

高效液相色谱法测定乌梅丸中柠檬酸的含量

陈琳*, 刘丽梅, 王瑞海, 刘治中, 牛燕梅
(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法测定乌梅丸中柠檬酸含量的方法。方法:供试品采用甲醇超声提取。分析采用 Agilent SB C₁₈ 色谱柱,流动相:A 甲醇-B 0.8% NH₄H₂PO₄ 水溶液(H₃PO₄ 调 pH 值 2.8)(5:95),流速:0.5 mL·min⁻¹,柱温:25℃,检测波长:214 nm。结果:样品平均回收率为 101%(RSD=1.8%),样品平均含量为 9.74%。结论:本法准确、灵敏、重复性好,为乌梅丸复方的质量控制提供了依据。

[关键词] 乌梅丸;柠檬酸;含量测定;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0030-02

乌梅丸出自《伤寒论》。临床用于治疗胆道肠道蛔虫病、肠炎、肠道应激综合征等病症^[1]。其主要化学成分包括有机酸、挥发性成分、生物碱、黄酮等^[1],但其成分与药理作用的相关性研究较少,复方的主要活性成分未知。本研究考虑乌梅为该复方的君药,含有大量的有机酸,现代药理研究表明,乌梅的抗菌和固涩作用与有机酸密切相关^[2],因此将有机酸中含量最高的柠檬酸作为复方的有效成分之一。本研究建立了高效液相色谱法测定乌梅丸复方中柠檬酸含量的方法,实验证明,该方法简便、准确,为乌梅丸复方的质量控制提供了依据。

1 实验材料

1.1 仪器 Agilent RRLC 1200 色谱仪(G1312B 四元泵,G1367C 自动进样器,G1316B 柱温箱,G1315C DAD 检测器,HP 化学工作站);Sartorius CP 225D 电子天平;3520 型便携式 pH 计(JENWAY 公司)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯,Fisher 公司);其它试剂为分析纯;水为娃哈哈纯净水。

1.3 试药 乌梅丸方由乌梅 30 g,细辛 3 g,干姜 9 g,黄连 6 g,当归 6 g,附子 6 g,花椒 5 g,桂枝 6 g,人参 6 g,黄柏 6 g 共 10 位中药组成。所有药材均购自北京双桥燕京中药饮片厂;柠檬酸标准品为天津一方科技有限公司提供(归一化法测定含量 >

98%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:A 甲醇-B 0.8% NH₄H₂PO₄ 水溶液(H₃PO₄ 调 pH 值 2.8)(5:95);流速:0.5 mL·min⁻¹;柱温:25℃;检测波长:214 nm。

2.2 方药的提取 按处方称取各味中药,放入煎煮器中,按传统水煎方法提取 2 次,加水量分别为 6 倍、4 倍,每次 30 min,合并煎煮液,浓缩,真空干燥成干膏粉,备用。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取柠檬酸对照品 5.02 mg,置 5 mL 容量瓶中,加入流动相 B 使溶解,稀释至刻度,得 1.004 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取乌梅丸干膏粉 47 mg,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 14 mL,称重,超声提取 1 h,取出补重,过滤。滤液蒸干,以流动相 B 溶解,定容于 10 mL 容量瓶中,0.2 μm 针式过滤器过滤,备用。

2.5 测定方法 分别精密吸取对照品溶液 5 μL、样品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,测定。见图 1。

2.6 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 20 μL 进样分析,测定峰面积。以进样量对峰面积积分值进行回归处理,得回归方程 $Y = 125.86X - 1.43$, $r = 0.9999$,柠檬酸在 1.004 ~ 20.08 μg 呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL,按上述色谱条件进行分析,重复进样 6 次,其峰面积 RSD 为 1.78%,表明精密度良好。

[收稿日期] 2009-03-05

[基金项目] 中国中医科学院自主选题项目(ZZ2006018)

