

RP-HPLC 法测定扶正固本颗粒中大黄素

朱艳容¹, 李媛媛¹, 李先荣^{1*}, 倪艳¹, 王晓敏²

(1. 山西省中医药研究院方剂研究所, 太原 030012; 2. 山西振东开元制药有限公司, 山西 长治 046108)

[摘要] 目的: 以大黄素的含量为指标, 建立扶正固本颗粒中何首乌的质量控制方法。方法: 采用 HPLC 法测定扶正固本颗粒中大黄素的含量。流动相甲醇 - 0.2% 磷酸(84 16), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 437 nm。结果: 大黄素在 4.73 ~94.60 μg 范围内具有良好的线性关系($r=0.9999$), 平均回收率为 100.9%, RSD1.81%。结论: 建立的方法有较强的选择性和专属性, 准确可靠, 可作为制剂的含量测定标准收入质量标准正文, 有效控制扶正固本颗粒质量的稳定性。

[关键词] 扶正固本颗粒; 大黄素; 反相高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0069-02

扶正固本颗粒收载于国家药品监督管理局标准(WS-5250(B-0250)-2002), 由黄芩、何首乌、人参等中药组成, 具有益气养阴, 凉血解毒之功效, 主要用于食管癌, 胃癌气阴两虚兼热毒证患者放、化疗时的合并用药。何首乌中的大黄素、大黄素甲醚等蒽醌类化合物是该处方中解毒功效的主要活性成分。

《中华人民共和国药典》(2010 年版一部) 何首乌含量测定项下对 2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D 葡萄糖苷和结合蒽醌进行了定量控制^[1]。本研究参照处方的功能主治, 选择大黄素作为何首乌的质量控制指标。目前药典测定何首乌药材中的大黄素含量时采用 254 nm 作为检测波长^[1], 实际上, 本制剂中许多成分在 254 nm 下均有吸收, 对待测成分有干扰。通过实验比较 254 nm 和 437 nm 下扶正固本颗粒中大黄素含量时发现, 437 nm 更适合检测该复方制剂中的大黄素。本研究建立的方法具有较强的专属性和准确性, 能缩短大黄素的分析时间, 有效控制何首乌的质量, 值得推广应用。

1 仪器及试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 Agilent G1321A 四元泵(Quatpump), Agilent G1322A 真空在线脱气机(Degrasser), Agilent G1313A 自动进样器(ALS), Agilent G1315 DAD 二极管阵列检测器, Agilent

chemstation system (安捷伦化学工作站); Hypersil ODS2(4.6 mm ×250 mm, 5 μm); KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP211D 电子天平(德国赛多利斯)

甲醇为色谱纯(美国 TEDIA 试剂公司); 水为自制双蒸水; 其余试剂均为分析纯; 扶正固本颗粒(15g/袋, 批号为 091202; 100201; 100302) 由山西振东开元制药有限公司生产; 缺味阴性样品自制; 大黄素对照品(批号 110756-200110) 由中国药品生物制品检定所提供。

2 含量测定

2.1 色谱条件 色谱柱 SinoChrom ODS-BP(4.6 mm ×250 mm, 5 μm), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 流动相 甲醇 - 0.2% 磷酸(84 16) 为流动相, 检测波长 437 nm。理论塔板数以大黄素计算不低于 2 000, 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取大黄素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 4.37 μg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备^[2] 取本品 15 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加乙醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失质量, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液 25 mL, 蒸干, 残渣加 30% 乙醇溶液 20 mL 使溶解, 再加盐酸 2 mL, 摇匀, 置 80 °C 水浴加热 1 h, 立即冷却, 用三氯甲烷强力振荡提取 3 次, 每次 15 mL, 合并三氯甲烷层, 蒸干, 残渣加甲醇定容至 5 mL, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 即得。

2.4 阴性对照品溶液的制备 按照处方组成去掉

[收稿日期] 20100203(002)

[第一作者] 朱艳容, 硕士研究生, 研究方向中药新药研究与开发。E-mail: zy85@126.com

[通讯作者] * 李先荣, 教授, 博士生导师, 主任药师, 研究方向中药新药研究与开发; Tel: (0351) 4668028; E-mail: Xrli-01@163.com

