要有效成分。《中国药典》2005 年版一部采用 TLCS 法测定益母草中盐酸水苏碱含量^[3];《中国药典》2010 年版,征求意见稿一部拟采用丙基酰胺键合硅胶柱,以 HPLC-ELSD 法测定益母草中盐酸水苏碱含量^[4]。但 TLCS 法重复性差,ELSD 检测器因灵敏度和稳定性问题而普及性不高。因此,本实验

拟建立益母草中盐酸水苏碱含量测定的 HPLC-UV 法,并用于测定不同产地益母草药材中盐酸水苏碱的含量。

盐酸水苏碱仅存在紫外末端吸收,因此测定前需要对样品进行纯化处理以提高基线分离度。活性炭-中性氧化铝柱层析纯化法操作简便、纯化完全,为供试品溶液制备的首选方法。但文献报道^[5]活性炭对盐酸水苏碱有一定的吸附作用;本实验预实验亦发现,对活性炭若不加任何处理,每 g 活性炭可吸附盐酸水苏碱约 0.6 mg,且难以解吸。为解决该问题,本文首次将活性炭化学改性技术引入中药材

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008)。

作者简介: 徐冰,男,硕士。学科及研究方向: 中药药剂学。

通讯作者: 杜守颖,女,教授,博士生导师。联系电话: 010-84738615。

的含量测定,以碱性改性剂三乙胺对活性炭表面官能团进行还原改性,克服其对极性物质盐酸水苏碱的吸附,系统建立了改性活性炭-中性氧化铝纯化方法,并成功应用于不同产地益母草药材中盐酸水苏碱的含量测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司), SPD-20A VWD 检测器和 DAD 检测器, LC Solution 色谱工作站; METTLER AE 240 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); Sartorius BS110S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); YP10002 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

市售益母草,经北京中医药大学中药学院生药系刘春生教授鉴定为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥地上部分;盐酸水苏碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110712-200709);乙腈为色谱纯,三乙胺、乙醇、中性氧化铝(层析用,100~160 目)和活性炭(粒状)为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex NH_2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(80:20);检测波长 202 nm。理论板数按盐酸水苏碱峰计算应不低于 6 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的盐酸水苏碱对照品 10.23 mg,置 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液制备方法的建立

2.3.1 供试品溶液提取方法的选择 提取方法参考了《中国药典》2005 年版一部,同时配合样品纯化方法进行了适当的调整:取益母草药材粉末(过二号筛)约 1 g,精密称定,置锥形瓶中,加乙醇 50 mL,加热回流 1.5 h,放冷,滤过,滤渣及容器用乙醇 50 mL 分次洗涤,滤过,合并滤液,蒸干,残渣加乙醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,备用。

2.3.2 活性炭改性方式的考察 以 5% 三乙胺乙醇溶液 10 mL 为改性剂,固定活性炭用量为 1.00 g,氧化铝用量为 3.00 g,上样洗脱流速为 0.5 mL · min⁻¹,100 mL 乙醇洗脱,采用静态处理方式(装柱前以三乙胺乙醇溶液浸泡活性炭 24 h),动态处理方式(装柱后以 0.5 mL · min⁻¹ 流速用三乙胺乙醇

溶液对柱洗脱),未处理活性炭为对照,以盐酸水苏碱含量为指标,结果见图 1。由实验结果可知,对活性炭采用动态处理方式,盐酸水苏碱损失最少。

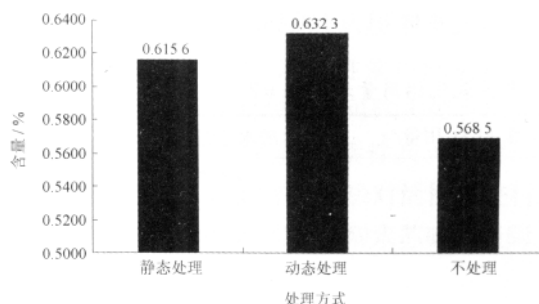


图 1 活性炭改性方式的考察($n=2$)

2.3.3 活性炭用量及洗脱流速的考察 本实验采用 2 × 3 析因设计对活性炭用量和流速进行考察。活性炭选择 0.60 g、0.80 g 和 1.00 g 三个水平,流速选择 0.5 和 1 mL · min⁻¹ 两个水平,同时固定氧化铝 3.00 g,100 mL 乙醇洗脱,实验结果如表 1 所示。经 SAS9.1.3 统计软件分析,发现活性炭经处理后,其用量($P=0.9020>0.1$)和流速($P=0.8262>0.1$)对盐酸水苏碱的含量测定的影响无统计学意义,因此活性炭用量可以为 0.60~1.00 g,上样流速和洗脱流速可为 0.5~1 mL · min⁻¹。从节约成本,提高分析速度的角度考虑,选择活性炭用量为 0.60 g,流速为 1 mL · min⁻¹。

