

HPLC 法测定耳聋左慈丸中马钱苷和丹皮酚的含量

陈英红, 姜瑞芝, 高 阳 (吉林省中医中药研究院, 长春市 130021)

摘要: 建立耳聋左慈丸中马钱苷和丹皮酚含量的高效液相色谱测定方法。色谱柱: Diamonsil C₁₈, 流动相分别为乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(10:5:85)和甲醇-水(70:30)。马钱苷的线性范围为0.128~1.28 μg, $r=0.9999$, 回收率为98.98%, RSD为0.70% ($n=6$); 丹皮酚的线性范围为0.04~0.4 μg, $r=0.9999$, 回收率为98.91%, RSD为0.73% ($n=6$)。本法操作简便, 结果准确。

关键词: 耳聋左慈丸; 马钱苷; 丹皮酚; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2007) 09-0733-03

Determination of Loganin and Paeonol of Erlong Zuoci Pills by HPLC

Chen Yinghong, Jiang Ruizhi and Gao Yang (Academy of Traditional Chinese Medicine and Material Medical of Jilin Province, Changchun 130021)

ABSTRACT A HPLC method for the determination of Loganin and Paeonol of Erlong zuoci Pills was established. A Diamonsil C₁₈ was used. The mobile phase: acetonitrile-methanol-0.1% phosphoric acid (10:5:85) and acetonitrile-water (70:30). The linear range was 0.128~1.28 μg for loganin with $r=0.9999$ and 0.04~0.4 μg for paeonol with $r=0.9999$. The average recovery rate was 98.98% (RSD=0.70%, $n=6$) for loganin and 98.91% (RSD=0.73%, $n=6$) for paeonol. The method is simple and accurate.

KEY WORDS Erlong Zuoci Pills; loganin; paeonol; HPLC

表2 溶剂种类的考察

甲醇中冰醋酸的浓度(%)	超声前 pH 值	超声后 pH 值
0.5	4.54	6.65
1.0	4.10	6.28
1.5	3.9	6.15
2.0	3.7	5.50
2.5	3.5	4.50

试验结果表明, 采用0.5%冰醋酸甲醇20 mL即可中和碳酸氢钠, 考虑到供试品称样量的差异, 故选择1%冰醋酸甲醇20 mL作为提取溶剂。

3.2 提取时间的选择

取本品(批号: 050902)内容物约1 g, 精密称定, 共3份, 各加1%的冰醋酸甲醇溶液20 mL, 分别超声处理30分钟、45分钟、60分钟, 冷却至室温, 再称定重量, 用1%的冰醋酸甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 取上清液, 滤过。分别吸取上述二种供试品溶液各10 μL, 注入液相色谱

仪, 按正文色谱条件, 依法测定, 结果见表3。

表3 提取时间考察结果

超声时间(分钟)	30	45	60
提取率($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	2.323	2.444	2.445

试验结果表明, 超声处理45分钟时, 龙胆苦苷即可提取完全, 故确定提取时间为45分钟。

采用本法测定肝胃气痛胶囊中龙胆苦苷的含量, 快速、简便、准确, 能有效地控制产品的质量。

参考文献:

- [1] 国家中成药标准汇编内科脾胃分册 [S]. WS-10693(ZD-0693)-2002
- [2] 中国药典 [S]. 一部, 2005: 64
- [3] 王 臣, 邢秀芳, 马立祥, 等. 栽培条叶龙胆各形态类型龙胆苦苷含量的测定 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 841

《中国药典》2005 年版中耳聋左慈丸^[1]的含量采用双波长扫描测定山茱萸中熊果酸含量, 鉴于该方法专属性不强, 本文运用高效液相色谱法测定处方中山茱萸中马钱苷含量, 及牡丹皮中丹皮酚的含量, 经方法学考察, 认为本法准确、简便, 可进一步控制本品质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2010 高效液相色谱仪; SPD-M10AVP 二级管阵列检测器; CLASS-VP 工作站 (日本岛津)。

1.2 试剂

马钱苷对照品 (批号: 111640-200401) 和丹皮酚对照品 (批号: 110708-9704, 中国药品生物制品检定所); 耳聋左慈丸和阴性对照样品 (松原嘉美得制药有限公司); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 马钱苷含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm); 乙腈-甲醇-0.1% 磷酸溶液 (10:5:85) 为流动相; 检测波长为 237 nm。流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL。理论板数 8125, 分离度 2.81。

2.1.2 马钱苷对照品溶液的制备

精密称取马钱苷对照品 3.2 mg, 加 50% 甲醇溶解并稀释至 50 mL 量瓶中, 制成每 1 mL 含 64 μg 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取本品, 研碎, 取约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 加热回流 1 小时, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 加至中性氧化铝柱 (100~200 目, 4 g, 内径 1 cm) 上, 用 40% 甲醇 50 mL 洗脱, 收集流出液与洗脱液, 蒸干, 残渣用 50% 甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

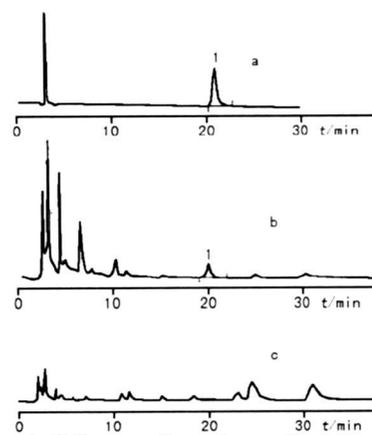
2.1.4 线性关系考察

精密吸取上述对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入液相色谱仪测定, 以进样量 (μg) 对峰面积绘制标准曲线。马钱苷回归方程为 $Y = 1.548675599 \times 10^6 X - 1.218846 \times 10^4$ ($r = 0.99999$)。结果表明, 在上述色谱条件下, 马钱苷进样量在 0.128~1.28 μg 范围内, 峰面积与浓度

