

HPLC 法测定复方紫草油中左旋紫草素的含量

邱冬梅 康萍 靳德超*

健民集团叶开泰国药(随州)有限公司

DOI:10.32629/fcmr.v7i4.18106

[摘要] 目的: 探讨分析HPLC法测定复方紫草油中左旋紫草素的含量。方法: 采用高效液相色谱法测定, 色谱柱Nanochrom C18(4.6×150mm, 5 μm), 紫外检测波长516nm; 流动相为甲醇-水(75:25), 流速1.0ml/min, 柱温为30℃。结果: (1)专属性试验符合规定; (2)准确度试验: 平均回收率为100.5%; (3)线性试验: 线性回归方程为 $y=0.00318x+0.00110$, $R^2=0.99996$; (4)重复性试验、中间精密度试验RSD均小于2.0%; (5)耐用性试验: 不同厂家同类型色谱柱、柱温在25~35℃范围内、流速在0.9~1.1ml/min范围内对左旋紫草素含量测定均没有显著影响, 均能准确的对其进行含量测定; (6)溶液稳定性试验: 对照品溶液及供试品溶液在48个小时内稳定。结论: 该方法简便快捷、精密度高、重现性好、结果准确。

[关键词] 复方紫草油; 左旋紫草素; 高效液相色谱法

中图分类号: P335+1 文献标识码: A

Determination of the Content of L-Shikonin in Compound Zicao Oil by HPLC Method

Dongmei Qiu Ping Kang Dechao Jin*

Jianmin Group Yekaitai Chinese Medicine (Suizhou) Co., Ltd.

[Abstract] Objective Exploration and analysis of HPLC method for determining the content of l-shikonin in compound purple grass oil. Method High performance liquid chromatography was used for determination, with a Nanochrom C18 column (4.6mm×150mm, 5 μm) and a UV detection wavelength of 516 nm; The mobile phase is methanol water (75:25), with a flow rate of 1.0 ml/min and a column temperature of 30℃. Result 1. The specificity test met the requirements; 2. Accuracy test: The average recovery rate was 100.5%; 3. Linear experiment: The linear regression equation is $y=0.00318x+0.00110$, $R^2=0.99996$; 4. The RSD of repeatability and intermediate precision tests are both less than 2.0%; 5. Durability test: Different manufacturers of the same type of chromatographic column, column temperature in the range of 25–35℃, and flow rate in the range of 0.9–1.1ml/min have no significant effect on the determination of the content of l-purple pigment, and can accurately determine its content; 6. Solution stability test: The reference solution and the test solution are stable within 48 hours. Conclusion This method is simple and fast, with high precision, good reproducibility, and accurate results.

[Key words] Compound purple grass oil; L-shikonin; High performance liquid chromatography

复方紫草油是由紫草、冰片、忍冬藤、白芷等组成, 具有清热凉血, 解毒止痛之功效。用于轻度水、火烫伤^[1]。该药品的质量标准中仅有薄层鉴别项, 暂无含量控制项目, 为了提高产品质量标准的科学性、规范性和全面可控性, 本实验采用HPLC法测定复方紫草油中左旋紫草素的含量^[2-3], 全面提高本品质量控制标准。

1 仪器与试剂

Waters e2695-2489高效液相色谱仪、PB-10型pH计、百万分之一电子天平(XPR36DR/A)、万分之一电子天平(CP225D)、液

相色谱柱Nanochrom C18(4.6mm×150mm, 5 μm)。

左旋紫草素对照品、甲醇(HPLC)、盐酸、二氯甲烷、氢氧化钠。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Nanochrom C18(4.6mm×150mm, 5 μm); 紫外检测波长516nm; 流动相为甲醇-水(75:25), 流速1.0ml/min, 柱温为30℃; 进样量: 20 μl; 理论板数按左旋紫草素峰计算不低于2000。