表 1 活性炭用量和流速考察($n=2$)

流速/mL · min ⁻¹	用量/g	盐酸水苏碱含量/%
0.5	0.6	0.6255
	0.8	0.6330
	1.0	0.6323
1.0	0.6	0.6352
	0.8	0.6243
	1.0	0.6429

2.3.4 中性氧化铝用量考察 在活性炭 0.60 g,上样及洗脱流速为 1 mL · min⁻¹,100 mL 乙醇洗脱的条件下,选择 1.00 g、2.00 g 和 3.00 g 三个水平对中性氧化铝用量进行考察,实验结果如表 2 及图 2 所示。由结果可知氧化铝用量对含量测定影响不大,但随着氧化铝用量的减少,洗脱液颜色加深,色谱图中杂质峰增多,因此从能更容易地控制流速、去除杂质的角度考虑,选择中性氧化铝的用量为 2.00 g。

2.3.5 洗脱体积的考察 按上述方法操作,每 20 mL 收集 95% 乙醇洗脱液一份,共收集六份,分别蒸干测定,绘制洗脱曲线,结果见图 3。收集至第四、五、六份时的累积洗脱量的 RSD 为 0.99%,因此确定最终的洗脱体积为 100 mL。

表 2 中性氧化铝用量考察 ($n=2$)

中性 Al_2O_3 用量/g	盐酸水苏碱含量/%	RSD/%
1.0	0.616 7	2.56
2.0	0.630 6	
3.0	0.599 2	

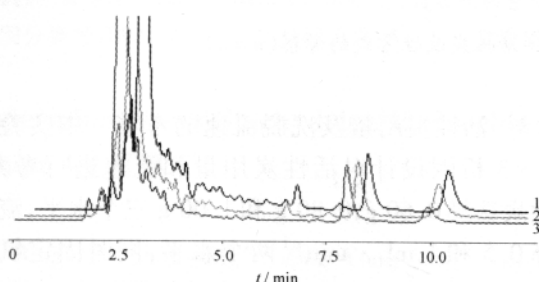


图 2 中性氧化铝用量与除杂效果考察

1. 1.00 g; 2. 2.00 g; 3. 3.00 g

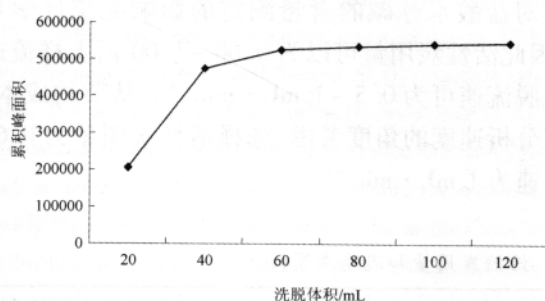


图 3 洗脱体积考察 ($n=2$)

2.3.6 供试品溶液的制备 取益母草药材粉末(过二号筛)约 1 g,精密称定,置锥形瓶中,加乙醇 50 mL,加热回流 1.5 h,放冷,滤过,滤渣及容器用乙醇 50 mL 分次洗涤,滤过,合并滤液,蒸干,残渣加乙醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,摇

匀,精密吸取 10 mL,加于活性炭-氧化铝柱(活性炭 0.60 g; 中性氧化铝 2.00 g; 内径 1 cm; 以 10 mL 5% 的三乙胺乙醇溶液预洗)上,用乙醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加流动相溶解并定溶于 5 mL 容量瓶,作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 20 μL , 分别注入液相色谱仪测定,记录峰面积。以对照品峰面积为纵坐标,以进样体积为横坐标,得回归方程为 $Y = 116\,599X - 5\,487.360\,66$, $r = 0.999\,9$,表明盐酸水苏碱在 2.046 ~ 20.46 μg 范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次。在上述色谱条件下,测得盐酸水苏碱的平均峰面积为 1 163 319.7, RSD 为 0.41% ($n=6$),结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 10 μL , 依上述色谱条件,在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,测得盐酸水苏碱平均峰面积为 544 325.1, RSD 为 0.39% ($n=7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同批(批号 20080613)益母草药材 6 份,每份约 1 g,分别照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按照上述色谱条件测定,结果样品中盐酸水苏碱的平均含量为 0.617 3%, RSD 为 1.78% ($n=6$),表明使用该方法测定重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的益母草药材 6 份,每份约 0.5 g,分别置 100 mL 量瓶中,精密加入盐酸水苏碱对照品溶液($1.068\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)各 3 mL,按供试品溶液制备方法制成供试品溶液,照上述色谱条件测定,计算回收率,结果见表 3。

表 3 加样回收率试验结果 ($n=6$)

