

# HPLC 测定降糖明目颗粒中羟基红花黄色素 A 的含量

刘进怀\*, 张晴, 薛彬, 刘崧, 张彦廷

(微生物药物国家工程研究中心, 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 石家庄 050015)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC 法测定降糖明目颗粒中羟基红花黄色素 A 的含量测定方法。方法: 采用 Waters symmetry 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 以水-三氟乙酸(100:0.1)为 A 相, 乙腈-三氟乙酸(100:0.1)为 B 相, 梯度洗脱程序为 0 ~ 20 min, 5% ~ 20% (B); 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 403 nm; 柱温 40 °C。结果: 羟基红花黄色素 A 在 0.099 2 ~ 3.968 μg 呈良好线性关系, r = 0.999 9, 平均回收率和 RSD 分别为 100.2% 和 2.96%。结论: 本方法简便、准确、重复性好, 可测定该制剂中羟基红花黄色素 A 的含量。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 降糖明目颗粒; 红花; 羟基红花黄色素 A

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0048-02

降糖明目颗粒是由密蒙花、红花、天花粉等 6 味中药加工制成, 具有清热养肝, 明目退翳的功效, 用于治疗糖尿病及糖尿病引起的视网膜病变。红花是方中主药, 具有活血化瘀作用, 羟基红花黄色素 A 是红花中的主要功效成分, 为更好地控制产品质量, 在测定蒙花苷<sup>[1]</sup>的基础上, 建立了羟基红花黄色素 A 的含量测定方法, 本方法简便、准确、重复性好, 可测定该制剂中羟基红花黄色素 A 的含量。

## 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(2690 分离单元, 2487 紫外检测器, Millennium<sup>32</sup> 色谱工作站), KQ-250B 超声波清洗器, Sartorius CP225D 电子天平(1/10 万)。

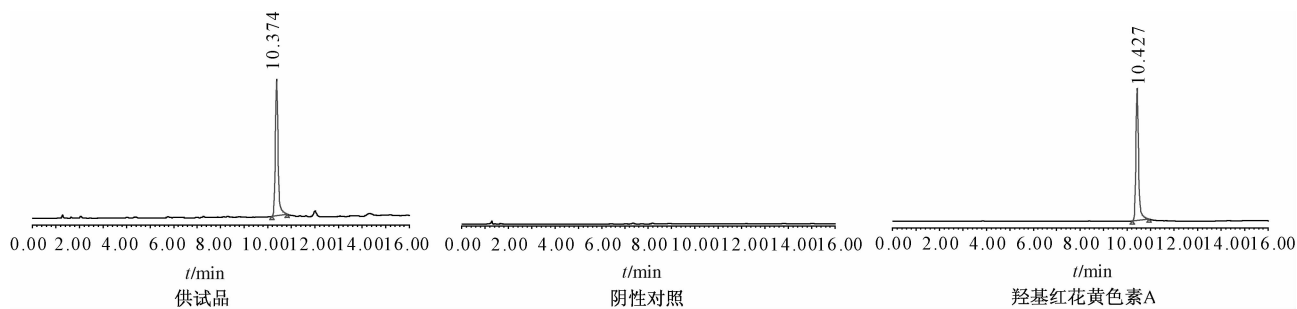


图 1 羟基红花黄色素 A HPLC

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品 19.84 mg, 用 25% 甲醇溶解定容于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 得对照品储备液; 精密吸取对照品储备液 2.5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 25% 甲醇稀释至

乙腈为色谱纯, 水为二次蒸馏水, 三氟乙酸为分析纯。羟基红花黄色素 A 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 111637-200502, 供含量测定用), 降糖明目颗粒为本公司研制。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Waters symmetry 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相水-三氟乙酸(100:0.1)(A), 乙腈-三氟乙酸(100:0.1)(B), 梯度洗脱程序为 0 ~ 20 min, 5% ~ 20% (B); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 403 nm; 柱温 40 °C; 进样体积 10 μL; 在此条件下, 待测成分和相邻成分完全分离, 阴性对照无干扰。见图 1。

