

HPLC 法测定益母草颗粒(无蔗糖型)中 盐酸水苏碱的含量

李政海¹, 苏作林², 廖展苇², 阮碧芳¹

1. 美国东方生物技术有限公司, 广东深圳 518034; 2. 广西灵峰药业有限公司, 广西贺州 542800

[摘要] 目的: 建立益母草颗粒(无蔗糖型)中盐酸水苏碱含量的测定方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, Ultimate Column XB-NH₂(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱, 乙腈-水(90:10)为流动相, 检测波长为 192 nm, 流速为 1.0 ml/min。结果: 盐酸水苏碱在 0.964~19.280 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 3$), 盐酸水苏碱平均加样回收率为 97.7%, RSD 为 1.23%($n=6$)。结论: 本方法可靠性高, 准确性和重复性好, 适用于益母草颗粒(无蔗糖型)中盐酸水苏碱的含量测定。

[关键词] 盐酸水苏碱; 反相高效液相色谱法; 益母草颗粒(无蔗糖型)

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-7210(2011)09(b)-070-03

Content determination of Stachydrine Hydrochloride in Herba Leonuri Granules (sugar free) by HPLC

LI Zhenghai¹, SU Zuolin², LIAO Zhanwei², RUAN Bifang¹

1. American Oriental Bioengineering Inc., Guangdong Province, Shenzhen 518034, China; 2. Guangxi Lingfeng Pharmaceutical Company Ltd., Guangxi Zhuang Autonomous Region, Hezhou 542800, China

[Abstract] Objective: To develop a method for determination of Stachydrine Hydrochloride in Herba Leonuri Granules (sugar free). **Methods:** The analytical column of reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method was Ultimate Column XB-NH₂ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile-water (90:10), the flow rate was 1 ml/min. The detector wavelength was set at 192 nm. **Results:** The calibration curve was linear over the range of 0.964-19.280 μg for Stachydrine Hydrochloride ($r=0.999\ 3$). The average recovery of Stachydrine Hydrochloride was 97.7%, RSD=1.23% ($n=6$). **Conclusion:** The method is convenient, economical, it is adapted for use in the quantitative analysis of Stachydrine Hydrochloride.

[Key words] Stachydrine Hydrochloride; Reversed-phase high performance liquid chromatography; Herba Leonuri Granules (sugar free)

益母草颗粒是由益母草单味药材经提取精制而成, 用于血瘀所致的月经不调、产后恶露不绝; 经量少、淋漓不净、产后出血时间过长; 产后子宫复旧不全见上述证候者^[1]。益母草颗粒原收载于卫生部药品标准中药成方制剂第七册 141 页, 现已收载入 2010 年版《中国药典》一部, 为蔗糖型颗粒。有报道显示, 无蔗糖型的益母草颗粒, 扩大了肥胖症、高血压、高血脂、糖尿病等忌糖患者的应用范围, 给临床用药更多的选择。其制剂中的盐酸水苏碱的含量可以采用 HPLC-ELSD 法^[2-3]来测定, 但该方法用到蒸发光散射检测器, 需控制雾化器温度, 漂移管温度以及气体(氮气)流速, 因此操作复杂。笔者在总结以往经验的基础上, 采用 HPLC-UV 法测定无蔗糖型的益母草颗粒中盐酸水苏碱的含量。结果表明, 本文所用方法快速简便, 分离度高, 并具有良好的重复性, 可用于益母草颗粒(无蔗糖型)的质量控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

沃特斯 2695-2487 高效液相色谱仪; SPD-10A-VP 紫外

[作者简介] 李政海(1967-), 男, 广东深圳人, 高级工程师, 长期从事药品研发工作。

可见检测器; AB265-S 电子天平(Mettler Toledo); SG8200HBT 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

盐酸水苏碱(购于中国药品生物制品检定所, 批号: 110712-200508); 益母草颗粒(无蔗糖型)(广西灵峰药业有限公司提供, 批号: 061001、071201、071202、071203); 乙腈、自制双蒸水、甲醇、氨水均为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

