

虎杖中大黄素含量的测定

王京霞¹, 许家鸾¹, 朱新颜²

(1 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006;

2 杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司, 浙江 杭州 310012)

摘要:目的: 建立高效液相色谱法测定虎杖中大黄素方法。方法: 采用 HP1100 高效液相色谱仪(包括 G1314A 可变波长紫外检测器, HP 化学工作站, G1322A 真空脱气机, HP1100 四元泵), Hypersil ODS 柱(4.6mm × 250mm, 5 μ m)。流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15), 紫外检测波长: 254nm, 流速: 1.0mL/min, 进样量 20 μ L。结果: 大黄素在 0.02 μ g~0.4 μ g 范围内呈现良好的线性关系, 大黄素回收率为 98.46% ($n=5$), RSD 为 1.34%。结论: 该法简单、准确、具有专属性, 可用于测定虎杖中大黄素的含量。

关键词: 虎杖; 大黄素; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)03-0017-02

虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根。具有祛风利湿, 散瘀定痛, 止咳化痰的功效。用于关节痹痛, 湿热黄疸, 经闭, 症瘕, 水火烫伤, 跌扑损伤, 痈肿疮毒, 咳嗽痰多。《中国药典》2000 年版一部对虎杖进行了薄层色谱鉴别, 但无含量测定方法, 为了更好地控制虎杖的质量, 我们运用反相 HPLC 法测定了虎杖中大黄素含量, 结果表明方法专属性强, 重现性好, 可以作为其质量控制标准。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(Anglient, Company)包括 G1322A 真空脱气机, G1311A 四元泵, G1314A 紫外检测器, HP 化学工作站。超声波清洗器(上海昆山仪器公司), HHS21-2B 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂)。滤膜: 0.45 μ m, ϕ 25mm(上海兴亚净化材料厂)。

大黄素对照品购自中国药品生物制品检定所(批号: 0756-200110), 甲醇为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司), 氯仿、无水硫酸钠为分析纯, 硫酸为化学纯, 磷酸为优级纯(浙江新安化工集团股份有限公司)。水为自制双重蒸馏水。虎杖原药材来自我院中药房, 经我院主任中药师徐锡山鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS(4.6mm × 250mm, 5 μ m), 紫外检测波长: 254nm, 流速: 1.0mL/min, 进样量 20 μ L。流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15)。理论板数按大黄素峰计算不低于 1500。

2.2 对照品液制备及标准曲线方程建立 精密称取大黄素对照品 5mg, 置 50mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取大黄素溶液适量, 加甲醇配成每毫升含大黄素 1 μ g、2 μ g、4 μ g、8 μ g、10 μ g、20 μ g 的 6 种标准对照液, 分别用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 备用。取此 6 种对照品液各进样 20 μ L, 按 2.1 色谱条件进行测定, 以进样量(μ g)为横坐标 X , 峰面积积分值为纵坐标 Y 得标准曲线方程: 大黄素: $Y=56.7768+2605.39X$ ($r=0.9998$) (线性范围为 0.02 μ g~0.4 μ g)

2.3 供试品溶液制备 取本品粉末(过四号筛)约 0.5g[同时另取本品粉末测水分]精密称定, 置 50mL 锥形瓶中, 精密加甲醇 25mL, 称定重量, 加热回流 30min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5mL 置 50mL 圆底烧瓶中, 挥去甲醇, 加 2.5mol/L 硫酸液 10mL, 超声处理 5min, 再加氯仿 10mL, 加热回流 1h, 冷却。移置分液漏斗中, 用少量氯仿洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取氯仿层。酸液用氯仿提取 2 次, 每次约 8mL, 合并氯仿液, 以无水硫酸钠脱水, 氯仿液移至 100mL 锥形瓶中, 挥去氯仿。残渣精密加甲醇 10mL, 称定重量, 置水浴中微热溶解, 放冷后, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品液。

