

HPLC 法测定益母草不同制剂中水苏碱

严优尧¹, 李卫民^{1*}, 高英¹, 李其凤², 伍淑华^{2*}

(1. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学科技产业园, 广东 广州 510445)

益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥全草, 是中医妇科常用药。益母草中主要有效成分为水苏碱、益母草碱等生物碱类成分^[1]。含益母草制剂大多以水苏碱作为定量指标, 其测定方法有雷氏盐剩余比色法(《中国药典》2005 年版一部益母草项下)、雷氏盐沉淀溶解比色法(《中国药典》1977 年版一部)、紫外分光光度法^[2]、薄层扫描法^[3]、HPLC 法^[4,5]等。本实验采用 HPLC 法对含益母草制剂中的盐酸水苏碱进行测定, 结果表明, 该方法较其他方法精确可靠, 从而为益母草及其制剂的质量控制提供了参考方法。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱系统: Waters 2695 泵, Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱处理系统。Aglient 8453—E 紫外分光光度计。

盐酸水苏碱对照品(批号 110712—200306, 中国药品生物制品检定所), 益母草药材购于广州中医药大学大药房, 各种益母草制剂均为市售, 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Waters-NH₂ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(80:20), 检测波长为 202 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 25℃。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取 105 干燥至恒重的盐酸水苏碱对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解, 并加至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取一定量样品(益母草药材 6 g、益母草流浸膏 10 mL、益母草膏 10 g、益母草颗粒 15 g、益母草片 0.6 g、益母草胶囊 1 g、复方益母草膏 4 g、调经益母片 6 g、慈航片 36 g、抗宫炎片 12 g), 除益母草流浸膏、益母草膏和复方益母草膏外, 益母草药材粉末(过 3 号筛)、益母草颗粒(研细)、益母草胶囊内容物和益母草各种片剂(去包衣

后研细), 均置具塞锥形瓶中, 精密加入 10 倍量乙醇, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取半量续滤液, 回收溶剂, 残渣加水溶解。益母草流浸膏中缓慢加入无水乙醇摇匀, 益母草膏和复方益母草膏加等量硅藻土研匀, 其余操作按益母草药材等样品处理方法操作。以上样品均用浓盐酸调至 pH 值为 2, 加入新配制的 2% 雷氏盐溶液适量, 冰水浴中放置 1 h, 滤过, 沉淀用少量冰水洗后, 加丙酮溶解, 往丙酮液中滴加 0.5% 硫酸银溶液至不再有沉淀生成, 滤过, 沉淀用水洗, 合并滤液和洗液适当浓缩, 向浓缩液中滴加与硫酸银等物质的量的 1% 氯化钡溶液, 滤过, 沉淀用水洗, 合并洗液与滤液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 备用。

2.3 标准曲线的制备: 将对照品溶液用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL 的溶液, 精密吸取各稀释液和原对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按上述条件测定峰面积。以水苏碱峰面积(Y)对进样量(X)作线性回归处理, 其回归方程为: $Y = 6.20 \times 10^4 X - 1.56 \times 10^4$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 水苏碱在 0.5~10 μg 与其峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验: 精密吸取质量浓度为 0.4 mg/mL 对照品稀释溶液 10 μL, 连续重复进样 6 次, 测定盐酸水苏碱峰面积值, 结果峰面积的 RSD 为 0.99%。

2.5 稳定性试验: 将上述各供试品溶液在配制后 0、2、4、6、8 h 进样, 测定峰面积, 结果盐酸水苏碱峰面积的 RSD 均 < 2%, 表明各供试品溶液中盐酸水苏碱在测定的 8 h 内可保持稳定。

2.6 重现性试验: 取不同益母草制剂, 制备供试品溶液, 每一样品平行测定 6 份, 各样品中盐酸水苏碱的质量分数 RSD 均在 2% 以下。

2.7 回收率试验: 采用加样回收法。取已知质量分数的益母草药材 3 g, 益母草流浸膏 5 mL, 益母草膏

* 收稿日期: 2005-03-16

作者简介: 严优尧(1979—), 女, 浙江舟山人, 硕士, 2005 年毕业于广州中医药大学, 主要从事中药新药的研究工作。

* 通讯作者 李卫民 Tel: (020) 87470715 E-mail: liwimi@pub.guangzhou.gd.cn

(湖南) 5 g, 各精密取 6 份, 分别加入精密称定的盐酸水苏碱对照品 4 mg, 制备供试品溶液, 测得益母草药材的平均回收率为 96.61%, RSD 为 2.65%; 益母草流浸膏的平均回收率为 96.47%, RSD 为 1.27%; 益母草膏的平均回收率为 95.70%, RSD 为 1.63%。

2.8 样品测定: 分别精密吸取各供试品溶液 10 μ L, 按上述条件测定, 结果见表 1, 益母草制剂的 HPLC 色谱图见图 1。同时另取各种益母草制剂, 采用雷氏盐比色法进行测定, 测定结果见表 1。

