

# HPLC 测定痛风舒片中的大黄素及 大黄酚的含量

刘立轩

(宁夏职业技术学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:**目的 建立 HPLC 测定痛风舒片中大黄素及大黄酚含量的方法。方法 以 HPLC 法测定痛风舒片中大黄素和大黄酚的含量。Phenomenex C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱为固定相, 甲醇-0.05% 磷酸(89:11) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm。结果 线性范围大黄素在 0.04 μg~0.32 μg( $r=0.99990$ )、大黄酚在 0.57 μg~4.52 μg( $r=0.99994$ ), 大黄素平均回收率为 97.1%、大黄酚平均回收率为 97.4%, 两者相对标准偏差分别为大黄素 1.25%、大黄酚 0.83% ( $n=5$ )。结论 该方法灵敏度高、专属性强、重现性好, 可作为痛风舒片质量控制指标。

**关键词:**痛风舒片; 大黄素和大黄酚; 高效液相色谱

**中图分类号:** R 284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-0571(2015)06-0114-03

**DOI:**10.13424/j.cnki.mtcm.2015.06.045

痛风舒片是由君木扎大黄、车前子、泽泻、川牛膝、防己等 5 味中药制成, 具有清热利湿、化痰解毒的功效<sup>[1]</sup>, 临床用于治疗湿热瘀阻所致的痛风等疾病。其中大黄素及大黄酚为君药大黄的主要有效成分, 具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、消炎、镇痛等作用<sup>[2]</sup>, 以其含量为评价指标控制痛风舒片质量是切实可行的。大黄素和大黄酚的含量测定方法报道较多<sup>[3-5]</sup>, 本试验采用 HPLC 法测定大黄素和大黄酚含量, 结果表明方法简便、重复性好, 可作为该制剂质量控制的重要依据。

## 1 仪器与试剂

G1311A 高效液相色谱仪(安捷伦科技(中国)有限公司), BSA124S 全自动电子天平(德国赛多利斯集团(0.1 mg)); 色谱甲醇(东莞市乔科化学有限公司/批号 2014060502), 其余试剂均为分析纯; 大黄素、大黄酚对照品(供含量测定用, 中国药品生物制品检定所提供, 批号分别为 110756-200110、110796-200311), 痛风舒片样品(江西正大药物研究所有限公司提供, 批号 20140523、20140612、20140816)。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取对照品大黄素

8.0 mg、对照品大黄酚 11.3 mg, 均以甲醇溶解, 分别定容于 50 mL 容量瓶中, 配制成大黄素 0.16 mg/mL、大黄酚 0.226 mg/mL 的溶液; 精密量取配制好的大黄素与大黄酚溶液各 1 mL, 移入 10 mL 容量瓶中, 以甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得(含大黄素 16 μg/mL, 含大黄酚 22.6 μg/mL)。

**2.2 供试品溶液的制备** 将痛风舒片样品 20 片粉碎研细, 精密称取约 1.0 g 研细后混合好的粉末放入带塞锥形瓶中, 精密量取甲醇 25 mL 加入锥形瓶中, 盖紧瓶塞, 称重, 回流法加热 45 分钟, 放冷, 再次称重, 减失的重量用甲醇补足, 摇匀, 滤过, 精密移取滤液 3 mL, 加入 50 mL 圆底烧瓶中, 除去甲醇, 加入 2.5 mol/L 硫酸溶液 10 mL, 超声(功率 90 W, 频率 59 KHz)处理 2 分钟, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 小时, 放冷, 冷却液移入分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤圆底烧瓶, 洗液并入分液漏斗中, 振摇, 待分层后取三氯甲烷层, 酸液再用 10 mL 三氯甲烷振摇提取 3 次, 合并三次三氯甲烷提取液, 减压回收至除去溶剂, 加甲醇使残渣溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中以甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.3 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C<sub>18</sub>(250 mm×

4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.05 % 磷酸 (89:11) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长: 254 nm, 柱温: 30 ℃, 进样量: 10 μL。色谱图表明,

