

HPLC 法测定藜豆中左旋多巴的含量

黄海滨¹, 苏 健¹, 谭叶懂²

(1. 广西中医学院制药厂, 广西南宁 530001; 2. 广西中医学院药学院, 广西南宁 530001)

摘 要: 采用 HPLC 法建立测定藜豆中左旋多巴含量的方法。色谱柱为岛津 C-18 甲基硅烷柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇:0.1 mol/L 醋酸溶液(25:75, v/v), 以硫唑嘌呤为内标物, 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温为室温, 供试品的前处理方法为微波辅助提取法。结果表明, 该方法准确度高, 线性关系好, 重现性好, 平均加样回收率为 97.34%, RSD 1.01% (n=5), 结果满意。

关键词: 藜豆; 左旋多巴; 高效液相色谱法

中图分类号: Q946.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)05-0460-03

Determination of Levodopa in *Mucuna macrocarpa* Wall by HPLC

HUANG Hai-bin¹, SU Jian¹, TAN Ye-chong²

(1. *Factory of Pharmaceutical Science, Guangxi Traditional Medicine University, Nanning 530001, China;*

2. Pharmaceutical Science, Guangxi Traditional Medicine University, Nanning 530001, China)

Abstract: To establish a method for determination of Levodopa in *Mucuna macrocarpa* Wall by HPLC. Using HPLC with Shimadzu C-18 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mixture of methanol and 0.1 mol/L acetic acid(25:75, v/v) as mobile phase, detection wavelength is 280nm; Azathioprine was used as internal standard substance, flow rate at 1.0 mL/min, column temperature at r. m. The method has a good linear dependence. The average recovery of loading sample was 97.34% with RSD 1.01% (n=5). The method is fast, simple and stable. It has been proved to be a good practice for determination of Levodopa in *M. macrocarpa* Wall.

Key words: *Mucuna macrocarpa* Wall; Levodopa; HPLC

藜豆(*Mucuna macrocarpa* Wall), 在西南各地均有种植(蔡军等, 1988), 近年来的研究表明, 藜豆中含有较高的左旋多巴成分(蔡军等, 1990), 它是人和动物体内合成去甲肾上腺素和多巴胺的前体之一, 是经典的抗震颤麻痹药, 临床上用于帕金森氏病的治疗。从藜豆中提取左旋多巴是一重要的药用资源。为了更准确的测定藜豆中左旋多巴的含量, 我们首次采用了 HPLC 内标法来进行测定。该法比较过去使用的紫外分光光度法、薄层扫描法、HPLC 法, 测定的准确性和重现性均有所提高。另外, 在样

品提取中用到了近年来新采用的微波辅助提取法比较原来的冷浸法也是有其先进性的。

1 仪器、试剂、样品

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪; 微量进样注射器(美国 HAMILTON 公司); 微波炉(Galanz WP700L17 型)。左旋多巴和硫唑嘌呤为中国药品生物制品检验所提供; 甲醇为优级纯, 其余均为分析纯。样品: 藜豆, 采自广西东兰县, 经本院中药鉴定

收稿日期: 2004-02-23 修订日期: 2004-05-18

作者简介: 黄海滨(1955-), 男, 广西北海人, 副教授, 硕士生导师, 1996~1998 年在德国汉堡大学从事天然药物研究工作, 研究方向为天然药物研究开发和药物分析。

教研室林安平教授鉴定。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱为岛津 C-18 甲基硅烷柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇:0.1 mol/L 醋酸溶液 (25 : 75, v/v); 紫外检测器灵敏度:0.05 AUFS, 检测波长 280 nm; 流速:1.0 mL/min; 柱温:室温。在此条件下,左旋多巴能达到理想的分离效果,保留时间在 10 min 左右,内标峰无干扰,理论塔板数以左旋多巴计不低于 3 000。