编号	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.500 5	3.058 9	3.204	6.193 1	97.82	98.31	1.434 1
2	0.499 7	3.054 0	3.204	6.205 7	98.37		
3	0.500 4	3.058 3	3.204	6.196 8	97.96		
4	0.500 2	3.057 0	3.204	6.293 0	101.00		
5	0.500 2	3.057 0	3.204	6.193 6	97.89		
6	0.499 9	3.055 2	3.204	6.157 8	96.84		

2.9 不同产地益母草药材的含量测定

对来源于 11 个不同省市的益母草药材进行了含量测定,结果见表 4 及图 4。

表 4 不同产地益母草药材的含量测定结果($n=2$)

编号	产地	含量 / %
1	江苏	0.120 6
2	广东	0.025 8
3	江西	0.129 2
4	辽宁	0.201 0
5	浙江	0.031 3
6	山东	0.012 2
7	山西	0.205 3
8	四川眉山	0.058 0
9	四川广元	0.154 2
10	四川泸州	0.148 3
11	河北	0.608 5

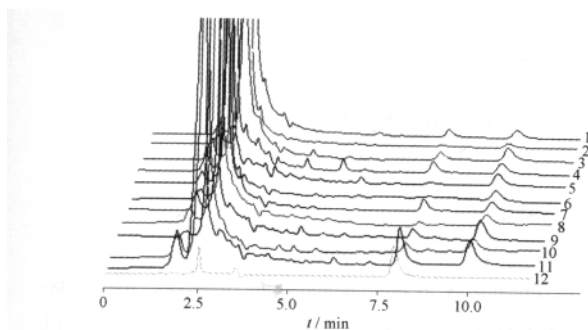


图 4 不同产地益母草药材的 HPLC 色谱图
(编号 1~11 与表 4 对应; 12 为盐酸水苏碱对照品)

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

《中国药典》2010 年版,征求意见稿一部中使用的丙基酰胺键合硅胶色谱柱为亲水色谱柱,实验中发现,使用该色谱柱在紫外检测器下无法使盐酸水苏碱达到基线分离,且出峰时间和峰形均不稳定。本实验中尝试采用 Phenomenex-NH₂ 柱和 Capcell pak UG80-NH₂ 柱,可使盐酸水苏碱与其他峰的分离度 ≥ 2.0 ,分析速度(8 min)优于 Waters-NH₂ 柱(16 min)^[6]和依利特-NH₂ 柱(11 min)^[7]。最后经综合考虑成本和分析稳定性等因素,确定采用 Phenomenex-NH₂ 色谱柱。

3.2 样品纯化方法的选择

益母草所含化学成分复杂,《中国药典》2010 年版,征求意见稿一部中以益母草 70% 乙醇提取液直接进样分析,因其中含有较多叶绿素,极易与色谱柱硅胶发生不可逆吸附而使系统背压升高,甚至导致

色谱柱的报废。益母草中盐酸水苏碱的 HPLC-UV 法测定的关键在于样品溶液纯化方法的选择。曾试以氧化铝柱层析法,但其无法除去提取液中的色素类成分;使用活性炭吸附法处理后的提取液中含较多的杂质,影响盐酸水苏碱的基线分离度。在活性炭-中性氧化铝柱层析法中,活性炭可除去提取液中色素等脂溶性成分,中性氧化铝可除去带有酚羟基的极性化合物,杂质去除完全,但活性炭可吸附部分有效成分,难以洗脱。采用本文方法对活性炭进行适当处理,则可有效避免活性炭对盐酸水苏碱的吸附。

3.3 活性炭改性剂

活性炭比表面积大,吸附容量高,常用于中药提取液脱脂脱色。相关研究证明,活性炭表面存在丰富的含氧官能团,如羧基、内酯基、酚羟基、羰基等^[8]。这些官能团很可能是活性炭吸附中药提取液中有效成分(如含氮类成分)的基础。文献报道采用硫酸、硝酸对活性炭进行改性,可以提高活性炭表面含氧官能团的含量^[9]。而采用氨水对活性炭进行改性,则可显著降低其表面羧基的含量^[10]。本文采用不同改性剂处理活性炭,最终确定与目标化合物盐酸水苏碱分子量相近的三乙胺为改性剂。