[通讯作者] *陈琳, Tel: (010) 64014411-2592; E-mail: chenlin73@sina.com

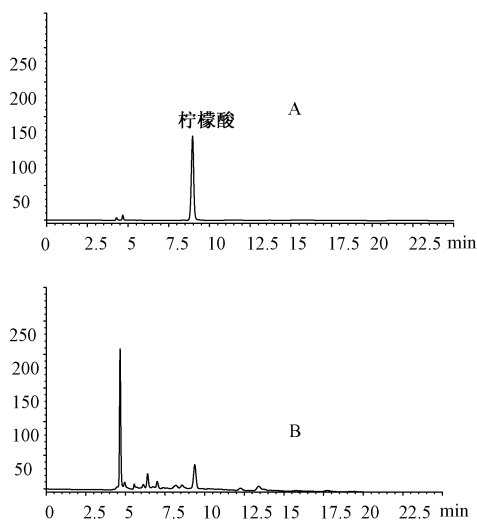


图 1 HPLC 色谱图
A 对照品; B 供试品

表 1 回收率实验

编号	称样量 (mg)	供试品中柠檬酸量 (mg)	添加的柠檬酸量 (mg)	测得的柠檬酸量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	25.38	2.477	2.5	5.024	101.9		
2	26.11	2.548	2.5	5.031	99.3		
3	24.89	2.429	2.5	4.987	102.3		
4	25.33	2.472	2.5	5.013	101.6	101	1.8
5	26.04	2.542	2.5	4.997	98.2		
6	24.96	2.436	2.5	5.005	102.8		

3 讨论

乌梅所含的有机酸中,含量最高是柠檬酸和苹果酸,二者含量高低与乌梅成熟程度密切相关,乌梅未成熟时苹果酸含量较高,成熟后柠檬酸含量最高,因此研究将柠檬酸作为复方质量控制指标。

乌梅丸是由 10 味中药组成的复方,其成分复杂,测定时干扰较为严重。本研究对供试品制备过程中提取溶媒、提取溶媒用量以及提取方式与时间进行了筛选,结果表明甲醇 70 mL 超声提取 1h 效果最好。测定过程中对色谱柱、流动相、检测波长等色谱条件进行优选,3 种不同型号色谱柱按色谱条件进行实验,结果表明 Agilent SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱效果最好。选择了 4 套流动相进行了对比实验,结果表明流动相 甲醇-0.8% NH₄H₂PO₃ 水溶液 (H₃PO₃ 调 pH 值 2.8) (5: 95) 对色谱峰的分离度和峰形均好于其它流动相。将柠檬酸标准品进行全波长扫描,其最大吸收波长为 190 nm,但在研究中发现,190 nm 处色谱图十分复杂,其它组分与柠檬酸无法分离。研究分别选取波长 200 nm、210 nm、214 nm、220 nm 进行检测,以 214 nm 处色谱图较为简单,且分离效果好,故作为检测波长。

对乌梅药材的质量标准研究较多,而对乌梅丸复方的质量标准研究很少,本研究建立了乌梅丸复方中柠檬酸的含量测定方法,本法准确、灵敏、重复性好,为乌梅丸复方的质量控制提供了依据。

[参考文献]

[1] 季宇彬. 中药复方化学与药理[M]. 北京:人民卫生出版社,2003. 722.
[2] 陈战国,吕九如. 复方制剂“稚泻停口服液”中柠檬酸的 RP-HPLC 测定研究[J]. 中草药,2000,31(12): 900.

2.8 重复性试验 按 2.4 项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液 6 份,分别吸取 10 μL,按上述色谱条件进行分析,测定峰面积并计算含量,结果供试品中柠檬酸平均含量为 9.76%,RSD 为 2.53%。表明重复性良好。

2.9 稳定性试验 取供试品溶液 1 份,室温放置,分别于 0,2,4,6,8,20,24 h 后进样 10 μL,按上述色谱条件进行分析,其峰面积 RSD 为 0.83%,表明供试品溶液在 24 h 稳定性良好。

2.10 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的乌梅丸干膏粉约 25 mg,精密称定,共取 6 份,分别精密加入柠檬酸对照品适量,按 2.4 项下供试品溶液的制备方法制备,分别吸取 10 μL,按上述色谱条件进行分析,测定峰面积并计算含量,结果表明回收率为 101%,RSD 为 1.8%。结果见表 1。

2.11 含量测定 按 2.4 项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液 3 份,分别吸取 10 μL,按上述色谱条件进行分析,测定峰面积并计算含量,结果供试品中柠檬酸含量分别为 9.67%、9.76%、9.79%,平均含量为 9.74%。