2.2 供试品溶液的制备

对照品溶液的制备:精密称取左旋多巴 50 mg,加

流动相制成 100 mL(每 1 mL 含左旋多巴 0.5 mg)。

内标溶液的制备:精密称取硫唑嘌呤 25 mg,加流动相制成 50 mL。(每 1 mL 含硫唑嘌呤 0.5 mg)。

样品溶液的制备:精密称取研成粗粉的藜豆粉末 0.3 g,精密加入乙醇:0.1 mol/L 醋酸(40 : 60)溶液 50 mL 后,精密称定重量,微波提取 1.5 min,功率中档,放冷后,补足上述溶液至原来的重量,过滤,弃去初滤液,精密量取续滤液 10 mL,减压蒸干,精密加入内标溶液 5 mL,使溶解,作为供试液。

2.3 线性关系考察

分别精密量取左旋多巴对照品溶液 2、4、6、8、10 mL,蒸干,残渣分别精密加入内标溶液 5 mL,使溶解,吸取上述溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,依本法测定,结果见表 1。以左旋多巴的进样量

表 1 线性试验结果
Table 1 Linearity test

左旋多巴进样量(X)(μg)	2	4	6	8	10
左旋多巴峰面积(A ₁)L-dopa area	101 362	205 123	304 998	427 058	506 610
内标峰面积(A ₂)Internal standard area	343 523	346 650	346 225	346 983	345 171
峰面积比值 Ratio of A ₁ and A ₂	0.295 0	0.591 7	0.880 9	1.230 7	1.467 7
回归方程 Formula	Y=6.683X+0.029		r=0.999 9		

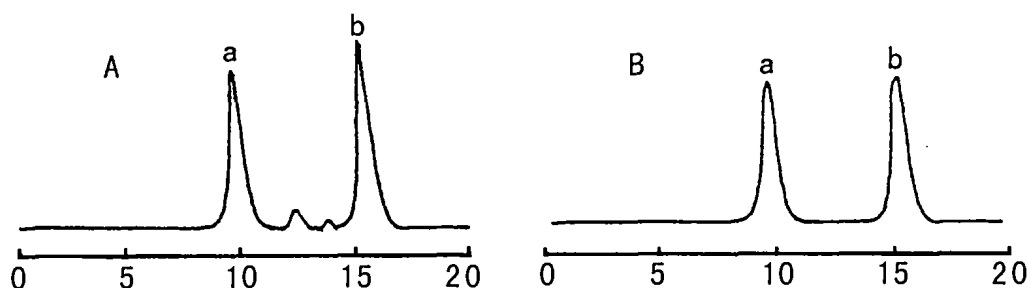


图 1 高效液相色谱图

Fig. 1 The HPLC chromatogram

A. 藜豆供试液 A. sample; B. 左旋多巴对照品和内标物 Standard; a. 左旋多巴 a-Levodopa; b. 硫唑嘌呤 b-Azathioprine.

(μg)为横坐标(X),以左旋多巴和内标物的吸收峰面积比值为纵坐标(A),进行回归分析,结果表明:左旋多巴进样量在 2~10 μg 范围内,进样量与吸收峰面积呈良好的线性关系。回归方程:Y=6.683X+0.002 9, r=0.999 9。

2.4 精密度试验

精密量取左旋多巴对照品溶液 5 mL,加内标溶液定容至 10 mL,吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,重复测定 5 次,记录峰面积,左旋多巴峰面积平均值为 306 673, RSD=1.7%,内标物峰面积平均值为 341 737, RSD=0.6%,峰面积比值平均值为 0.892 3,

RSD=0.014%, 详见表 2,表明测试精密度良好。

表 2 精密度试验结果
Table 2 Accuracy test

实验次数 No.	左旋多巴 峰面积 L-dopa area	内标物(硫唑 嘌呤)峰面积 Internal standard area	峰面积比值 Ratio
1	301 251	345 593	0.871 7
2	312 187	346 277	0.901 6
3	305 544	341 590	0.894 5
4	311 923	342 219	0.911 5
5	302 461	342 904	0.882 1
平均值 Average	306 673	343 717	0.892 2
RSD	1.7%	0.6%	0.014%

表3 稳定性试验结果
Table 3 Stability test

时间 Time (h)	左旋多巴 峰面积 L-dopa area	内标物(硫唑 嘌呤)峰面积 Internal standard area	峰面积比值 Ratio
0	361 507	347 612	1.039 9
1	374 624	345 784	1.083 4
2	366 652	345 561	1.061 0
4	374 307	341 473	1.096 1
6	362 953	345 518	1.050 5
8	370 021	346 204	1.068 8
平均值 Average	368 344	345 359	1.066 6
RSD(%)	1.5	0.6	0.019

