

# 槐角痔疮膏中芦丁的 HPLC 含量测定

姜虹玉<sup>1</sup>, 于军华<sup>2</sup>, 吕文海<sup>3\*</sup>

(1. 济南市中心医院, 山东 济南 250013; 2. 济南市药业集团, 山东 济南 250012;  
3. 山东中医药大学, 山东 济南 250014)

[摘要] 目的: 建立槐角痔疮膏中芦丁的含量测定方法。方法: HPLC 法。C<sub>18</sub> 色谱柱, 流动相: 四氢呋喃-水-冰醋酸(25.5: 73: 1.5), 流速: 1mL/min, 检测波长: 359nm。结果: 芦丁线性范围为 0.136~ 1.084μg, RSD 为 2.63%。结论: 方法可靠, 简单可行, 为控制槐角痔疮膏的内在质量提供了科学依据。

[关键词] 槐角痔疮膏; 芦丁; HPLC

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)02-0018-03

槐角痔疮膏由清肠疗痔的槐角丸衍化而来, 为一次性水包油型推注式软膏。槐角为方中君药, 芦丁是其唯一能获得对照品的有效成分之一。具有维持血管抵抗力, 降低其通透性, 减少脆性等作用。槐角中的芦丁含量, 以往报道主要是使用分光光度法, 以芦丁为对照测定其总黄酮含量<sup>[1]</sup>。为有效控制槐角痔疮膏的质量, 笔者采用高效液相色谱法对槐角痔疮膏中的芦丁进行了含量测定, 报导如下。

## 1 仪器与试剂

KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 超声电功率 250W, 工作频率 40KHz); 岛津 LC-10A 型高效液相色谱仪; 试剂为分析纯, 其中四氢呋喃经重蒸馏, 取中间馏份使用。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所提供)批号: 080-9002

## 2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取本品约 1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 50mL, 超声处理 20min, 全部转移至蒸发皿中, 80℃水浴蒸发至小体积, 加入硅藻土 2.5g 拌合蒸干, 转移到具塞锥形瓶中, 加入石油醚(60~ 90℃) 50mL 超声处理 20min, 放冷, 倾去上清液, 药渣挥干, 精密加入甲醇 50mL, 称定重量, 超声处理 20min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取滤液用微孔滤膜

(0.45μL 滤过, 即得。

## 2.2 HPLC 测定的方法学考察

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 C<sub>18</sub>, 250mm × 4.6mm, 5μm (Diamonsil TM), 流动相为四氢呋喃-水-冰醋酸(25.5: 73: 1.5); 室温; 流速 1mL/min, 检测波长 359nm。

2.2.2 最大吸收波长的选择 芦丁在紫外区域有 254nm 和 359nm 两个最大吸收, 经试验比较, 359nm 条件下, 分离度好, 干扰少, 检测波长选定为 359nm。HPLC 分析图谱见图 1。

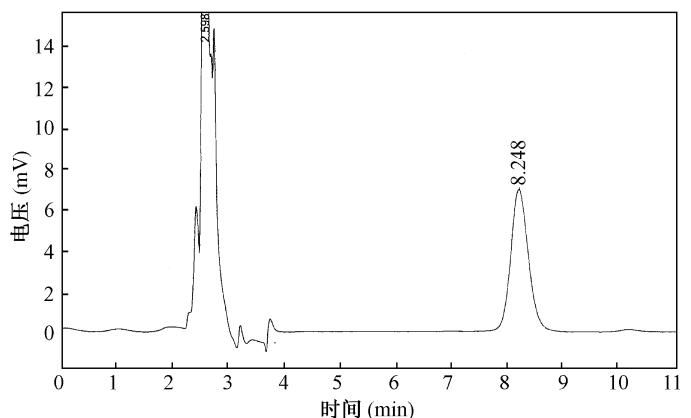


图 1 芦丁对照品色谱图

2.2.3 阴性干扰程度考察 按处方比例不加槐角, 制得阴性对照样品, 按供试品液制备方法, 制备缺槐角的阴性对照溶液。吸取芦丁对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 20μL, 分别注入高效液相色谱仪, 依法测定, 从色谱图可见, 供试品溶液和对照品溶液中芦丁峰保留时间一致, 与其他组分达到基线分离; 阴性溶液中在与对照品溶液中芦丁相应位