刻度, 摇匀, 得对照品溶液为 99.2 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3 供试品溶液的制备** 取装量差异项下的本品, 研细, 取 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 25% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放至室温, 再称定质量, 用 25% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

**2.4 阴性样品溶液的制备** 按处方比例称取除红

[收稿日期] 2010-01-29

[通讯作者] \* 刘进怀, 高级工程师, 研究方向药物分析, Tel: 0311-85993040, E-mail: liujinhuai@163.com

花的其他药材,照制备工艺制成不含红花药材的阴性样品,按供试品溶液的制备方法制得阴性样品溶液。

**2.5 系统适用性试验** 分别取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,按 2.1 项下的色谱条件分析,试验结果表明阴性样品在羟基红花黄色素 A 出峰位置无干扰峰。

**2.6 线性关系考察** 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品,用 25% 甲醇溶解分别制成质量浓度为 9.92, 49.6, 99.2, 198.4, 396.8 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,按 2.1 项下的色谱条件分析,测定峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为  $Y = 2.0 \times 10^6 X - 9.56 \times 10^3$ ,  $r = 0.9999$ , 实验结果表明,在 0.0992 ~ 3.968 μg 有良好线性关系。

**2.7 精密度试验** 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 0.47%,表明精密度良好。

**2.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定,羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 1.36%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.9 重复性试验** 取同一批号样品 6 份(批号 081201),按供试品溶液的制备方法制得样品溶液,按 2.1 项下的色谱条件分析,测得平均含量为 4.53 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 为 1.42%,实验结果表明重复性良好。

**2.10 回收率试验** 精密称取已知含量的样品 6 份(批号 081201),分别精密加入一定量的羟基红花黄色素 A 对照品(加 396.8 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液 6 mL),按供试品溶液的制备方法制得样品溶液,按 2.1 项下的色谱条件分析,计算回收率,结果见表 1。

**2.11 样品测定** 取 3 批样品(批号分别为 081201, 081202, 081203),按供试品溶液的制备方法制得样品溶液,按 2.1 项下的色谱条件分析,计算含量,结果分别为 4.53, 4.48, 4.65 mg·g<sup>-1</sup>。

表 1 降糖明目颗粒中羟基红花黄色素 A 加样回收率试验

No.	取样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	502.36	2.276	2.381	4.693	101.5		
2	504.45	2.285	2.381	4.733	102.8		
3	500.75	2.268	2.381	4.553	95.97	100.2	2.96
4	505.68	2.291	2.381	4.635	98.45		
5	506.12	2.293	2.381	4.761	103.7		
6	512.24	2.320	2.381	4.670	98.70		

### 3 讨论

**3.1 流动相的选择** 《中国药典》<sup>[2]</sup> 记载了红花药材中羟基红花黄色素 A 的测定方法,采用了甲醇-乙腈-磷酸水系统,文献报道了补阳还五汤、五虎散等制剂中羟基红花黄色素 A 的含量测定方法,应用的流动相系统有甲醇-乙腈-磷酸水,甲醇-磷酸水,乙腈-磷酸水,甲醇-醋酸水溶液,乙腈-磷酸二氢钾溶液-四丁基氢氧化铵溶液。采用文献方法测定本制剂时,处方中其他药味干扰羟基红花黄色素 A 的测定。经试验,以水-三氟乙酸(100:0.1)为 A 相,乙腈-三氟乙酸(100:0.1)为 B 相,梯度洗脱,待测成分和其他成分均达到基线分离,阴性对照无干扰。

**3.2 提取条件的选择** 参照《中国药典》<sup>[2]</sup>,选择 25% 甲醇为提取溶剂,考察了不同超声时间和溶剂用量,结果表明用 50 mL 溶剂,超声 30 min 可提取完全,故确定提取条件为用 50 mL 25% 甲醇超声 30 min。

#### [参考文献]

- [1] 刘进怀,张晴,狄珍珍,等. 高效液相色谱法测定降糖明目颗粒中蒙花苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 14.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 103.

[责任编辑 顾雪竹]