

℃;载气为高纯氮气,流速:1 mL/min;进样量为 1 μL;分流比 40:1;理论板数按丁香酚峰计算不低于 50 000。

按上述色谱条件,分别取供试品溶液、混合对照品溶液、阴性对照溶液 1 μL 进样测定,采用相对保留值法进行色谱峰的指认。从结果可以看出,各指标峰之间分离良好,供试品溶液相对保留时间与对照品溶液相对保留时间出现相应特征峰,阴性对照无干扰。色谱图见图 4~图 6。

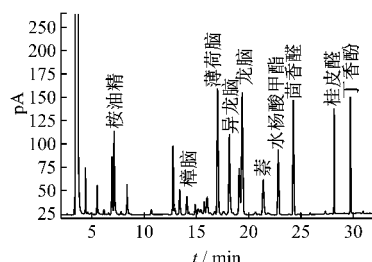


图 4 供试品溶液色谱图

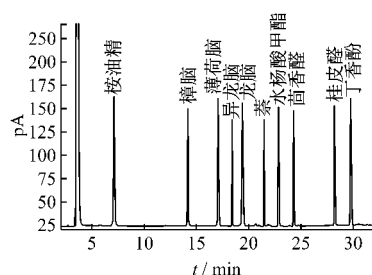


图 5 混合对照品溶液色谱图

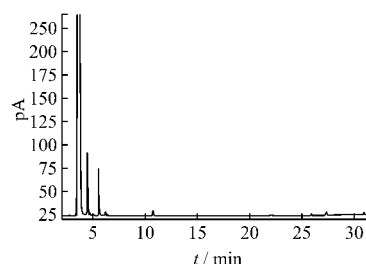


图 6 阴性对照溶液色谱图

而跌打止痛巴布剂所采用超临界二氧化碳萃取技术主要是针对极性较小成分进行萃取,薄层色谱图中虽未发现大黄酚以外大黄成分,但鉴别结果并无干扰,且试验结果与采用《中国药典》大黄鉴别方法所得结果一致,因此采用上述方法鉴别方中大黄成分还是可行的。

3.2 在挥发性成分气相色谱鉴别过程中,供试品溶液制备曾采用甲醇冷浸法提取,提取液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后直接作为供试品溶液。但这种浸提方法所得供试液体积大,杂质成分多,巴布剂基质中甘油也被一并提出,影响色谱柱寿命,给气相分离带来很大困难,故未予采用。

3.3 内标物的选择,曾尝试用正十六烷、环己酮作内标,由于色谱峰分离效果和保留时间差异等原因未予采用。

本研究不仅在同一气相色谱条件下鉴别出跌打止痛巴布剂中多个挥发性成分,更重要是为外用膏贴剂中挥发性成分含量测定提供合适的内标物和方法学的参考。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005:附录 57.
- [2] 孟舒,陈再兴,姜泓,等. 玄丹巴布剂质量标准研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2007,24(5):394-396.

3 讨论

3.1 按 2005 版《中国药典》收载大黄药材薄层鉴别项目,365 nm 紫外光下应检视到五个暗红色斑点,按 R_f 值从小到大依次为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚。

对藏药四味雪莲花颗粒中含量测定方法的改进

张秀峰

(青海省药品检验所,青海 西宁 810000)

关键词:四味雪莲花颗粒;大黄素;大黄酚;RP-HPLC

摘要:目的:建立四味雪莲花颗粒中大黄素、大黄酚的含量测定方法。方法:采用 RP-HPLC 法,用 Hypersil-ODS C_{18} (250 mm×4.6 mm,5 μm) 色谱柱,以甲醇-0.1% 磷酸溶液(80:20) 为流动相,检测波长:254 nm,流速:1 mL/min。结果:在此色谱试验条件下,大黄素进样量在 0.003 176~0.031 76 μg 范围内与峰面积呈线性关系,平均加样回收率为 98.1%,RSD=2.1% ($n=9$)。大黄酚进样量在 0.004 41~0.044 1 μg 范围内与峰面积呈线性关系。平均加样回收率为 98.9%,RSD=2.3% ($n=9$)。结论:方法简单,准确,灵敏,能有效控制四味雪莲花颗粒的质量。