呈良好的线性关系。

2.1.5 阴性对照试验

取山茱萸阴性样品按 2.1.3 操作制得阴性供试品, 用与样品相同的条件测定, 阴性试验在马钱苷出峰的位置无干扰峰。见图 1。



a 对照品; b. 样品; c. 阴性样品; 1. 马钱苷。

图 1 耳聋左慈丸中马钱苷 HPLC 色谱图

2.1.6 精密度试验

精密吸取同一批号样品溶液 20 μL, 重复 6 次进样, 峰面积平均值为 1168140, 其 RSD 为 0.51%。

2.1.7 重复性试验

取同一批号样品 6 份, 分别按供试品溶液制备法制备, 测定其马钱苷峰面积值, 其结果样品中马钱苷平均含量为 0.47 mg · g⁻¹, 其 RSD 为 0.55%。

2.1.8 加样回收率试验

取已知含量的样品 6 份, 分别精密加入马钱苷对照品溶液, 按含量测定方法操作制备供试品溶液, 并按上述色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

样品量 (mg)	对照品加入量 (mg)	对照品测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.4673	0.2200	0.2172	98.73		
0.4652	0.2200	0.2183	99.23		
0.4568	0.2200	0.2200	100	98.98	0.70
0.4614	0.2200	0.2176	98.91		
0.4618	0.2200	0.2153	97.87		
0.4620	0.2200	0.2180	99.09		

2.2 丹皮酚的测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm); 甲醇-水 (70:30) 为流动相; 检测波长: 274

nm。流速: 1.0 mL · min⁻¹, 进样量: 20 μL。理论板数: 8960, 分离度: 2.40。

2.2.2 丹皮酚对照品溶液的制备

精密称取丹皮酚对照品 10 mg, 加甲醇溶解并稀释至 50 mL 量瓶中, 精密吸取 1 mL 加甲醇稀释至 10 mL。制成每 1 mL 含 20 μg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取本品, 研碎, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 45 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察

精密吸取对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入液相色谱仪测定, 以进样量 (μg) 对峰面积绘制标准曲线。丹皮酚回归方程为 $Y = 5.168638425 \times 10^6 X - 1.10984411 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 在上述色谱条件下, 丹皮酚进样量在 0.04~0.4 μg 范围内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.2.5 阴性对照试验

取牡丹皮阴性样品按 2.2.3 操作制得阴性供试品, 用与样品相同的条件测定, 阴性试验在丹皮酚出峰的位置无干扰峰。见图 2。

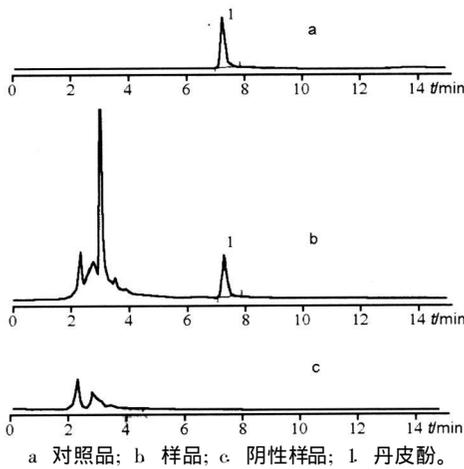


图 2 耳聋左慈丸中丹皮酚 HPLC 色谱图

2.2.6 精密度试验

精密吸取同一批号样品溶液 20 μL, 重复 6 次

进样, 峰面积平均值为 1198090, 其 RSD 为 0.37%。

2.2.7 重复性试验

取同一批号样品 6 份, 分别按样品溶液制备法制备, 测定其丹皮酚峰面积值, 其结果样品中丹皮酚平均含量为 1.18 mg · g⁻¹, 其 RSD 为 0.13%。

2.2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品 6 份。分别精密加入丹皮酚对照品溶液, 按含量测定方法操作制备供试品溶液, 并按上述色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收率试验

样品量 (mg)	对照品加入量 (mg)	对照品测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.5847	0.2900	0.2865	98.79		
0.5808	0.2900	0.2901	100.02		
0.5880	0.2900	0.2856	98.47	98.91	0.73
0.5784	0.2900	0.2869	98.92		
0.5912	0.2900	0.2861	99.35		
0.5810	0.2900	0.2840	97.93		

2.3 样品含量测定

取 3 批样品制备供试品溶液在选定的色谱条件下进样 20 μL, 外标法计算马钱苷和丹皮酚的含量, 结果见表 3。

表 3 3 批样品含量测定结果 mg · g⁻¹

样品批号	马钱苷含量	丹皮酚含量
051101	0.47	1.18
051102	0.47	1.20
051103	0.47	1.18

3 讨论

《中国药典》2005 年版一部采用双波长扫描法测定山茱萸中熊果酸的含量, 该方法操作繁琐, 专属性不强, 另外鉴别项中已对熊果酸进行了检查, 故本文运用高效液相色谱法测定了山茱萸中马钱苷含量, 同时增加了牡丹皮中丹皮酚的含量测定, 经方法学考察, 操作简便, 灵敏准确, 重现性好, 可供修订耳聋左慈丸质量标准时参考。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部, 2005: 430, 468