3.4 产地与盐酸水苏碱的含量

由测定结果可知,我国不同产地益母草中盐酸水苏碱的含量差异较大,北方及南方产益母草中盐酸水苏碱的含量平均值分别为 0.256 8% 和 0.095 4%,南北之间差异有统计学意义($P=0.020\ 2 < 0.05$),可能与南北土壤成分^[11]及 pH 值不同、气候差异^[12]等因素有关。因此若以 HPLC-UV 法测定益母草中盐酸水苏碱的含量,其含量限度的制订尚待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 朱虹,龙子江,陈明,等. 合成水苏碱对血瘀模型大鼠血流变性的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2007, 26(6): 38-40.
- [2] 丁伯平,熊莺,徐朝阳,等. 益母草碱对急性血瘀证大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(1): 36-37.
- [3] 中国药典. 2005 年版. 一部[S]. 2005: 203.
- [4] 中国药典. 2005 年版. 一部[S]. 2010: 272-273.
- [5] 王胜伟,朱利敏. HPLC 法测定鲜益母草中盐酸水苏碱的含量[J]. 西北药学杂志, 2006, 21(1): 15-16.
- [6] 严优芍. 益母草质量标准、提取工艺和剂型的改进研究[D]. 广州中医药大学, 2005, 19-23.
- [7] 任江剑,徐建中,王志安. HPLC 法测定鲜益母草中盐酸水苏碱含量[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(3): 216-218.
- [8] 孟冠华,李爱民,张全兴. 活性炭的表面含氧官能团及其对吸附影响的研究进展[J]. 离子交换与吸附, 2007, 23(1): 88-94.

- [9] 廖岳华,尹笃林. 改性活性炭表面羧基的催化动力学分析[J]. 分析试验室 2006 25(10):11-14.
- [10] 厉悦,李湘洲,刘敏. 改性活性炭的表面特性及其对苯酚的吸附性能[J]. 林产化工通讯 2004 38(5):14-17.
- [11] 张燕,王文全,杜世雄,等. 氮、磷、钾对益母草生长及水苏碱和总生物碱影响的研究[J]. 中草药 2007 38(12):1881-1884.
- [12] 晁志,王厄舟,周秀佳. 益母草药材中生物碱含量与产地生态环境的关系[J]. 第一军医大学学报 2000 20(6):504-506.

HPLC 法测定双黄连注射液中连翘酯苷 A 的含量

那微,张清波(黑龙江省食品药品检验检测所 哈尔滨 150001)

摘要 目的:建立双黄连注射液中连翘酯苷 A 的含量测定方法。方法:高效液相色谱法,采用 Phenomenex C₁₈(4.6 mm × 250 mm 5 μm)柱,甲醇-0.4% 冰醋酸(30:70)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 330 nm,柱温 30 ℃。结果:进样量在 0.044 ~ 0.264 μg 内呈良好线性关系 $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$),平均回收率为 103.68% ($n = 6$)。结论:本法分离效果好,专属性强,操作简便、准确,可用于双黄连注射液的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法;双黄连注射液;连翘酯苷 A;含量

中图分类号:R921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2011)-4-268-4

Determination of Forsythiaside A in Shuanghuanglian Injection by HPLC

Na Wei, Zhang Qing-bo(Heilongjiang Institute for Food and Drug Control, Harbin 150001)

Abstract objective: To establish a method for determining the content of Forsythiaside A in Shuanghuanglian Injection. **Methods:** The separation was performed in the C₁₈ column at 30 ℃. The mobile phase consisted of methanol-0.4% Acetic acid(30:70) with flow rate 1.0 mL · min⁻¹. The detective wavelength was set at 330 nm. **Results:** The calibration curves were linear in the ranges of 0.044 ~ 0.264 μg for Forsythiaside A, the average recoveries were not less than 103.68%. **Conclusion:** The method is simple and rapid with satisfactory results. It is suitable for quality control of Shuanghuanglian Injection.

Key words: HPLC; Shuanghuanglian Injection; Forsythiaside A; Assay

双黄连注射液收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第十一册^[1],功能主治为清热解毒,清宣风热。用于外感风热引起的发热、咳嗽、咽痛,适用于病毒及细菌感染の上呼吸道感染、肺炎、扁桃体炎、咽炎等,其含量测定方法为高效液相色谱法测定黄芩主要成分黄芩苷。近年来有人对双黄连注射液中木犀草苷^[2]的含量和绿原酸^[3]的含量进行测定,未见有对双黄连注射液中连翘酯苷 A 的含量进行测定的相关报道。本文采用高效液相色谱法对双黄连注射液中连翘酯苷 A 成分进行含量测定,该方法灵敏度高,重复性好,测定结果准确,样品处理简单,经过方法学验证可作为企业控制双黄连注射液质量的内控指标。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津公司 LC-2010A,

CLASS-VP V6.13 SP2 色谱工作站,紫外检测器,自动进样器);连翘酯苷 A 对照品(黑龙江中医药大学提供,纯度 > 98%);双黄连注射液(6 个生产厂家,共 23 批);甲醇(色谱纯),超纯水,冰醋酸及其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Phenomenex C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);甲醇-0.4% 冰醋酸(30:70)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 330 nm,柱温 30 ℃。理论板数按连翘酯苷 A 峰计算大于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取连翘酯苷 A 对照品适量,加甲醇制成,每 1 mL 含 22 μg 的溶液。

作者简介:那微,女,主管药师。学科及研究方向:中药学。联系电话:53638792-8217。