

高效液相色谱法测定如意金黄散 中大黄素、大黄酚的含量

胡淑萍¹, 周新禧², 欧阳荣²

(1. 湖南省计划生育药具物资站, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医学院第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

摘要: 采用高效液相色谱法研究如意金黄散的定量分析方法。结果: 大黄素的线性范围为 21.12~105.6ng ($r=0.9998, n=5$), 平均回收率为 98.49%; 大黄酚的线性范围为 29.28~146.4ng ($r=0.9998, n=5$), 平均回收率为 98.18%。结论: 方法简便、灵敏、准确, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 如意金黄散; 大黄素; 大黄酚; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2003)02-0019-02

如意金黄散由姜黄、大黄、黄柏等 10 味药物组成, 具有消肿止痛的功能。为《中国药典》2000 年版收载品种。其质量标准性状、鉴别及检查, 无含量测定。鉴于目前药品检验要求, 应制定内在质量定量检验标准。

本方君药大黄中的大黄素、大黄酚为其主要活性成分。根据《中国药典》2000 年版大黄药材含量测定方法, 本文拟定出适宜于如意金黄散中大黄素、大黄酚的含量测定方法。其测试快速、准确, 重现性好, 且阴性试验无干扰。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: Agilent1100 系列四元梯度泵、Agilent1100 手动进样器、Agilent1100 系统二极管阵列检测器、Agilent1100 工作站(Agilent 公司); 超声波清洗器、万分之一电子分析天平(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯, 上海陆都化学试剂厂, 20010618), 其余所用试剂均为分析纯。

大黄素(中国药品生物制品检定所, 0726-9908); 大黄酚(中国药品生物制品检定所, 0726-9906); 梔子苷(中国药品生物制品检定所, 0749-9906); 绿原酸(中国药品生物制品检定所, 0753-9910)

如意金黄散(本院自制, 000504; 011022; 020222; 020526)

2 大黄素、大黄酚的含量测定

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS C₁₈ 5μm φ4.6 × 100mm; 流动相: 甲醇-磷酸盐缓冲液(75: 25), 检测波长: 254nm; 柱温: 45℃; 流速: 1.0ml/min; 理论塔板数以大黄素计不低于 3000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取大黄素对照品 2.64mg、大黄酚对照品 9.15mg, 分别置 50ml 量瓶中, 加甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀; 分别精密量取大黄素溶液 5ml、大黄酚溶液 2ml, 置 25ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3 线性范围的考察 精密吸取上述对照品溶液 2.4、6.8、10μl, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品峰面积为纵座标, 进样量为横坐标进行线性回归, 结果表明大黄素在 21.12~105.6ng 范围内呈线性关系, 回归方程为 $Y = 2.7402X + 0.467245$, $r = 0.9998$; 大黄酚在 29.28~146.4ng 范围内呈线性关系, 回归方程为 $Y = 3.96985X + 1.39255$, $r = 0.9998$ 。HPLC 图谱见图 1。

2.4 供试品溶液的制备 取如意金黄散 0.8g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 加甲醇约 15ml, 超声提取 30min, 分取甲醇溶液, 残渣再加甲醇 15ml, 反复处理 3 次, 合并提取液, 并定容于 50ml 量瓶中, 作为供试品溶液。

2.5 空白试验 取不含大黄的阴性制剂, 按 2.4 项下方法制得阴性试液, 以上述色谱条件测定。结果阴性供试液与大黄素、大黄酚相同保留时间处, 无色谱峰出现。

2.6 精密度试验 取同一浓度的大黄素、大黄酚对照品溶液, 在上述色谱条件下测定, 连续进样 5 次, 测定大黄素、大黄酚峰面积值, 大黄素 $RSD = 1.16\%$, $n = 5$; 大黄酚 $RSD = 1.23\%$, $n = 5$ 。结果表明精密度良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 放置 24h 后, 测定峰面积, 结果表明, 供试液在 24h 内所测得的结果基本一致。

2.8 重复性试验 取批号 020222 的样品 5 份, 分别按 2.4 项下方法制得供试液, 以上述色谱条件测定大黄素、大黄酚含量, 大黄素平均含量为 0.5655μg/g, RSD 为 0.37% ($n = 5$); 大黄酚平均含量为 0.5759μg/g, RSD 为 0.45% ($n = 5$); 表明方法重现性良好。

2.9 加样回收试验 取已知含量的 020526 供试品一定量, 精密称定, 各精密加入一定浓度的对照品溶液(取大黄素 2.01mg、大黄酚 2.32mg, 置 10ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至 10ml) 1ml, 分别按 2.4 项下方法制得供试液, 以上述色谱条件测定大黄素、大黄酚含量, 大黄素平均回收率为 98.49%, RSD 为 1.82%; 大黄酚平均回收率为 98.18%, RSD 为 1.37%, 结果见表 1、表 2。

2.10 样品的测定 取不同批号的如意金黄散样品, 精密称定, 分别按 2.4 项下方法制得供试液, 取 5μl 进样, 以标准曲线计算含量, 测定结果见表 3。

表 1 大黄素的回收率试验结果($n = 5$)

样品编号	样品(g)	样品中含大黄素量(mg)	加入大黄的量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)
1	0.5510	0.2434		0.4386	97.11
2	0.3407	0.1505	0.2010	0.3482	98.36
3	0.4123	0.1812		0.3822	100.0

表 2 大黄酚的回收率试验结果($n = 5$)

样品编号	样品(g)	样品中含大黄酚量(mg)	加入大黄的量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)
1	0.5510	0.4448		0.6725	98.15
2	0.3407	0.275	0.2320	0.5062	99.22
3	0.4123	0.3329		0.5583	97.16

表 3 如意金黄散中大黄素及大黄酚测定结果($n = 5$)

批号	大黄素含量(mg/g)	RSD(%)	大黄酚含量(mg/g)	RSD(%)
000504	0.7384	1.22	0.8868	0.82
011022	0.5763	1.25	0.8001	2.05
020222	0.5655	0.37	0.5759	0.45
020526	0.4814	1.41	0.8798	1.49

3 讨论

3.1 关于供试品溶液的制备方法, 笔者曾按《中国药典》2000 年版大黄药材含量测定方法进行考察, 操作步骤烦琐, 后将操作方式进行改进实验。

实验一、《药典》甲醇回流提取法及甲醇定量法; 实验二、少量多次甲醇超声提取法及甲醇定容法; 实验三、一次加入足量甲醇超声提取 1h 及甲醇定容法。3 种方法对比实验, 五次试验测定结果表明: 实验二效果最好。超声提取 3 次后的提取液经薄层色谱检识, 未见大黄素、大黄酚斑点。表明超声提取 3 次后即可提取完全。故正文采用超声提取法与甲醇定容法。

3.2 本文高效液相色谱法测定如意金黄散中大黄素、大黄酚的含量方法, 色谱条件柱效高, 分离度大, 图谱清晰, 无干扰, 专属性强, 结果准确, 供试液配制简单, 可作为该药品的内在质量控制方法, 建议下版《中国药典》收载如意金黄散品种时, 请制定其定量检测标准。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 18, 附录 37.
 [2] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 57.
 [3] 封士兰, 陈立仁, 赵富虎, 等. 高效液相色谱法测定大黄降脂粉中大黄酸、大黄素、丹参酮 II_A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 368-370.