

高效液相色谱法测定益肾胶囊中大黄素、大黄酚的含量

★ 郑耀东 (广东省汕头市皮肤性病防治院 汕头 515000)

关键词:益肾胶囊;大黄素、大黄酚;HPLC 法

中图分类号:R 284.1 文献标识码:A

益肾胶囊由大黄、丹参、当归、苍术等药物组成,具有健脾益气利水、活血化瘀消肿、逐瘀清热解毒、泄浊的功效。为控制本品的内在质量,采用高效液相色谱法对其中所含大黄素与大黄酚进行了含量测定。

mL5 份,置于 50 mL 容量瓶中,分别精密加入对照品贮备液 10 mL,按供试液制备法处理样品,依测定法测定,测得平均回收率为 99.4%, $RSD = 1.76\%$ ($n = 5$)。

3.9 样品含量测定 取 3 批样品,按上述方法测定,结果见表 1。

表 1 样品测定结果

批号	淫羊藿苷含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
0212019	0.268
0212020	0.280
0212021	0.273

4 讨论

(1)中药复方制剂由于成分复杂多样,如何充分提取有效成分而排除其它成分的干扰一直是样品前处理的难点,传统的液液萃取方法存在许多弊端,如有机溶剂用量大、操作繁琐提取不完全等等,而固相萃取法这一新型技术则体现出更大的优越性,它可将样品中强保留物质除去,延长色谱柱的寿命,不破坏不损失待测成分,使检测更准确。

(2)江西汇仁药业制定的药典业发标准中淫羊藿苷含量测定需经反复多次萃取、上柱洗脱、蒸干溶剂,前处理十分费时费力,在操作过程中损失有效成分难以避免。本法操作简单,不引入损失待测成分的步骤,故测得含量结果远远高于药典业发标准(不少于 0.08 mg/mL),含量更准确。

(3)SPE 柱对于淫羊藿苷的吸附的考察:精密吸

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,DAD 检测器,四元梯度泵,G2170AA 数据处理系统。

1.2 试药 甲醇为色谱纯试剂(一级),水为双蒸水,其它试剂均为分析纯。大黄素、大黄酚对照品

取本品 10 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 30% 乙腈溶解稀释至刻度,摇匀。将上述溶液以 1 滴/2s 流速缓缓注入微柱中,分别收集第 1 mL、第 2 mL 至第 12 mL 的滤出液,在上述色谱条件下,对淫羊藿苷的含量进行测定,从峰面积与滤出液的体积的关系可以看出前 3 mL 淫羊藿苷全部被吸附,以后吸附量在逐步增加,由于最初 3 mL 样品中的淫羊藿苷全部被吸附,故可以采用极性更低的洗脱剂将其充分洗脱再用于定量的方法,经多次的试验,结果表明采用 45% 的乙腈 5 mL 可以将吸附的淫羊藿苷完全洗脱,而采用更高浓度的乙腈虽然可以完全洗脱但峰形差。

(4)对淫羊藿苷对照品及供试品溶液的色谱峰进行停泵扫描,其紫外吸收光谱基本一致,表明该峰为纯净峰。

(5)采用 SPE 柱进行前处理比用有机溶剂如乙酸乙酯萃取^[3]得到的色谱峰峰形要好,且柱效要高。

参考文献

- [1]叶丽卡,陈济民.淫羊藿的药理研究进展[J].中国中药杂志,2001,26(5):293
- [2]彭新生,虞金宝,宋友昕.可见光 TLCS 法测定肾宝合剂中淫羊藿苷含量[J].中成药,2002,24(8):630
- [3]赵陆华,刘艳华,张同.肾宝合剂中淫羊藿苷含量测定方法的改进[J].中国药科大学学报,2001,22(5):378

(收稿日期:2004-05-21)

(由中国药品生物制品检定所提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: LiChrospher R 100 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 高氯酸 (85:15); 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35 ℃。

2.2 对照品溶液及供试品溶液的制备 精密称取大黄素、大黄酚对照品各约 5 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 分别精密量取大黄素 1 mL、大黄酚 2 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 (大黄素 5.04 μg/mL; 人黄酚 8.64 μg/mL)。

