

高效液相色谱法测定伊赫汤中羟基红花黄色素 A 的含量

莎日娜^a, 何春龙^b, 王焕芸^b (内蒙古医科大学 a. 第二附属医院药剂科; b. 药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)

[摘要] 目的 建立伊赫汤中羟基红花黄色素 A 的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法(HPLC), 色谱柱为大连依力特 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm 5 μm), 流动相为甲醇-0.5% 乙酸溶液(20:80), 检测波长为 403 nm, 流速为 1.0 ml/min。结果 羟基红花黄色素 A 在 0.816 0~32.64 μg/ml 浓度范围内具有良好的线性关系 $r=0.999 9$, 平均加样回收率为 101.0%, RSD 为 1.8% ($n=6$)。结论 本方法快速、准确、重复性好, 可用于伊赫汤中羟基红花黄色素 A 的含量测定。

[关键词] 伊赫汤; 羟基红花黄色素 A; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)02-0140-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.02.017

Determination of hydroxysaffor yellow A in Yihe decoction by HPLC

SHA Ri-na^a, HE Chun-long^b, WANG Huan-yun^b (Inner Mongolia Medical university, a. Department of pharmacy, Second affiliated hospita; b. School of Pharmacy, Hohhot 010030, China)

[Abstract] **Objective** To establish a RP-HPLC method for the determination of hydroxysaffor yellows A in Yihe decoction. **Methods** The separation was performed on a Yilite C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-0.5% acetic acid(20:80) with a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 403 nm. **Results** Hydroxysaffor yellow A in the range of 0.816 0~32.64 μg/ml showed a good linear relationship ($r=0.999 9$). The average recovery was 101.0% and RSD was 1.8% ($n=6$). **Conclusion** This accurate and reliable HPLC method could be used for the determination of hydroxysaffor yellow A in Yihe decoction.

[Key words] Yihe decoction; hydroxysaffor yellow A; HPLC

伊赫汤又名调元大补二十五味汤散, 是蒙医传统验方, 由红花、诃子、川楝子、栀子等二十五味药材组成。具有调解寒热、收敛、解毒、开胃之功效, 用于失眠、健忘疲乏、眩晕、麻木、抽搐、口苦、胃酸、烦渴、热泻呕吐、消化不良、食欲不振、胃胀胃痛、腰腿酸痛、久病不愈、身倦体怠^[1]。该药收载在《中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册》(1998年版)^[2], 原质量标准没有相关定量研究, 考虑到红花为本方中的君药, 为了更全面地控制伊赫汤的质量, 保证人民用药的安全、有效和可控, 提高该药的质量标准, 故参照文献^[3-10], 采用反相高效液相色谱法对伊赫汤中红花的主要有效成分羟基红花黄色素 A 进行含量测定, 亦可为该制剂质量标准的提高与完善提供依据。

1 仪器与试剂

大连依利特 P230 型高效液相色谱仪; UV230 +

紫外可见检测器; 手动进样器; KQ5200E 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

羟基红花黄色素 A 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111637-201106); 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。伊赫汤由内蒙古蒙药股份有限公司(批号: 110340), 乌兰浩特中蒙制药有限公司(批号: 100908) 提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: 大连依利特 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5% 乙酸溶液(20:80); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 403 nm^[3]; 理论塔板数按羟基红花黄色素 A 计不得少于 3 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取一定量羟基红花黄色素 A 对照品, 置 100 ml 容量瓶中, 加 25% 甲醇溶解制成 40.80 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品约 0.24 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 25% 甲醇 25 ml, 密塞, 称定重量, 超声(200 W, 40 Hz) 提取 40 min,

[基金项目] 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY12144)。

[作者简介] 莎日娜(1982-), 女, 硕士研究生, 药师。Tel: 13474801981, E-mail: sharina1982@163.com。

[作者简介] 王焕芸。Tel: 18647116320, E-mail: wanghuanyun999@163.com。

放冷,再称定重量,用 25% 甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性样品溶液制备 取除红花外的其余处方药材,按制备工艺方法制备缺红花的阴性样品,按上述供试品溶液制备方法制成缺红花的阴性样品溶液。

在选定的上述色谱条件下,分别吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性样品溶液各 10 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果显示:羟基红花黄色素 A 与其他组分色谱峰可完全分离,且阴性样品无干扰,色谱图见图 1。