2.2对照品溶液的配制

精密称取左旋紫草素对照品适量,加甲醇制成每1ml含50 μg的溶液,摇匀,即得。

2.3供试品溶液的制备

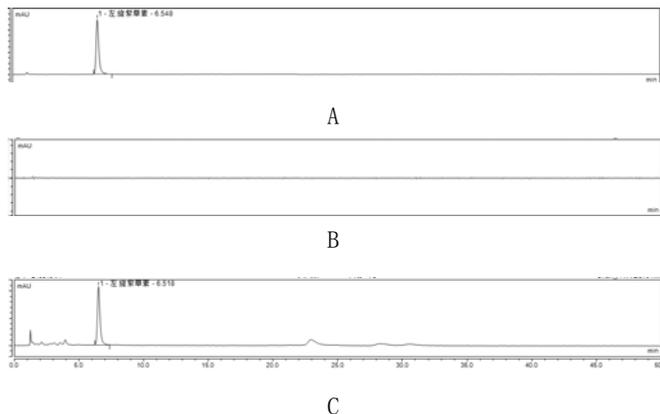
精密量取本品10ml,置分液漏斗中,加1mol/L氢氧化钠溶液提取6次,每次20ml,合并碱液,加盐酸调pH值至2.5~3.5,加二氯甲烷提取4次(30ml, 30ml, 20ml, 20ml),合并二氯甲烷液,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解并定量转移至50ml量瓶中,并用甲醇定容至刻度,滤过,作为供试品溶液。

2.4阴性供试品溶液的制备

取按处方及制备工艺制成不含紫草的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性供试品溶液。

2.5专属性试验

精密吸取对照品溶液、阴性供试品溶液、供试品溶液各20 μl,按照上述色谱条件测定。供试品溶液与左旋紫草素对照品在同一保留时间有相应的色谱峰对应,阴性供试品溶液无干扰。(见图1)



A: 对照品溶液 B: 阴性供试品溶液 C: 供试品溶液

图1 HPLC色谱图

2.6准确度试验

表1 回收率试验结果

序号	80%			100%			120%			
	峰面积(A)	12.436	12.397	12.415	15.692	15.666	15.757	18.774	18.913	18.783
回收率(%)	99.93	99.62	99.77	100.88	100.71	101.3	100.58	101.32	100.63	
平均回收率(%)	100.5									
RSD(%)	0.62									

精密称取左旋紫草素对照品10mg置50ml容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得浓度为0.2mg/ml的标准储备液。分别精密吸取标准储备液2ml、5ml、3ml置10ml、20ml、10ml容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得相对浓度80%的溶液、相对浓度100%的溶液、相对浓度120%的溶液,按照上述色谱条件进样、测定,计算得平均回收率为100.5%和RSD为0.62%(见表1),

试验结果表明该方法准确度良好。

2.7线性试验

精密称取左旋紫草素对照品10mg置50ml容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得浓度为0.2mg/ml的标准储备液。分别精密吸取标准储备液2.5ml、2ml、5ml、3ml、7.5ml,置20ml、10ml、20ml、10ml、20ml容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得相对浓度50%的溶液、相对浓度80%的溶液、相对浓度100%的溶液、相对浓度120%的溶液、相对浓度150%的溶液,按照上述色谱条件进样,每种浓度各进3针,测定峰面积,并以各浓度(Y)对各自峰面积(X)作相应的线性回归方程(见表2)。结果表明左旋紫草素在0.02560~0.07680mg/ml范围内呈良好线性关系,线性回归方程为 $y=0.00318x+0.00110$, $R^2=0.99996$ 。

表2 线性试验结果

溶液名称	序号	峰面积	平均峰面积	浓度(mg/ml)
50%的溶液	1	7.778	7.737	0.0256
	2	7.732		
	3	7.702		
80%的溶液	1	12.471	12.48	0.04096
	2	12.455		
	3	12.515		
100%的溶液	1	15.712	15.696	0.0512
	2	15.693		
	3	15.684		
120%的溶液	1	18.973	18.991	0.06144
	2	18.965		
	3	19.035		
150%的溶液	1	23.813	23.792	0.0768
	2	23.743		
	3	23.819		

2.8重复性试验

取同批样品,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,平行制备6份,按照上述色谱条件测定含量,6份样品平均含量为0.32mg/ml, RSD=0.59%(见表3),试验结果表明该方法重复性良好。

2.9中间精密度试验

另一名分析人员取与重复性试验同一批号的样品,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液6份,并使用另外一台仪器按照