2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 10 μ L, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 注入高效液相色谱仪, 记录左旋多巴和

表5 回收率试验结果
Table 5 Recovery test

称样量 Sample(g)	左旋多巴的含量 L-dopa in sample(mg)	左旋多巴加入量 L-dopa added(mg)	加样后测定值 Determ. result(mg)	加样回收率 Recovery rate(%)	平均加样回收率 Average(%)	RSD (%)
0.1510	6.795	6.00	12.63	97.25	—	—
0.1509	6.790	6.00	12.54	95.83	—	—
0.1524	6.858	6.00	12.73	97.87	97.34	1.01
0.1486	6.687	6.00	12.60	98.55	—	—
0.1493	6.718	6.00	12.55	97.20	—	—

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的藜豆 5 份, 分别精密加入定量的左旋多巴对照品溶液, 混匀, 蒸干, 依法分别测定左旋多巴的含量(表 5)。

3 讨论

(1) 根据左旋多巴在水中微溶, 在稀酸中易溶的性质, 我们设计用 0.1 mol/L 的醋酸溶液作为提取溶剂, 溶剂中 40% 的乙醇能避免过多的水溶性杂质的溶出。文中采用的微波提取法能使藜豆植物细胞在很短时间内破裂, 细胞内容物迅速扩散到溶剂中。此法较以前采用的浸渍法大大节省时间, 平均加样回收率 97.68%, 提取效果是比较理想的。近年来微波提取作为一种新的提取方式, 在植物提取物的研究上发挥在了很大的作用。

(2) 文献中对藜豆属植物中的左旋多巴的含量有用紫外分光光度法(北京医学院药学系 74 届学员, 1974)、薄层扫描法(陈勇等, 1993)、HPLC(黄海滨, 1994)法测量的报导, 本文采用 HPLC 内标法提高了

内标物的峰面积, 结果显示供试品溶液中的左旋多巴和内标物在 8 h 内稳定(表 3)。

2.6 重现性试验

取同一批采集的藜豆依法分别制成供试品溶液 5 份, 测定其中左旋多巴的含量。结果见表 4, 平均值为 4.55%, RSD=2.2%(n=5), 表明本方法的重现性较好。

表4 重现性试验结果
Table 4 Recurrence test

试验号 No.	左旋多巴含量 Levodopa (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
1	4.62	—	—
2	4.54	—	—
3	4.56	4.55	0.18
4	4.39	—	—
5	4.65	—	—

测定的准确度。内标物硫唑嘌呤可溶于稀酸溶液, 且在 280 nm 处有最大吸收, 吸收峰附近无杂质峰干扰。

参考文献:

- 北京医学院药学系 74 届学员. 1974. 藜豆中左旋多巴的提取和含量测定[J]. 中草药通讯, (4): 20-22.
- Cai J(蔡 军), Zhu ZY(朱兆仪). 1988. A survey of research on the natural resources of *Mucuna Adans.* (藜豆属药用资源研究概况)[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 19(2): 37-40.
- Cai J(蔡 军), Zhu ZY(朱兆仪). 1990. The research of levodopa in *Mucuna Adans.* (藜豆属植物中左旋多巴资源的研究)[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 21(8): 7-8.
- Chen Y(陈 勇), Zhen HS(甄汉深), Xu XJ(许学健), et al. 1993. Determination of Levodopa in *Maodou (Mucuna pruriens)* and *Lidou (M. macrocarpa)* by TLC Scanning(薄层扫描法测定猫豆和藜豆中左旋多巴的含量)[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 24(6): 294-295.
- Huang HB(黄海滨), Xu XJ(许学健), Feng JF(奉健芳), et al. 1994. HPLC Determination of Levodopa in *Mucuna pruriens var. utilis*(高效液相色谱法测定猫豆中左旋多巴的含量)[J]. *Guizhou* (广西植物), 14(3): 293-294.