[收稿日期] 2005-01-20

[通讯作者] 吕文海, Tel: (0531) 82613129; E-mail: Luwenhaitcm

@ 163.com

置处未出现相应的峰。所以, 阴性对照溶液不干扰样品中芦丁的测定, 结果见图2, 图3, 图4。

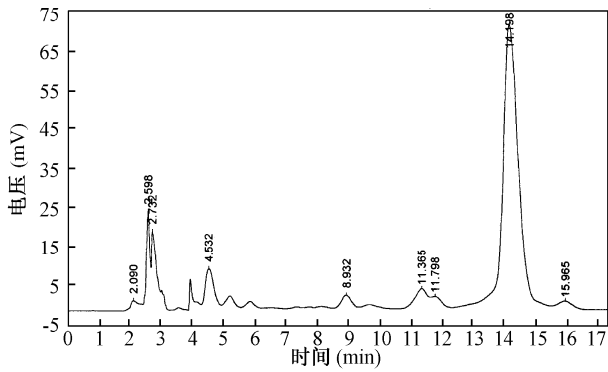


图2 阴性样品色谱图

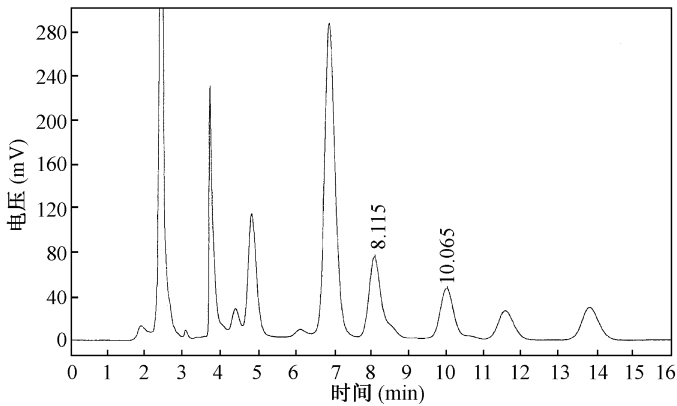


图3 槐角药材色谱图

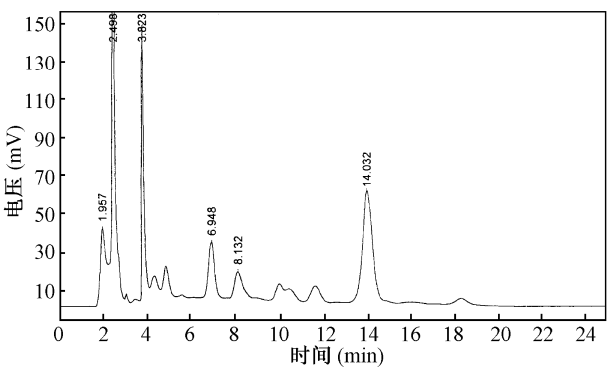


图4 供试品溶液色谱图

**2.2.4 线性关系考察** 精密称取在 120℃减压干燥至恒重的芦丁对照品 2.71mg, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 25、50、100、150、200μL, 置 1mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样 20μL, 测定峰面积, 以芦丁进样量为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程  $Y = -58327.4 + 1487393.5X$ ,  $r = 0.999$ 。结果表明芦丁在 0.136~1.084μg 范围内线性关系良好。

**2.2.5 精密度试验** 吸取浓度为 21.2μg/mL 的芦丁对照品溶液, 进样 20μL, 测定峰面积, 连续测定 5 次, 分别为 568060、572276、569670、573409、572251,  $RSD = 0.385\%$ 。试验表明仪器精密度良好。