中图分类号:R927.2

文献标识码:B

文章编号:1001-1528(2010)12-2188-03

收稿日期:2010-03-30

作者简介:张秀峰(1957-),女,药师,研究方向:药物分析。Tel:13997385256 E-mail:344671295@qq.com

四味雪莲花颗粒收载于《国家中成药标准汇编》(中成药地方标准上升国家标准部分)内科心系成分册^[1]。由红景天、雪莲花、大黄、蕲麻四味藏族传统用药组成。藏医用于三大因素平衡紊乱, 隆, 培根功能失调, 气血上升, 血瘀痰阻所致的高脂血症^[1]。原标准中含量测定为高效液相色谱法测定大黄素含量, 本实验用高效液相色谱法同时测定大黄素、大黄酚的总量。此法简便、稳定、重现性好, 能够更好的控制四味雪莲花颗粒的质量。

1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪, Agilent G1314 VWD 紫外检测器, HP 化学工作站(美国 Agilent 公司); 电子天平(SartoriusBT224S, 北京赛多利斯仪器公司); 电子天平(SartoriusR200-D, 北京赛多利斯仪器公司); 电子天平(METTLER PB1502-S, 瑞士 METTLER 公司); 超声波清洗器(B2500s-MT, 上海必能信超声波清洗仪有限公司)。

大黄素对照品(110756-200110), 大黄酚对照品(110796-200412)均由中国药品生物制品检定所提供, 为含量测定用。甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为重蒸馏水; 四味雪莲花颗粒样品与阴性药材由青海金诃藏药药业有限责任公司提供, 样品批号分别为: 081101、081102、081103。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: 依利特 Hyper-sil-ODS2 柱(250 mm × 4.6 mm, 粒径 5 μm); 柱温: 室温; 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(80:20); 检测波长: 254 nm; 理论板数按大黄素峰计算, 大于 10 000(应不低于 3 000)。

在上述色谱条件下, 得到四味雪莲花颗粒供试品及大黄素、大黄酚对照品色谱图, 大黄素的保留时间在 8.5 min 左右, 大黄酚的保留时间在 11.3 min 左右。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取大黄素对照品 9.93 mg, 大黄酚对照品 27.55 mg 分别置 250 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 分别精密量取上述大黄素对照品溶液 4 mL, 大黄酚对照品溶液 2 mL 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀即得混合对照品溶液(大黄素对照品溶液浓度为 1.588 μg/mL, 大黄酚对照品溶液浓度为 2.204 μg/mL)。

2.3 供试品溶液制备 取本品装量差异下内容物约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 45 min, 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 10 mL, 置 100 mL 锥形瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸液 10 mL, 超声处理 2 min(50 Hz, 120 W), 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 移至分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次约 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备 按照处方的组成, 取除大黄外

的其余药味, 按制备工艺要求制成不含大黄的制剂, 按供试品溶液制备项下的方法制备阴性对照溶液。在上述色谱条件下, 精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 分别注入液相色谱仪。供试品色谱图中, 在与大黄素、大黄酚对照品色谱图相应保留时间上, 分别有相同的色谱峰, 而阴性对照在此无干扰。

2.5 线性考察 分别精密吸取上述已配制好的大黄素(浓度为 1.588 μg/mL)与大黄酚(浓度为 2.204 μg/mL)对照品混合溶液 2.4、8、12、16、20 μL, 按上述条件分别注入色谱仪测定, 以对照品溶液进样量(μg)为横坐标, 以峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程得: 大黄素 $Y = 6.0811X - 0.1047$, $r = 0.9999$, 大黄素进样量在 0.003176 ~ 0.03176 μg 范围内与峰面积呈线性关系; 大黄酚 $Y = 11.883X - 0.9578$, $r = 0.9999$, 大黄酚进样量在 0.00441 ~ 0.0441 μg 范围内与峰面积呈线性关系。

2.6 精密度考察 精密吸取上述已配制好的大黄素对照溶液(浓度为 1.588 μg/mL), 大黄酚对照溶液(浓度为 2.204 μg/mL), 连续进样 5 次, 每次进样量为 10 μL, 按色谱条件操作进行, 测峰面积, 以峰面积计算大黄素 RSD = 0.3%, 大黄酚 RSD = 0.9%, 结果表明: 大黄素、大黄酚测定方法精密度良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液(批号: 081103), 按上述色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样量 10 μL, 测定峰面积, 结果大黄素 RSD = 3.0%, 大黄酚 RSD = 1.3%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重复性试验 按照上述含量测定方法对相同批号(081103)样品制备 5 份供试液, 分别进样 10 μL, 测定峰面积, 结果大黄素 RSD = 1.6%, 大黄酚 RSD = 1.4%, 说明本方法重现性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取大黄素 2.55 mg, 大黄酚 4.28 mg 置 250 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 配制成每 1 mL 含大黄素为 0.0102 mg, 大黄酚为 0.01710 mg 的混合溶液。取已知含量的四味雪莲花颗粒样品(批号 081103, 大黄素含量为 0.0642 mg/g, 大黄酚含量为 0.1029 mg/g) 0.25 g, 称取 9 份, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入混合对照品溶液 1、1.5、2.5 mL 各 3 份, 按上述供试品溶液的制备方法制备, 按上述色谱条件测定大黄素与大黄酚的含量, 计算回收率。结果平均回收率大黄素为 98.1%, RSD = 2.1%; 大黄酚为 98.9%, RSD = 2.3%。结果表明本方法加样回收较好, 结果见表 1、2。

