

RP-HPLC 法测定小儿化毒微丸中大黄素、大黄酚含量

★ 林列 陶冶 (江中药业股份有限公司 南昌 330006)

关键词: 小儿化毒微丸; 大黄; 大黄素; 大黄酚; 高效液相色谱法

中图分类号: TQ 460.6 文献标识码: A

小儿化毒微丸由牛黄、珍珠、雄黄、大黄等十二味药组成,具有清热解毒、活血化瘀的功能,用于小儿疹后余毒未尽,烦躁,口渴,口疮,便秘,疳肿溃烂等症^[1]。原方为散剂,现剂改为微丸,克服了原剂型的服用剂量不准确、使用不方便及原质量标准中无定量指标等缺点。采用 HPLC 法对小儿化毒微丸中的大黄进行了含量测定研究,经方法学考察,所用方法操作简便,专属性和重现性良好,可作为质控标准。

1 仪器与试剂

至恒重的咖啡酸对照品 16.92 mg 置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并至刻度,摇匀,精密量取 1、1、1、2、1 mL 分别置 100、50、25、25、10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 5 种不同浓度的对照品溶液,分别进样 20 μ L,测定其峰面积,以咖啡酸的量为横坐标,2 次测定峰面积的均值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程为 $Y = 4.14 \times 10^6 X - 6.06 \times 10^4$, $r = 0.9996$,实验结果表明,咖啡酸的量在 0.135 4~1.354 μ g 范围内与所测得的相应的峰面积呈良好的线性关系。

3.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μ L 进样,重复进样 5 次,按上述色谱条件测定峰面积,分别为 957190,957448,958213,972313,956925, RSD 为 0.7%。

3.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,按上述色谱条件,每隔 1 小时进样 1 次,共进样 5 次, RSD 为 0.6%。

3.9 重复性试验 取同一批号样品,按含量测定项下方法操作,平行试验 5 次,测得咖啡酸含量 RSD 为 1.3%。

3.8 回收率试验 采用加样回收法,精密称取已知含量的样品 6 份,分别精密添加一定量的咖啡酸对照品,按 3.3 方法制成供试品溶液,各取 20 μ L 进样,测定各自咖啡酸含量,结果平均加样回收率

1.1 仪器

岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪(岛津公司);N2000 色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所);TY4010 超纯水机(南昌桃源水处理设备厂);超声波清洗器 SB2200(上海必能信超声有限公司,功率:80 W、频率:50 kHz);METTLER-TOLEDD ABS-265-S 型电子天平(瑞士)。

1.2 药品与试剂

大黄素对照品(0756-9908)、大黄酚对照品(110796-200311),均由中国药品生物制品检定所

99.7%, RSD = 0.8%。

3.9 样品测定 取样品 3 批,按上述色谱条件和办法测定咖啡酸的含量,测定结果见表 1。

表 1 复方公英片含量测定结果

批号	咖啡酸含量/ $\text{mg} \cdot \text{粒}^{-1}$	RSD(%)
20040108	0.036 77	1.5
20040201	0.032 10	1.1
20040406	0.031 42	2.0

4 讨论

本法参考了《中国药典》2000 年版一部第 289 页蒲公英的含量测定方法,在供试品溶液的制备中,考虑到复方制剂与单味药材在成分上的差异,为了减少本品处方中其它药材所含成分对其咖啡酸含量测定的干扰,我们在原方法的基础上增加了醋酸乙酯提取的步骤。

参考文献

- [1]肖培根.新编中药志[M].第三卷.北京:化学工业出版社,2002.363
- [2]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,2000.289~290
- [3]苗明三,李正国.现代实用中药质量控制技术[M].北京:人民卫生出版社,2000.1 048~1 051
- [4]凌云.中药蒲公英的质量标准研究[J].中草药,1999,30(12):897

(收稿日期:2006-04-17)

提供;小儿化毒微丸(批号:20050426、20050527、20050621)及其阴性对照样品均由江西中医学院药剂学科组提供;甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil C₁₈ ODS 柱(5 μm, 4.6 mm×200 mm)。流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(77:13);检测波长:254 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹。柱温:室温。理论塔板数按大黄素峰计算,应不低于2 000。