**2.2.6 重复性试验** 取样品 5 份, 精密称定, 分别制得供试品溶液, 按含量测定方法测定, 百分含量分别为 0.111、0.114、0.113、0.115、0.111, 芦丁平均含量为 0.113%,  $RSD = 2.85\%$ 。

**2.2.7 稳定性试验** 吸取供试品溶液, 进样 20μL, 测定峰面积, 然后每隔 2h, 测定一次, 共测定 5 次。结果为 703279、693970、716606、714021、701112, 试验表明, 峰面积在 8h 内保持稳定。以后试验证实, 样品在 2~3 周内仍稳定。

**2.2.8 回收率试验** 采用加样回收法, 取已测知芦丁含量为 0.113% 的样品, 精密加入浓度为 0.102mg/mL 的芦丁对照品溶液 1mL, 按样品制备方法制样, 按含量测定方法操作, 计算回收率, 结果见表 1。

表1 加样回收试验结果

样品	称样量 (g)	样中芦丁量 (mg)	加入芦丁量 (mg)	测出芦丁量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.5850	0.66	1.02	1.71	102.9		
2	0.5740	0.65	1.02	1.66	99.0		
3	0.5208	0.59	1.02	1.57	96.1	98.8	2.63
4	0.5149	0.58	1.02	1.59	99.0		
5	0.5728	0.65	1.02	1.64	97.1		

**2.2.9 样品含量测定** 取样品 3 批照供试品溶液制备要求, 制备供试品溶液, 按含量测定方法操作, 计算芦丁含量, 结果见表 2。

表2 样品测定结果 (n=3)

批号	含量 (%)	RSD (%)
020301	0.126	1.55
020302	0.123	1.47
020303	0.123	1.51

### 3 总结与讨论

**3.1 槐角痔疮膏系水包油型软膏**, 因大量基质和乳化剂的干扰, 药效成分的提出分离困难, 质量标准研究方面可供借鉴的资料很少。在供试品制备方法实验中, 曾试验过 7 种不同的提取方法, 最后选定乙醇超声, 硅藻土拌合, 石油醚超声脱脂, 甲醇超声提取的方法, 并进行了下列考察。

(1) 石油醚脱脂次数的考察 样品经乙醇超声破乳提取后, 用硅藻土拌合蒸干, 分别用石油醚 50mL 超声脱脂 1 次和 2 次, 制备供试品。用芦丁作对照品, 分别将对照品和样品点于同一聚酰胺薄膜上, 以 70% 乙醇为展开剂, 展开, 喷三氯化铝试剂, 在紫外光灯 (365nm) 下检视, 脱脂 1 次与 2 次的样品中芦丁斑点的大小、颜色相同, 证明用石油醚脱脂 1 次即可。

(2) 甲醇提取方法的考察 石油醚脱脂后的样品分别用甲醇 50mL 超声提取和索氏提取器提取, 提取液过滤、定容, 用上述聚酰胺薄层法试验, 证明两种提取方法中的芦丁斑点大小、颜色相同, 超声提取法操作简便, 故选择超声提取法。

(3) 甲醇超声时间的考察 石油醚脱脂后的样品分别用甲醇 50mL 超声 20min 和 30min, 提取液滤过, 定容至 50mL, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 $\mu$ L) 滤过, 取续滤液, 用高效液相色谱法测定, 二者峰面积相近, 说明, 甲醇超声提取 20min 即可。

3.2 HPLC 方法学研究中, 流动相选择曾试用过甲醇水、乙腈水系统的多种比例, 均不能在该制剂中有效分离芦丁。经反复筛选确定四氢呋喃-水-冰醋酸(25.5: 73: 1.5) 为流动相, 使槐角痔疮膏中的芦丁得到了成功分离, 并且保留时间在 10min 之内。

#### [参考文献]

- [1] 王爱月, 傅乃华, 程瑞生. 紫外分光光度法测定槐角丸中总黄酮含量[J]. 河北中医, 1994, 16(2): 31.