2.10 样品测定 按上述含量测定方法, 对 3 批样品中所含大黄素、大黄酚的总量进行含量测定, 结果见表 3。

2.11 原方法测定结果与改进后方法测定结果比较 原标准测定结果与改进后的方法测定结果见表 4。

测定结果表明, 原标准中大黄素含量低于万分之一, 改进后测定结果及数据均高于万分之一, 对于制剂质量的控制更有意义。建议将原标准中单测定大黄素含量改进为同时测定大黄素、大黄酚的含量。

表 1 大黄素回收率测定结果

样品称样量 /g	样品中大黄素 含量/mg	加入大黄 素量/mg	测出总 含量/mg	回收率/%	平均回收率 /%	RSD/%
0.253 4	0.016 52	0.010 20	0.026 60	98.81	98.1	2.1
0.255 7	0.016 67	0.010 20	0.026 50	96.36		
0.256 3	0.016 71	0.010 20	0.026 60	96.95		
0.268 9	0.017 53	0.015 30	0.032 70	99.14		
0.276 1	0.018 00	0.015 30	0.033 20	99.33		
0.279 6	0.018 23	0.015 30	0.033 90	102.42		
0.250 2	0.016 31	0.025 50	0.040 80	96.03		
0.245 7	0.016 02	0.025 50	0.040 50	96.00		
0.242 4	0.015 80	0.025 50	0.040 70	97.63		

表 2 大黄酚回收率测定结果

样品称样量 /g	样品中大黄酚 含量/mg	加入大黄 酚量/mg	测出总 含量/mg	回收率/%	平均回收率 /%	RSD/%
0.253 4	0.027 77	0.017 10	0.044 90	100.2	98.9	2.3
0.255 7	0.028 02	0.017 10	0.044 80	98.10		
0.256 3	0.028 09	0.017 10	0.044 90	98.30		
0.268 9	0.029 47	0.025 65	0.055 60	101.9		
0.276 1	0.030 26	0.025 65	0.056 40	101.9		
0.279 6	0.030 64	0.025 65	0.056 50	100.8		
0.240 2	0.026 32	0.042 75	0.067 70	96.78		
0.245 7	0.026 93	0.042 75	0.068 00	96.07		
0.242 4	0.026 57	0.042 75	0.067 80	96.45		

表 3 样品测定结果

批号	含量/(mg/袋)
081103	1.69
081101	1.76
081102	1.74

表 4 2 种测定方法结果比较

批号	原方法	改进后方法		
	大黄素 /(mg/g)	大黄素 /(mg/g)	大黄酚 /(mg/g)	总量 /(mg/g)
081103	0.064	0.065	0.104	0.169
081101	0.061	0.061	0.115	0.176
081102	0.053	0.052	0.122	0.174

3 讨论

3.1 本次试验对大黄素和大黄酚进行紫外全波长扫描,大黄素、大黄酚在 254 nm 和 436 nm 处都有最大吸收,参照 2005 版《中国药典》一部^[1] 大黄药材的含量测定项,选择波

长为 254 nm 进行检测,样品主峰分离度较好,且阴性对照无干扰。

3.2 参照 2005 版《中国药典》^[1] 一部中大黄药材含量测定方法测定四味雪莲花颗粒样品,色谱峰分离度和峰形并不理想,后改用甲醇-0.1% 磷酸溶液(80:20)作为流动相,20 min 内出峰完成,且分离度较好。

3.3 在试验过程中,我们考察了超声 30、45、60、75 min 和回流 30、45、60、75 min 提取样品中大黄素和大黄酚的含量,发现回流的样品含量总体高于超声提取,且 45 min 和 60 min,75 min 大黄素、大黄酚的含量相差不大,所以本研究回流 45 min 作为本次样品的提取方式。

参考文献:

- [1] 国家中成药标准汇编(中成药地方标准上升国家标准部分)内科心系分册 [S]. 2002:156-159.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2005:17-18.