收稿日期: 2004-05-27

通讯作者: 王京霞, Tel: (0571) 87071669, 87071670, E-mail: zhongyaozj@hotmail.com

取供试品液 20 μ L, 注入液相色谱仪测定, 即得。

2.4 方法的精密度 分别取每毫升含 20 μ g, 10 μ g, 4 μ g 的大黄素对照品液, 按 2.1 色谱条件进行测定各溶液含量, 日内测 5 次, 连续测 3 天, 计算日内、日间精密度。结果见表 1。

表 1 方法精密度试验 (%)

浓度(μ g/mL)	日内精密度(RSD)	日间精密度(RSD)
20	1.47	1.99
10	1.62	2.01
4	1.59	1.89

2.5 回收率试验 取已知样品 5 份, 分别加入大黄素对照品液, 按供试品制备方法制备各样品测定, 计算对照品回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果

样品序号	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	1.335	1.311	98.2		
2	1.445	1.413	97.8		
3	1.725	1.711	99.2	98.46	1.34
4	1.890	1.896	100.3		
5	2.315	2.241	96.8		

2.6 色谱峰 在 2.1 色谱条件下, 分别取样品液, 对照品液各 20 μ L 进样, 结果见图 1。

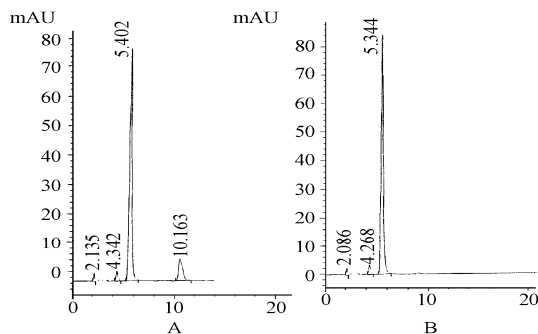


图 1 虎杖中大黄素液相色谱图

A. 供试品 B. 对照品 1. 大黄素

2.7 样品测定 取虎杖原药材 6 批(均来自我院中药房, 批号分别为: 20020403, 20020709, 20021021, 20030118, 20030912, 20031220) 进行测定, 结果见表 3。

表 3 样品测定结果

药材购进日期	药材来源	药材批号	大黄素含量 (μ g/mg)
2002.4.22	浙江临安	20020403	0.7090
2002.7.21	浙江临安	20020709	0.6475
2002.12.3	浙江临安	20021021	0.7125
2003.2.15	浙江临安	20030118	0.6698
2003.10.8	浙江临安	20030912	0.6215
2004.1.15	浙江临安	20031220	0.6354

3 讨论

3.1 用高效液相色谱法测定, 虎杖样品色谱图中出现二个主峰, 一个为大黄素, 保留时间为 5.402min 左右, 另一个在 10.163min 左右。在选择流动相时, 曾考察了甲醇-0.1% 磷酸液 (85: 15) 及甲醇-0.2% 磷酸液 (85: 15), 结果表明用甲醇-0.1% 磷酸液 (85: 15) 作为流动相分离度较好。所以选择甲醇-0.1% 磷酸液 (85: 15) 作为流动相。

3.2 样品提取过程中, 萃取溶媒曾选用了氯仿和乙醚, 乙醚在酸水的上层, 给多次萃取带来操作上的不便, 使用氯仿则无此缺点。

3.3 虎杖中大黄素运用《中国药典》2000 年版一部大黄项下含量测定方法进行测定, 结果表明该方法可使虎杖中大黄素有较好分离度, 可缩短分析时间。所以选择药典方法进行测定。6 批原药材中大黄素最低含量为 0.6215 μ g/mg, 可以作为原药材控制指标。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000. 18.
- [2] 赵陆华. 高效液相色谱法分析中药成分手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 376.
- [3] 郑俊华, 史录文. 大黄中 40 种有效成分的 HPLC 液相色谱法测定[J]. 北京医科大学学报增刊, 1993, 25(5): 15-20.
- [4] 蒋平, 王文清, 王晨. 高效液相色谱法测定生发颗粒中大黄素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(65): 114.