上述色谱条件测定含量, 12份样品平均含量为0.32mg/ml, RSD为1.71%(见表4), 试验结果表明该方法中间精密度良好。

表3 重复性试验结果

编号	取样量(ml)	含量(mg/ml)	平均值(mg/ml)	RSD(%)
1	10	0.3206	0.32	0.59
2	10	0.3237		
3	10	0.3246		
4	10	0.3232		
5	10	0.3247		
6	10	0.3263		

表4 中间精密度试验结果

编号	取样量(ml)	含量(mg/ml)	平均值(mg/ml)	RSD(%)
人员1	10	0.3206	0.32	1.71
人员1	10	0.3237		
人员1	10	0.3246		
人员1	10	0.3232		
人员1	10	0.3247		
人员1	10	0.3263		
人员2	10	0.314		
人员2	10	0.3118		
人员2	10	0.3162		
人员2	10	0.3154		
人员2	10	0.3124		
人员2	10	0.3143		

2.10 耐用性试验

按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 分别选取两种不同的色谱柱(Nanochrom C18 4.6mm×150mm, 5 μm; KYL C18 4.6mm×250mm, 5 μm)、不同柱温(25℃、30℃、35℃)、不同流速(1.0ml/min、0.9ml/min、1.1ml/min)进行测定, 计算含量RSD分别为1.7%、0.49%、0.37%, 试验结果表明该方法耐用性良好。

2.11 溶液稳定性试验

取同一份对照品溶液、供试品溶液分别在配制后第0、3、6、

9、12、15、18、24、36、48小时, 按照上述色谱条件分别进样检测1次, 计算左旋紫草素的峰面积RSD分别为1.3%、0.83%, 表明对照品溶液及供试品溶液在48小时内稳定。

2.12 样品测定

取10批复方紫草油样品, 照上述方法测定, 计算样品中左旋紫草素的含量(见表5)。

表5 样品检测结果

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
含量(mg/ml)	0.35	0.34	0.3	0.31	0.33	0.34	0.33	0.36	0.35	0.34

3 讨论

目前, 制剂中紫草素的含量测定常采用重量法、比色法、薄层扫描法、HPLC法^[4-5]。我们采用高效液相色谱法测定复方紫草油中左旋紫草素的含量, 精密度高、重现性好、结果准确, 可用于本药品质量控制。关于供试品的制备方法, 文献报道^[6]用高效液相色谱法检测左旋紫草素的含量, 方法准确可靠, 但样品处理过程中使用0.25 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液提取不容易分层。本实验采用1mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液进行提取, 分层比较明显, 加盐酸酸化后, pH值为2.5~3.5, 用二氯甲烷代替氯仿提取, 含量结果准确, 同时减少了三氯甲烷的使用, 一定程度上减少了对环境的污染。

【参考文献】

- [1]苗明三,李振国.现代实用中药质量控制技术[M].北京:人民卫生出版社,2000.1015.
- [2]马琰,王嗣岑,黄猛.HPLC测定紫草中紫草素含量[J].中国药理学杂志,2000,(02):26.
- [3]张善玉,朴美兰,李梅,等.高效液相色谱法测定紫草涂膜剂中紫草素的含量[J].时珍国医国药,2003,(12):729-730.
- [4]邹桂欣,尤献民,姜鸿.紫外分光光度法测定中药复方制剂中紫草总萘醌的含量[J].时珍国医国药,2003,(04):212-213.
- [5]刘芳,王小平,伍伟祯.薄层扫描法测定烧伤膏中左旋紫草素的含量[J].基层中药杂志,2001,(02):21-22.
- [6]许红兰,姜哲.HPLC法测定复方紫草油中左旋紫草素的含量[J].现代医药卫生,2008,(21):3211-3212.

作者简介:

邱冬梅(1985--),女,汉族,湖北随州人,本科,医药工程中级工程师,主要研究药品质量标准优化,湖北省随州市高新技术产业园区。

康萍(1998--),女,汉族,广西桂林人,本科,主要研究药品方法学验证。

*通讯作者:

靳德超(1986--),男,汉族,陕西西安人,本科,工程师,执业中药师,主要研究药品生产质量体系建设和质量标准优化。