2.1 实验前处理

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Ultimate Column XB-NH₂(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 氨基键合硅胶为填充剂; 流动相为乙腈-水(90:10); 流速为 1.0 ml/min; 柱温为 25°C; 检测波长为 192 nm^[4-5]; 进样量为 10 μl。理论板数按盐酸水苏碱峰计算不低于 2 000。

2.1.2 树脂预处理方法 将新鲜树脂浸泡在蒸馏水中 1~2 d, 使它充分膨胀后装在层析柱中, 先用树脂体积 20 倍量的 2 mol/L 盐酸, 以每分钟每平方厘米 1 毫升的流速进行交换, 使其变为氢型, 然后用水洗至流出液呈中性。接着再用树脂体积 10 倍量的 1 mol/L 氢氧化钠进行交换, 使其恢复钠型,

用蒸馏水洗至流出液不含钠离子,再重复一次盐酸和氢氧化钠的处理。最后用树脂体积10倍量的1 mol/L的盐酸进行交换,使它变为氢型,蒸馏水洗至中性即可。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 取盐酸水苏碱对照品适量,精密称定,用流动相溶解并制成1 ml含盐酸水苏碱1 mg的溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取益母草颗粒(无蔗糖型)适量,研细,取约0.5 g,精密称定,加热水15 ml使溶解,用稀盐酸调pH至1~3,加于已处理好的强酸性阳离子交换树脂柱(内径1.5 cm,高10 cm)上,用水洗脱至流出液无色,弃去水液。再用甲醇-氨水(7:3)150 ml洗脱(流速为1 ml/min),收集甲醇-氨水洗脱液,蒸干。残渣加流动相溶解并转移至10 ml量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取除益母草外的糊精、阿司帕坦,混匀,并制成不含益母草的阴性制剂样品,再取制备好的阴性制剂样品,同“2.2.2”项下供试品溶液方法制备,得阴性样品溶液。

2.3 流动相的确定及专属性试验

参考文献[6-8],选用乙腈-水为流动相,经试验,选用乙腈-水(90:10)时,样品峰形对称,理论板数按水苏碱峰计算不低于2 000。分别吸取以上三种溶液(对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液)各10 μl,一次进样,色谱仪绘制色谱图,见图1。结果表明采用此方法盐酸水苏碱之外的其他组分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

取盐酸水苏碱对照品,精密称定96.4 mg,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液50 ml(浓度1.928 mg/ml),用移液管分别精密量取0.5、2.0、4.0、6.0、8.0 ml,分别置于10 ml容量瓶中,加流动相乙腈-水(90:10)至10 ml,摇匀,精密吸取上述5种溶液各10 μl,注入液相色谱仪,测定。以色谱主峰面积A对盐酸水苏碱进样量浓度C(μg)进行回归分析,得回归方程 $A = 152\ 158C + 33\ 647$, $r = 0.999\ 3$ 。表明益母草颗粒中的盐酸水苏碱进样量在0.964~15.424 μg范围内,线性关系良好。

2.5 精密度试验

用移液管量取1.156 8 mg/ml盐酸水苏碱对照品溶液,重复进样6次。结果盐酸水苏碱峰面积平均值为1 712 576, RSD为1.48%,表明仪器的精密度符合要求。

2.6 稳定性试验

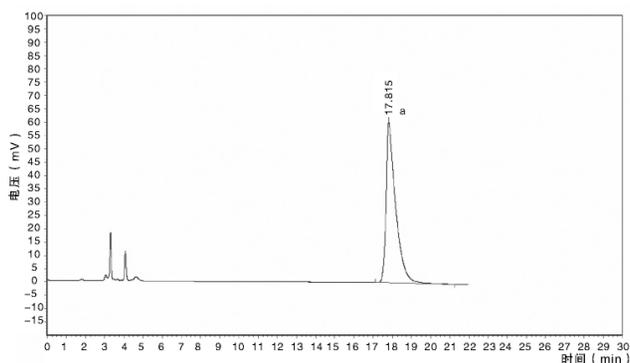
取供试品溶液,分别在棕色容量瓶室温放置0.2、4、6、8 h时,按上述方法分别测定峰面积,结果盐酸水苏碱峰面积平均值为1 118 851, RSD为0.73%,表明供试品溶液在8 h内稳定性好。