色谱峰位置供试品与对照品相同, 阴性样品无干扰。色谱图见图 1。

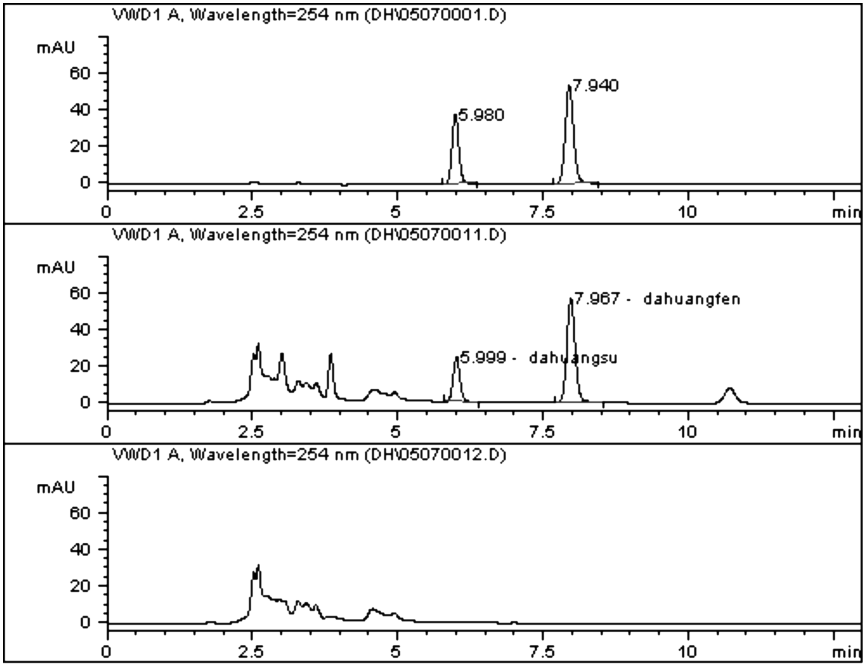


图 1 对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液液相图谱

**2.4 线性关系的考察** 对照品溶液用甲醇稀释配制成不同的浓度。将上述不同浓度的对照品溶液分别精密吸取各 10 μL, 按前述色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 大黄素、大黄酚的含量为横坐标, 得大黄素回归方程:  $Y = 5682.95146X + 1.2325424$ ,  $r = 0.99990$ ; 大黄酚回归方程:  $Y = 7401.04291X + 11.38040$ ,  $r = 0.99994$ 。表明大黄素在 0.04 μg ~ 0.32 μg、大黄酚在 0.57 μg ~ 4.52 μg 范围内线性关系良好。标准曲线见图 2, 图 3。

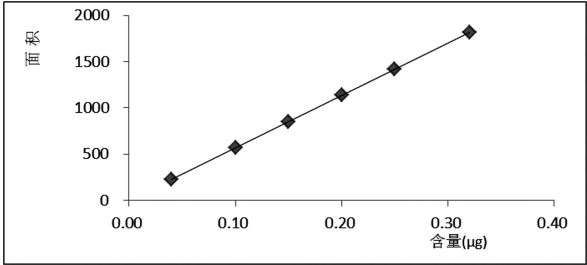


图 2 大黄素标准曲线

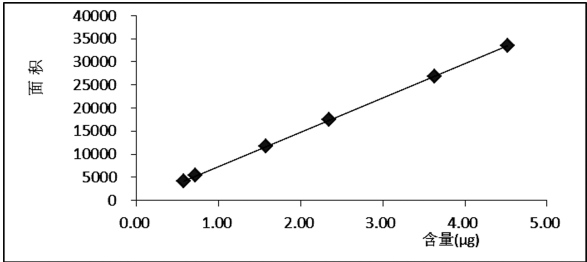


图 3 大黄酚标准曲线

**2.5 精密度试验** 大黄素对照品溶液 (16 μg/mL)、大黄酚对照品溶液 (22.6 μg/mL) 各精密吸取 10 μL, 重复 5 次进样, 测定峰面积, 大黄素和大黄酚峰面积的 RSD 分别为 0.85 %、0.93 %, 结果小于 2.0 % ( $n = 5$ ), 表明本法精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品 (批号 20140523) 溶液, 按每隔两小时共 8 小时即 0、2、4、6、8 h 时间间隔进样, 测定色谱峰面积, 结果大黄素 8 小时的 RSD 为 0.82 %, 大黄酚 8 小时的 RSD 为 0.54 %, 结果表明样品溶液在 8 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 同一批样品 (批号 20140523) 精密称取 5 份, 按供试品溶液方法操作分别制备, 分别精密吸取 10 μL 各份供试品溶液, 按前述色谱条件测定峰面积, 结果样品中大黄素、大黄酚含量的 RSD 分别为 1.62 % 和 1.08 % ( $n = 5$ ), 表明其重现性好。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取约 1 g 已知含量同一批样品 (批号 20140523, C 大黄素 = 0.2943 mg/g, C 大黄酚 = 0.6835 mg/g) 5 份, 放入带塞锥形瓶中, 分别精密定量加入前述适量大黄素、大黄酚对照品, 按 2.2 项下的制备方法操作制备供试品溶液, 进样, 测定, 计算回收率, 大黄素、大黄酚回收率分别为 97.1 %、97.4 %, RSD 分别为 1.25 %、