2.2 对照品、供试品、阴性对照溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取在60℃减压干燥24小时的大黄素对照品5.12 mg、大黄酚对照品5.08 mg,分别置50 mL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1 mL、大黄酚溶液2 mL,分别置25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(大黄素每1 mL中含4.10 μg、大黄酚每1 mL中含8.13 μg)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取重量差异项下的本品5g,研细,混匀,取约0.12 g,称定重量,精密加入25 mL的甲醇,称定重量,静置2小时,超声处理(功率250 W、频率50 kHz)30分钟,放冷,称定重量,用甲醇补足减失的重量,滤过,精密量取续滤液5 mL,置50 mL圆底烧瓶中,水浴上挥干甲醇,加2.5 mol·L⁻¹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,用无水硫酸钠脱水,氯仿液移至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。

2.2.3 缺大黄阴性对照样品溶液的制备 取缺大黄阴性对照样品0.15 g,照“2.2.2 供试品溶液的制备”项下的方法同法制成缺大黄阴性对照样品溶液。

2.3 检测波长的确定

参考《中国药典》2005年版一部大黄项下含量测定方法,选择本制剂中的检测波长为254 nm。

2.4 线性关系考察

2.4.1 大黄素的线性关系 精密量取大黄素对照品溶液(380 μg·mL⁻¹) 1、2、4、6、8、10 mL,分别置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μL,注入液相色谱仪,测定,以浓度(μg·mL⁻¹)对峰面积进行线性回归,得回归方程: $Y =$

$3.03 \times 10^3 X - 3.80$, $r = 0.999 3$,表明大黄素在0.38~3.80 μg范围内有良好的线性关系。

2.4.2 大黄酚的线性关系 精密量取大黄酚对照品溶液(580 μg·mL⁻¹) 1、2、4、6、8、10 mL,分别置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μL,注入液相色谱仪,测定,以浓度(μg·mL⁻¹)对峰面积进行线性回归,得回归方程: $Y = 6.04 \times 10^3 X - 5.18$, $r = 0.999 6$,表明大黄酚在0.58~5.80 μg范围内有良好的线性关系。

2.5 稳定性试验

精密吸取供试品溶液20 μL,分别于0、2、4、8、24小时进样,测定大黄素和大黄酚的总峰面积,结果表明供试品溶液的稳定性良好,在24小时以内测定总峰面积结果稳定, $RSD = 0.94\%$ ($n = 5$)。

2.6 重复性试验

对同一批(20050426)样品,分别取6份,照上述方法试验,结果表明:样品中大黄素含量平均为0.217 mg/袋, $RSD = 1.03\%$;大黄酚平均0.276 g/袋, $RSD = 1.02\%$ 。

2.7 回收率试验

采用加样回收法:分别精密称取同一批号(20050426)已知含量的样品共9份,各精密加入大黄素对照品和大黄酚对照品适量,照上述方法进行试验,结果表明,大黄素的平均回收率为98.05%, $RSD = 0.68\%$;大黄酚的平均回收率为97.59%, $RSD = 1.13\%$ 。

2.8 样品的含量测定

照上述大黄的含量测定方法对3批小儿化毒微丸进行含量测定,结果见表1,平均大黄素和大黄酚的总含量为0.477 mg/袋。

表1 3批样品的含量测定结果

样品批号	大黄素量 /mg·袋 ⁻¹	大黄酚量 /mg·袋 ⁻¹	总量 /mg·袋 ⁻¹	RSD($n=3$) (%)
20050426	0.218	0.278	0.496	1.04
20050527	0.196	0.255	0.451	1.78
20050621	0.204	0.279	0.483	1.31

3 讨论

现行中国药典中规定大黄的HPLC测定的流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15)^[1],但经试验分离效果不理想,现改用甲醇-0.1%磷酸溶液(77:13),分离效果较好,可能是本品是复方的原因。

参考文献

[1]国家药典委员会编.中华人民共和国药典2005年版一部[S].北京:化学工业出版社,2005.366,17

(收稿日期:2006-10-08)