2.7 重复性试验

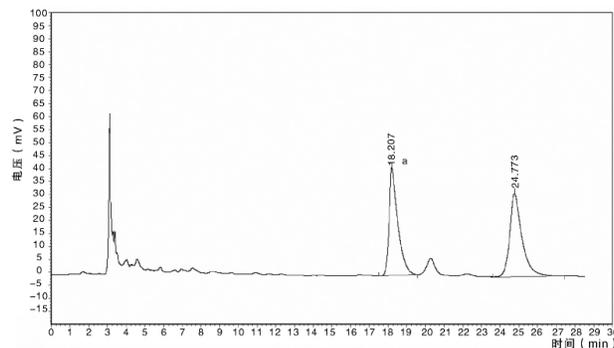
取批号061001样品,同上述供试品溶液的制备方法制备6份溶液,同法进样、测定,计算含量,统计RSD,结果盐酸水苏碱平均含量为13.46 mg/g, RSD为1.69%,提示此测定方法的重复性较好。

2.8 加样回收率试验

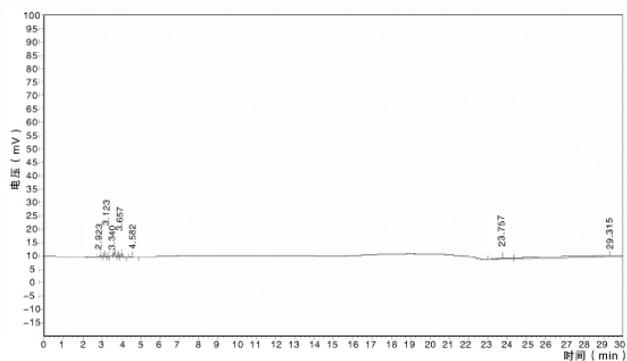
取批号061001样品0.25 g,精密称定,精密加入盐酸水



A



B



C

A: 盐酸水苏碱对照品; B: 益母草颗粒(无蔗糖型)样品; C: 益母草阴性样品;
a: 盐酸水苏碱峰

图1 HPLC 色谱图

苏碱对照品的水溶液3.0 ml,精密加入热水15 ml,按供试品制备方法制备供试品溶液6份,依法测定,计算回收率。结果显示盐酸水苏碱平均回收率为97.7% (RSD=1.23%, n=6),表明此方法回收率较好。见表1。

表1 益母草颗粒(无蔗糖型)中盐酸水苏碱回收率的测定结果(n=6)

取样量(g)	样品含量(mg)	对照品加入(mg)	实测量(mg)	回收率(%)
0.268 4	3.613 0	3.342 0	3.306 0	98.92
0.241 3	3.248 0	3.342 0	3.236 0	96.83
0.265 0	3.567 0	3.342 0	3.258 0	97.49
0.257 3	3.463 0	3.342 0	3.256 0	97.43
0.257 6	3.467 0	3.342 0	3.218 0	96.29
0.263 7	3.549 0	3.342 0	3.322 0	99.40

2.9 样品测定

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按本文色谱条件,测定3批样品中盐酸水苏碱,同法计算含量。见表2。

表2 益母草颗粒(无蔗糖型)中盐酸水苏碱的测定结果(n=3)

批号	盐酸水苏碱	
	含量(mg/g)	RSD(%)
071201	3.79	1.52
071202	3.77	0.76
071203	3.49	1.20

3 讨论

提取方法曾参照2005年版《中国药典》一部第204页益母草药材含量测定方法,选用乙醇为溶剂进行加热回流提取1.5 h。具体方法如下:取本品,研细,取约0.5 g,精密称定。置于具塞锥形瓶中,加入乙醇50 ml,加热回流1.5 h,冷却,滤过,残渣用乙醇50 ml分次洗涤,滤过,合并滤液,蒸干。残渣用90%乙腈适量溶解,置10 ml量瓶中,定容至刻度,摇匀,过微孔滤膜(0.45 μm),即得。依法检测其盐酸水苏碱含量。结果显示该方法提取不完全,故未采用。