0.83 %。加样回收试验结果见表 1,表 2。

表 1 大黄素回收率试验结果

序号	称样量(g)	样品中大黄素含量(mg)	加对照品量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	1.0035	0.2953	0.2362	0.5280	98.5	97.1	1.25
2	1.0043	0.2956	0.2362	0.5257	97.4		
3	1.0122	0.2980	0.2362	0.5250	96.1		
4	1.0014	0.2947	0.2362	0.5179	95.6		
5	1.0117	0.2977	0.2362	0.5276	97.9		

表 2 大黄酚回收率试验结果

序号	称样量(g)	样品中大黄酚含量(mg)	加对照品量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	1.0137	0.6928	0.7003	1.3806	98.2	97.4	0.83
2	1.0017	0.6846	0.7003	1.3725	98.2		
3	1.1524	0.7876	0.7003	1.4692	97.3		
4	1.0934	0.7474	0.7003	1.4258	96.8		
5	1.0238	0.6997	0.7003	1.3747	96.4		

2.9 样品测定 取样品(批号 20140523、20140612、20140816)各 2 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取各 10 μL 对照品溶液及供试品溶液,按前述色谱条件进行测定,以外标一点法计算样品中大黄素、大黄酚的含量,结果见表 3。

表 3 痛风舒片中大黄素和大黄酚的含量测定结果

批号	大黄素/(mg·片 <sup>-1</sup> )	大黄酚/(mg·片 <sup>-1</sup> )
20140523	0.1032	0.2234
	0.1028	0.2256
20140612	0.1014	0.2168
	0.1011	0.2177
20140816	0.1023	0.2233
	0.1028	0.2248
RSD(%)	0.08	0.37

3 讨论

3.1 在上述色谱条件下,对大黄素、大黄酚对照品的甲醇溶液进行紫外扫描,波长范围为190 nm ~ 400 nm。结果大黄素和大黄酚对照品的紫外特征吸收光谱接近,实验选择两者有最大吸收峰处作为检测波长,即 254 nm,由于在 254 nm 处检测系统易稳定,峰形好、响应大,确定 254 nm 为检测波长<sup>[6]</sup>。

3.2 本研究对甲醇-磷酸以及及乙腈-磷酸进行考察,考察结果表明,乙腈-磷酸作为流动相基线

不稳,且基线噪音较大,甲醇-磷酸作为流动相分离条件良好。最后本实验采用甲醇-0.05 % 磷酸(89:11)为流动相,供试品溶液中的大黄素、大黄酚主峰与其邻近的色谱峰达到基线分离 R 大于 1.5,且平均理论塔板数均为 4000 左右,系统适应性良好,满足实验的要求。

参考文献

[1] 曹纬国,刘志琴,杨锡,等. HPLC 法测定通风舒胶囊中大黄酚和大黄素的含量[J]. 西北药学杂志,2003,18(5):206-207.

[2] 庄江能. 大黄的主要成分及其临床药理研究进展[J]. 西南军医,2009,11(5):931-934.

[3] 张力,马静,欧洋,等. 四川产亚大黄的鉴别及其大黄素、大黄酚的测定[J]. 华西药学杂志,2015,30(3):322-324.

[4] 李东晓,桂雪虹,陈为,等. 通腑泻热灌肠液中大黄素及大黄酚含量测定[J]. 中药新药与临床药理,2015,26(3):372-377.

[5] 方衡,邹韬博,刘海洋,等. HPLC 测定温肾降浊散中大黄酸、大黄素及大黄酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):91-93.

[6] 许乾丽,茅向军,宋晓宁,等. HPLC 法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(10):1841-1844.