表 1 益母草不同制剂中水苏碱的测定结果 (n= 6)

Table 1 Quantitative determination of stachydrine in different preparations of *Herba Leonuri*

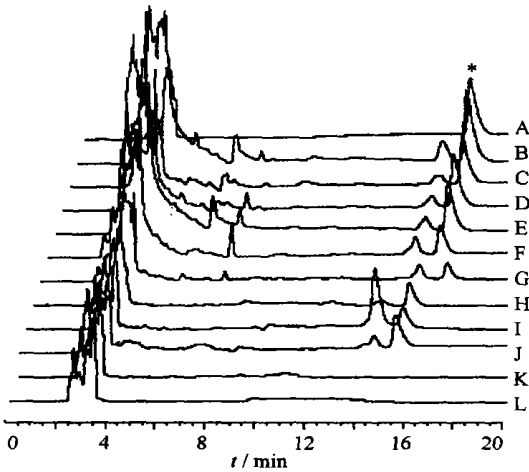
样 品	产地或生产厂家	批 号	质量分数/ %	
			HPLC 法	比色法
益母草药材	广东	031225	0.12	0.15
益母草流浸膏	广东 × × 公司	030804	0.09	0.11
益母草膏	湖南 × × 公司	031106	0.08	0.11
	湖北 × × 公司	031202	0.04	0.06
	广州 × × 公司	040107	0.08	0.12
	山东 × × 公司	040101	0.13	0.21
益母草颗粒	浙江 × × 公司	0309001	0.08	0.09
	四川 × × 公司	030601	0.10	0.11
	广东 × × 公司	040402	0.11	0.13
	广西 × × 公司	040503	0.04	0.05
益母草片	四川 × × 公司	040101	1.37	1.82
	广东 × × 公司	030604	1.44	1.83
益母草胶囊	沈阳 × × 公司	20031277	1.11	1.03
复方益母草膏	北京 × × 制药厂	030228	0.22	0.29
调经益母片	广州 × × 公司	F00015	0.07	0.15
慈航片	江西 × × 制药厂	20040307	未检出	未检出
抗宫炎片	江西 × × 公司	20040641	0.02	0.21
	湖南 × × 公司	20040412	0.02	0.21

2.9 本法与药典、部颁标准方法测定结果比较: 取益母草药材、益母草流浸膏和益母草片分别按《中国药典》2005 年版一部益母草项下方法和《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第 13 册中方法及本实验所用的 HPLC 法进行测定, 并对结果进行比较, 结果见表 2。

表 2 本法和药典、部颁标准方法测定结果比较 (n= 3)

Table 2 Comparison of analysis results with methods of HPLC in Pharmacopoeia and promulgated by Ministry (n= 3)

样 品	批 号	水苏碱 (HPLC 法)	总生物碱(药典方法)	
			实测值	规定量
益母草药材	031225	0.12%	0.15%	> 0.4%
益母草流浸膏	030804	0.09%	0.11%	> 0.2%
益母草片	广东 040301	8.86 mg · 片 ⁻¹	16.73 mg · 片 ⁻¹	13.5 ~ 16.5 mg · 片 ⁻¹
益母草片	四川 040101	8.22 mg · 片 ⁻¹	16.44 mg · 片 ⁻¹	13.5 ~ 16.5 mg · 片 ⁻¹



A-对照品溶液 B-益母草胶囊 C-益母草片 D-益母草颗粒
E-复方益母草膏 F-益母草流浸膏 G-益母草膏 H-调经益母片 I-抗宫炎片 J-益母草药材 K-慈航片 L-妇康宁片
* -盐酸水苏碱
A-stachydrine hydrochloride B-Yimucao Capsules
C-Yimucao Tablets D-Yimucao Granule E-Compound Yimucao electuary F-Yimucao fluid extract G-Yimucao electuary H-Tiaoqing Yimu Tablets I-Kanggongyan Tablets J-Herba Leonuri K-Cihang Tablets
L-Fukangning Tablets * -stachydrine hydrochloride

图 1 益母草不同制剂的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of different preparations of *Herba Leonuri*

3 讨论

根据水苏碱的结构, 曾经采用 ODS 柱, 分别以甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾、乙腈-0.5% SDS (pH 2 ~ 3 磷酸缓冲液) 为流动相对水苏碱进行分析, 结果前者在任何比例下对水苏碱均无保留; 而后者在比例为 10 : 90 时, 虽能增加水苏碱的保留, 但由于流动相组成复杂, 方法的重现性较差。为此, 最后参考文献报道^[5]改用氨基柱, 以乙腈-水(80 : 20) 为流动相, 在此条件下, 水苏碱不仅能得到较好的保留, 且能和其他色谱峰分离。