研究中曾拟修订本品总生物碱的含量测定方法^[1],但试验结果发现难以解决活性炭对生物碱的吸附问题,故未将总生物碱测定列入本品的质量控制指标。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会.中国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2010:289-290.
- [2] 冯旭,杜成智,梁臣艳.HPLC-ELSD测定益母草颗粒中盐酸水苏碱的含量[J].中成药,2008,30(5):37-38.
- [3] 聂金媛,何燕.HPLC-ELSD法测定产妇产安胶囊中盐酸水苏碱的含量[J].海峡药学,2010,22(3):56-57.
- [4] 唐德智.益母草及其制剂中盐酸水苏碱含量测定研究[J].中国民族民间医药,2010,19(17):56-58.
- [5] 闫冰.HPLC测定益母草流浸膏中盐酸水苏碱的含量[C].中华中医药学会中药炮制分会2009年学术研讨会论文集,2009:330-332.
- [6] 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.
- [7] 张韵,黄瑞红,何桂区.HPLC法测定安坤益母草片中盐酸水苏碱的含量[J].广东药学院学报,2008,84(1):16-17.
- [8] 严优芴,李卫民.HPLC法测定益母草分散片中盐酸水苏碱的含量[J].广东药学院学报,2006,22(6):604-606.

(收稿日期:2011-03-21)

(上接第69页)

表2 氯霉素二醇物加样回收率试验结果

加入量(μg)	测定量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
3.12	3.146	100.83		
3.12	3.148	100.90		
3.12	3.151	101.00		
3.90	3.898	99.95		
3.90	3.905	100.13	100.36	0.42
3.90	3.901	100.03		
4.68	4.680	100.00		
4.68	4.692	100.26		
4.68	4.688	100.17		

量。见表3。

表3 氯霉素含量测定与氯霉素二醇物检查结果(%)

批号	氯霉素含量	RSD	氯霉素二醇物	氯霉素二醇物药典规定值
101024	101.20	0.28	<7.8	8.0
110212	101.41	0.19	<7.8	8.0
110308	102.87	0.21	<7.8	8.0

2.10 氯霉素二醇物检查

按上述色谱条件进样10 μl氯霉素二醇物对照液,调节检测灵敏度,使氯霉素二醇物峰的峰高约为满量程的64%;

取3批次氯霉素滴眼液(批号:101024、110212、110308)的样品供试液与氯霉素二醇物对照液,按上述色谱条件依次进样,记录色谱图,供试品溶液中氯霉素二醇物的峰面积应不得大对照品溶液的主峰面积(规定<8.0%)。见表3。

3 讨论

光谱图提示:氯霉素滴眼液中氯霉素在278、272 nm处均有强吸收,氯霉素二醇物在272 nm有最大吸收,本院处方中未添加羟苯乙酯,不存在干扰吸收,故选用272 nm作为检测波长。笔者曾比较在本实验室条件下以下几种流动相的分离效果:乙腈-水-冰醋酸(40.0:60.0:0.5)、0.01 mol/L庚烷磺酸钠缓冲溶液-甲醇梯度洗脱^[4]、甲醇-水-10%四丁基氢氧化铵溶液(350:635:15)、水-甲醇-冰醋酸(55.0:45.0:0.1),结果以乙腈-水-冰醋酸(40.0:60.0:0.5)为流动相时,氯霉素与氯霉素二醇物有较好的分离度、精密度、重现性和线性回归,故采用乙腈-水-冰醋酸(40.0:60.0:0.5)为流动相。

[参考文献]

- [1] 谢楠,何晓英,张晓明,等.HPLC测定氯霉素滴眼液中氯霉素及氯霉素二醇物的含量[J].华西药理学杂志,2006,21(1):93-95.
- [2] 张雁,孙映求,王兰.RP-HPLC法测定氯霉素滴眼液中氯霉素及氯霉素二醇物的含量[J].中国药品标准,2005,6(2):11-13.
- [3] 易文琳.反相高效液相色谱法测定氯霉素滴眼液中氯霉素及有关物质的含量[J].中国药业,2007,16(17):25-26.
- [4] 国家药典委员会.中国药典[M].二部.北京:中国医药科技出版社,2010:1031-1032.

(收稿日期:2011-05-09)