

HPLC 法测定龙苓春合剂中麦角甾苷的含量

张 超¹, 鲁鑫焱¹, 梁 宁¹, 赵怀清¹, 戴亚兰²

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 170016; 2. 辽宁省药品检验所, 辽宁 沈阳 110023)

龙苓春合剂是在原部颁品种龙苓春药酒基础上改进工艺制成。方中有人参、鹿茸、肉苁蓉、五味子、生龙骨、猪苓等 15 味中药, 阴阳两补, 用于气血双亏。原质量标准中仅以薄层鉴别法检测了人参中人参皂苷 Rb₁, Re 和 Rg₁, 没有含量测定方法。对肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 的研究^[1], 国外以日本居多, 而国内多集中在单味药材的成分及药理活性部分; 麦角甾苷(acteoside) 为肉苁蓉中重要活性成分, 且已被《中华人民共和国药典》收载, 但对于其在复方制剂中的检查, 文献报道较少, 并以薄层法^[2]和比色法^[3]居多, 样品处理复杂, 耗时较长, 干扰大。本实验根据龙苓春合剂的处方组成及工艺特点, 对样品进行适当处理后, 选择了该方主药肉苁蓉中的麦角甾苷作为质量控制指标, 建立了麦角甾苷的 HPLC 测定方法, 以期更加有效地控制龙苓春合剂质量。

1 仪器与试药

Hitachi 高效液相色谱仪(包括 L-7110 泵, L-7400 紫外检测器)(日立公司), 大连江申色谱工作站。麦角甾苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 1530-200101); 龙苓春合剂由沈阳东药克达制药有限公司提供(规格: 100 mL/ 瓶); 甲醇、乙腈为色谱纯(山东禹王公司), 水为重蒸水(自制); 冰醋酸、无水甲醇为分析纯(沈阳化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱: DiamonsilTM C-18 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-1% 醋酸水溶液(10: 15: 77); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 334 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。理论塔板数按麦角甾苷色谱峰计算不小于 4 000, 分离度大于 2, 拖尾因子 1.01。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取麦角甾苷对照品约 8 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。

2.3 供试品溶液的制备: 取龙苓春合剂 100 mL, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 减压浓缩近干; 加无水甲醇 40 mL, 超声至溶液呈乳浊状, 静置沉降后滤过, 收集上清液; 同法处理 3 次, 合并滤液, 回收甲醇至干。分次加入少量蒸馏水, 超声洗脱后转移至 25 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀; 以滤纸滤过后, 取续滤液, 过 0.45 μm 滤膜, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。

2.4 线性范围考察: 取对照品储备液按不同比例稀释, 得 9.85, 19.70, 29.55, 39.40, 59.10, 78.80 μg/mL 的溶液, 注入液相色谱仪, 记录麦角甾苷色谱峰面积。以麦角甾苷色谱峰面积(Y) 对浓度(X) 作图, 其回归方程为 $Y = 8.672 \times 10^7 X - 8.592 \times 10^4$, $r = 0.9997$ 。麦角甾苷在 0.197~1.576 μg 线性关系良好。

2.5 阴性空白试验: 取该处方的肉苁蓉阴性样品, 照 2.3 项下方法进行操作, 按上述色谱条件测定。结果在麦角甾苷出峰位置未见其他峰干扰, 说明阴性空白无干扰(图 1)。

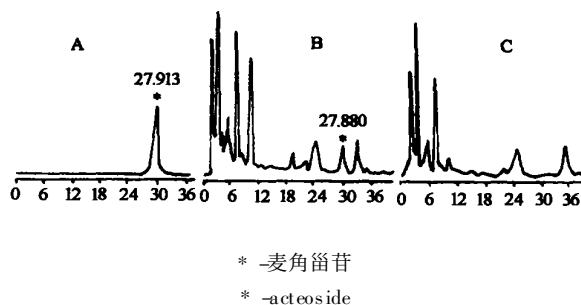


图 1 麦角甾苷对照品(A)、龙苓春合剂供试品(B)和缺肉苁蓉阴性对照(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of acteoside (A), Longlingchun Mixture sample (B) and sample without *Herba Cistanches* (C)

2.6 精密度试验: 取 39.40 μg/mL 对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录麦角甾苷色谱峰面积, 计算 RSD 为 0.83% (n=6)。

收稿日期: 2002-12-25

作者简介: 张 超(1979—), 男, 山东淄博人, 在读硕士研究生, 2001 年毕业于山东大学药学院药学专业, 现研究方向为中药材和中成药质量评价方法以及中药药理学。

* 通讯作者 Tel: (024) 23843711-3679 E-mail: zhqzcy@online.ln.cn

2.7 重现性试验: 同一批样品 5 份(批号为 20020403), 按 2.3 项下平行制备, 外标两点法测定麦角甾苷的含量, 平均含量为 0.725 4 mg/100 mL, RSD 为 1.86% ($n=5$)。