在筛选供试品制备方法时发现, 益母草大多数样品只需简单的醇提水沉或活性炭除杂后就能进行水苏碱的分析测定, 但对于含糖较多的制剂如益母草膏等, 则需进一步纯化。这些制剂用雷氏盐-硫酸银-氯化钡法净化后, 能除去样品中的大部分杂质, 分析效果好。为统一样品的处理方法, 同时保护色谱柱, 最后采用雷氏盐-硫酸银-氯化钡法对样品进行处理。

益母草各种制剂的 HPLC 法测定结果与比色法相比偏低, 可能是由于比色法的测定结果包含了除水苏碱外其他成分。从益母草各制剂的 HPLC 分析色谱图看, 水苏碱色谱峰的附近还有其他色谱峰。

由样品的制备方法分析,该物质应该也是季铵碱。查看该色谱峰的紫外吸收图谱发现其吸收光谱与水苏碱很相似,具体为何物质有待进一步研究。在对抗宫炎片进行测定时发现,水苏碱前面色谱峰的峰面积远大于水苏碱的峰面积,而测定结果也显示,比色法所得结果约为 HPLC 法所得结果的 10 倍。该结果验证了上述推断。

《卫生部药品标准》中药成方制剂第 13 册采用沉淀重量法对益母草片中的水苏碱进行控制,应用该方法进行测定时样品定量符合要求,但比色法或 HPLC 法测定结果较该方法低。将沉淀重量法中所得沉淀溶于丙酮发现很多不溶物,可见,沉淀不全是生物碱的雷氏盐沉淀,其准确性值得进一步探讨。

板蓝根颗粒的 HPLC 指纹图谱研究

柏 健¹, 王跃生¹, 张继华¹, 段 启², 王少军¹, 杨世林^{1*}

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,性寒、味苦,具有清热解毒、凉血利咽的功效。板蓝根颗粒在《中国药典》2005 版上以靛玉红为鉴定标准。但事实上现有的水煮醇沉的制剂工艺对脂溶性成分靛玉红的提取率极低。药理实验证明,靛蓝、靛玉红并非其清热解毒的药效成分,故选靛玉红作为板蓝根及其制剂的质控指标已不适合。为了从整体上控制板蓝根颗粒的质量,同时进一步来控制原料质量及生产工艺的稳定性,本实验采用高效液相色谱法建立了板蓝根颗粒的 HPLC 指纹图谱分析方法,为进一步全面控制板蓝根颗粒的质量提供了依据。

1 实验材料

岛津 LC—VP 系列高效液相色谱仪(日本岛津),SPD—M10Avp (PDA) 检测器 LC—10ATvp 串联双柱塞泵, SIL—10Advp 自动进样器,Class—VP 工作站; BS2000S 电子天平(赛多利斯); KQ—250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱级), Millipore 超纯水, 磷酸(分析纯)。板蓝根颗粒由江西汇仁制药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Hypersil C₁₈柱(250 mm ×

References:

- [1] Ruan Y L, Du J R, Zeng Q Z, *et al.* Advance in studies on chemical components, pharmacological effect and clinical application of *Leonurus japonics* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (11): S15-19.
- [2] Lu R G. Determination of alkaloids in Yimucao granule by UV spectrophotometry [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1986, 21 (9): 522-524.
- [3] Zhang L, Shi Y Z, Yu Z Y, *et al.* Determination of stachydrine hydrochloride in Yimucao oral solution by TCLS [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27 (1): 16.
- [4] Jiang S Y. HPLC Analysis of stachydrine in *Leonurus japonicus* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21 (4): 243-247.
- [5] Qin Y P, Mao X R, Liang M Z, *et al.* Determination of stachydrine in Chanfu An oral solution by RP-HPLC [J]. *West China Pharm Sci* (华西药学杂志), 2003, 18 (4): 288-290.

4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇(A)—0.4% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0~30 min, 100% B, 30~50 min, A—B (30 70), 50~70 min, A—B (35 65), 70~80 min, A—B (60 40), 80 min 以后, A—B (80 20); 体积流量: 0.7 mL/min; 检测波长: 219 nm; 柱温: 25 ; 进样体积: 5 μ L。

2.2 供试品溶液的制备: 取本品研碎, 过六号筛, 称取粉末约 5.0 g, 精密称定, 精密量取 80 mL 氯仿, 水浴中索氏提取 3 h, 取氯仿提取液, 70 挥干, 残渣加甲醇溶解于 2 mL 量瓶中, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验: 取同一份板蓝根颗粒供试品溶液, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.2%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD < 1.5%, 表明仪器系统精密度良好。

2.3.2 重现性试验: 取同一批板蓝根颗粒(批号 0305120), 按供试品的制备方法制备 6 份, 按上述色谱条件依次检测, 结果显示, 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%, 主要共有峰面积的 RSD < 3%。

2.3.3 稳定性试验: 取同一份板蓝根颗粒供试品溶液, 按上述色谱条件, 分别在 0、1、2、4、8、16、24 h 检测, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 0.5%, 主要