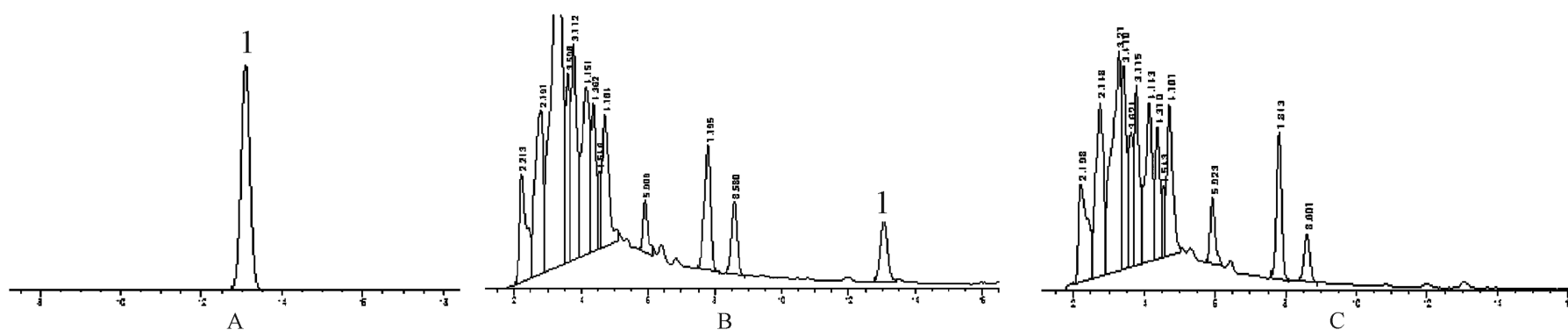


图 1 大黄素的 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; C. 阴性; 1. 大黄素

何首乌, 制备缺失何首乌的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.5 标准曲线绘制 精密吸取对照品溶液 1, 2, 5, 5, 10, 15, 20 μL 注入液相色谱仪, 测定各峰面积的积分值。以大黄素量 (μg) 为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线。回归方程 $Y = 2.0897X - 0.8274$, $r = 0.9999$ 。表明大黄素在 4.73 ~ 94.60 μg 与峰面积呈现良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取上述大黄素对照品溶液 10 μL , 分别进样 6 次, 结果峰面积积分值的 RSD 为 0.53% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取批号为 091202 样品 6 份, 各 15 g, 精密称定, 依法提取、进样, 测定大黄素的平均含量为 1.785 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.04% ($n = 6$), 表明方法重现性良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取同一供试样品溶液, 在室温下于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定峰面积积分值, 结果 RSD 为 0.05%, 表明供试品溶液在 10 h 内保持稳定。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的同批样品 6

表 1 大黄素加样回收率试验 ($n = 6$)

称样量 / g	大黄素含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
7.50038	13.276	14.190	28.016	102.6	100.9	1.81
7.50073	13.276	14.190	28.063	102.9		
7.49948	13.274	14.190	27.379	98.1		
7.49984	13.275	14.190	27.611	99.7		
7.50025	13.275	14.190	27.708	100.4		
7.50000	13.275	14.190	27.854	101.4		

份, 各 7.5 g, 精密称定, 于每份中加入一定量的大黄素对照品, 依法提取, 进样, 记录色谱图, 计算含量。结果见表 1。

2.10 样品含量测定 按上述含量测定方法操作, 测定了 3 批样品 (批号为 091202, 100201, 100302), 结果大黄素的含量分别为 0.060, 0.065, 0.062 mg/袋。

3 讨论

扶正固本颗粒在 254 nm 色谱图中有较多的吸收峰, 造成基线不稳, 干扰较大, 需调整流动相比比例推迟其出峰时间, 才能得到较好的分离, 而相同条件下 437 nm 色谱图中基线平稳, 杂质峰的干扰小, 大黄素色谱峰能达到很好分离, 缩短了出峰时间。

何首乌中存在着结合成苷和游离两种形式的大黄素, 为了准确测定制剂中总的大黄素含量, 故在样品提取时采用加酸水解, 再以三氯甲烷提取游离型蒽醌类成分, 以便测定。

在制备供试品溶液时, 考察了水浴加热不同时间对大黄素含量测定的影响, 结果反应 1 h 含量达到最高, 故选择酸水解时间为 1 h; 另外对大黄素不同提取时间, 萃取次数进行考察, 结果表明采用超声 30 min, 三氯甲烷萃取 3 次, 即可提取完全。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 164.
- [2] 刘惠军, 杨骏, 吴丽红, 等. 血通胶囊的质量控制研究 [J]. 中成药, 2008, 30(5): 776.

[责任编辑 顾雪竹]