2.8 稳定性试验: 取供试品溶液(批号为 20020403)分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 注入液相色谱仪, 依法测定麦角甾苷的峰面积。计算 RSD 为 1.47% ($n=5$)。结果表明样品溶液在 8 h 内比较稳定。

2.9 加样回收率: 取已知含量的供试品溶液, 精密加入对照品适量, 依法测定, 平均回收率为 99.5%, RSD 为 2.54% ($n=9$), 结果见表 1。

表 1 麦角甾苷加样回收率试验

Table 1 Results of recovery test

加入量 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出量 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率 $/\%$	平均回 收率/ $\%$	RSD/ $\%$
19.7	18.82	95.32	97.2	1.53
	19.26	97.78		
	19.37	98.35		
39.4	39.61	100.50	99.2	1.58
	38.41	97.48		
	39.27	99.67		
59.1	61.03	103.30	102.0	1.84
	59.01	99.85		
	60.82	102.90		

2.10 样品测定: 取龙苓春合剂 3 批, 照 2.3 项下方法处理, 注入液相色谱仪, 外标两点法测定麦角甾苷含量。结果见表 2。

表 2 龙苓春合剂中麦角甾苷含量测定($n=3$)

Table 2 Acteoside in Longlingchun Mixtura ($n=3$)

批号	麦角甾苷/ $(\text{mg}\cdot100\text{mL}^{-1})$	RSD/ $\%$
20020501	0.840 6	0.49
20020502	0.750 5	1.11
20020503	0.685 0	0.38

3 讨论

3.1 由于龙苓春合剂中蔗糖含糖量高达 10 g/100 mL, 加之猪苓等药材中多糖含量极高, 样品处理较困难, 实验曾分别采用大孔吸附树脂及正丁醇萃取等方法除糖, 但糖的残留量高, 且麦角甾苷提取率低。根据醇沉法除糖的原理, 实验结合麦角甾苷溶解性, 将龙苓春合剂中的水分除尽得固形物, 然后用无水甲醇从固形物中提取得供试液。结果表明, 此法可以有效的将糖分分离除去。不仅麦角甾苷提取率高,

而且操作简便。

3.2 麦角甾苷极性较大, 易溶于水、甲醇等极性大的溶剂^[4,5], 龙苓春合剂宜尽量除去水分; 用甲醇提取麦角甾苷和沉糖时, 宜选用无水甲醇, 以保证麦角甾苷提取完全, 糖分充分沉淀。

3.3 麦角甾苷对照品在流动相弱酸性条件下稳定^[4]; 但龙苓春合剂经处理后, 难溶于流动相; 参照相关文献^[3], 分别以流动相、水、无水甲醇、无水乙醇、丙酮及水-甲醇不同配比进行了考察。结果以水作溶剂时, 麦角甾苷峰形对称, 分离度好, 响应值高。因此选用水作样品溶剂。

3.4 波长选择: 经二极管检测器扫描, 在流动相乙腈-甲醇-1%醋酸水溶液(10:15:77)中, 麦角甾苷对照在 195~650 nm 波长内, 最大吸收波长为 334 nm, 故选择 334 nm 作为检测波长。

3.5 液相色谱条件的选择: 根据文献报道^[6,7], 实验采用 C₁₈ 色谱柱, 对甲醇-水、甲醇-1%醋酸、乙腈-水和乙腈-甲醇-1%醋酸按不同比例作流动相进行考察。结果发现以乙腈-甲醇-1%醋酸水溶液(10:15:77)为流动相时峰形对称, 分离度高, 被测组份保留时间适中。

References:

[1] Zhang B. Current studied situation on pharmacological action and chemical component of *Cistanche deserticola* [J]. *J Xinxiang Med Coll* (新乡医学院学报), 1997, 14(4): 413-415.

[2] Deng Q H, Lu Y R, Shao A X. Identification of Congsheng Capsule by thin layer chromatography [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2001, 24(2): 42-43.

[3] Du N S, Ye Y M, Hu J P. Determination of phenylethanoid glycosides in *Cistanche deserticola* by aluminii nitras-colorimetric method [J]. *Acta Acad Med Xinjiang* (新疆医学院学报), 1993, 16(4): 308-310.

[4] Zhang S J, Chen M H, Liu L. Acteoside content in crude and differently processed *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1996, 31(6): 335-337.

[5] Zheng R, Zhang L G, Ni L J. A new sepatation method of phenylpropanoid glycosides for *Cistanche deserticola* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2001, 13(4): 55-57.

[6] Tu P F, Wang B, Deyama T, et al. Analysis of phehylenethanoid glycosides of *Herba Cistanchis* by RP-HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1997, 32(4): 294-300.

[7] Lei L, Song Z H, Tu P F, et al. Separation of echinacoside by reversed-phase preparative high performace liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2001, 19(3): 200-202.