取本品 1 粒, 倾出内容物, 研细, 精密称取 0.25 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 30 分钟, 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 5 mL, 置 50 mL 圆底烧瓶中, 挥去甲醇, 加 2.5 mol/L 硫酸溶液 10 mL, 超声处理 5 分钟, 再加氯仿 10 mL, 加热回流 1 小时, 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 8 mL, 合并氯仿液, 以无水硫酸钠脱水, 氯仿液移置 100 mL 锥形瓶中, 挥去氯仿, 残渣精密加甲醇 10 mL, 称定重量, 置水浴中微热溶解残渣, 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, 即得。

2.3 线性范围的考察 精密吸取对照品溶液 (大黄素 5.04 μg/mL, 大黄酚 8.64 μg/mL) 4、8、12、16、20 μL 进行色谱测定, 按上述色谱条件测定峰面积, 并以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行回归, 得标准曲线。

大黄素: $Y = 3.092\ 859\ 77X + 2.589\ 711$, $r = 0.999\ 86$ 。

大黄酚: $Y = 4.348\ 718\ 62X + 2.085\ 180\ 1$, $r = 0.999\ 96$ 。

表明大黄素在 20.16~100.80 ng 范围内呈线性关系, 大黄酚在 34.56~172.80 ng 范围内呈线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液各 20 μL, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 其相对标准偏差 RSD 均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 10 μL, 按上述色谱条件测定 5 次, 每次间隔 2 小时, 结果表明 8 小时内稳定。

2.6 重复性试验 按拟定的含量测定方法, 对同一批样品 (批号: 010402) 分别制备 5 份供试液, 分别测

定大黄素、大黄酚的含量, 结果 5 份含量 RSD 均小于 2%。

2.7 回收率试验 取已知含量的样品 (批号 010402), 分别精密加入一定量的大黄素、大黄酚对照品, 按供试品制备与测定方法, 在上述色谱条件, 平行做 6 组, 结果见表 1、2。

表 1 大黄素回收率测定结果

序号	样品中大黄素的量/mg	加入大黄素的量/mg	测出大黄素的量/mg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.255	0.125	0.376	97.32	98.91	1.84
2	0.255	0.125	0.375	96.58		
3	0.255	0.250	0.501	98.49		
4	0.255	0.250	0.503	99.23		
5	0.255	0.375	0.632	100.64		
6	0.255	0.375	0.634	101.22		

表 2 大黄酚回收率测定结果

序号	样品中大黄酚的量/mg	加入大黄酚的量/mg	测出大黄酚的量/mg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.547	0.250	0.787	96.15	98.58	1.52
2	0.547	0.250	0.791	97.83		
3	0.547	0.500	1.044	99.49		
4	0.547	0.500	1.038	98.13		
5	0.547	0.750	1.296	99.89		
6	0.547	0.750	1.297	100.01		

2.7 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与样品供试液各 10 μL, 按上述色谱条件测定, 结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 (n=2)

批号	大黄素含量 (%)	大黄酚含量 (%)	总量 (%)	RSD (%)
010402	0.102 0	0.437 7	0.539 7	1.21
010403	0.105 5	0.450 6	0.556 1	1.46
010404	0.120 5	0.469 4	0.591 3	1.17
010505	0.104 6	0.426 4	0.531 0	1.08
010506	0.096 2	0.413 4	0.509 6	1.64
010508	0.110 8	0.437 7	0.548 5	1.51

根据上述测定结果, 考虑到药材的来源, 以及制剂生产、贮藏等因素, 结合实际生产, 暂定本品含大黄素 (C₁₅H₁₀O₅) 和大黄酚 (C₁₅H₁₀O₄) 的总量不得少于 2.5 mg/粒。

3 小结

本品为一多种中药配制而成的中药复方制剂, 成分较为复杂, 方中大黄为君药, 采用高效液相色谱法测定方中大黄所含大黄素、大黄酚的含量, 结果表明方法简单、灵敏度高, 重现性好, 结果准确, 可用于本制剂的质量控制。

参考文献

- [1] 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] 赵国华. 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. 443

(收稿日期: 2004-02-09)