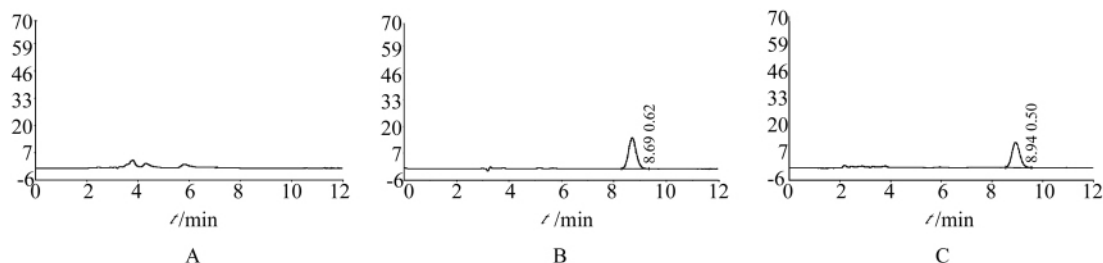


图 1 伊赫汤中羟基红花黄色素 A 色谱图
A-阴性样品; B-对照品; C-供试品。

2.3 线性关系考察 精密吸取对照品溶液(40.80 μg/ml) 0.2、0.5、1.0、3.0、5.0、8.0 ml,分别置于 10 ml 量瓶中,用 25% 甲醇稀释至刻度,摇匀。浓度分别为 0.816、2.040、4.080、12.24、20.40 和 32.64 μg/ml,在上述色谱条件下分别进样 10 μl,测定其峰面积 A 积分值,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为: $A = 27.899C - 1.9379$, $r = 0.9999$ 。试验结果表明:羟基红花黄色素 A 在 0.816 ~ 32.64 μg/ml 浓度范围内具有良好的线性关系。

2.4 精密度试验 分别精密吸取对照品溶液(20.40 μg/ml)和供试品溶液(内蒙古蒙药股份有限公司,批号:110340)各 10 μl,连续进样 6 次,分别测定其峰面积 A,对照品溶液 RSD 为 1.8%,供试品溶液 RSD 为 1.4%。结果表明:该方法精密度良好,符合含量测定要求。

2.5 稳定性试验 取供试品溶液(内蒙古蒙药股份有限公司,批号:110340),分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样,进样量为 10 μl,测定峰面积 A, RSD 为 1.8% ($n = 6$)。结果表明:供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取供试品(内蒙古蒙药股份有限公司,批号 110340)约 0.24 g,精密称定,共 6 份,分别按供试品溶液制备方法制备,并测定含量, RSD 为 1.1% ($n = 6$)。结果表明:该方法的重复性好,符合含量测定要求。

2.7 加样回收试验 取已知含量的供试品(内蒙古蒙药股份有限公司,批号:110340) 6 份,每份约 0.138 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入羟基红花黄色素 A 对照品一定量,按上述供试品溶液制备方法制备,分别测定,计算回收率。平均加样回收

率为 101.0%, RSD 为 1.8% ($n = 6$)。结果表明:该方法的准确度良好,符合含量测定要求,见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

称样量 (mg)	样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
138.0	127.8	124.6	253.8	101.2		
138.6	128.3	124.6	251.5	98.89		
138.0	127.8	124.6	256.6	103.4		
138.1	127.9	124.6	251.8	99.53	101.0	1.8
138.4	128.1	124.6	256.0	102.7		
138.5	128.2	124.6	253.3	100.4		

2.8 耐用性实验 取供试品(内蒙古蒙药股份有限公司,批号 110340)约 0.24 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,分别在 3 个不同流速条件下测定含量,同一流速下进样 2 次, RSD 为 0.01% ($n = 6$)。结果表明:该方法的耐用性良好,符合含量测定要求,见表 2。

表 2 耐用性试验结果

流速 (ml/min)	含量 (%)	RSD (%)
0.8	0.092 0	0.01
	0.091 5	
1.0	0.092 2	
	0.091 5	
1.2	0.089 0	
	0.090 2	

2.9 样品的含量测定 取不同厂家供试品约 0.24 g,各 3 份,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,分别吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μl,注入液相色谱仪,测定峰面积 A,计算羟基红花黄色素 A 的含量,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

生产厂家及批号	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
内蒙古蒙药股份有限公司(批号 110340)	0.936 4	0.7
乌兰浩特中蒙制药有限公司(批号 100908)	0.776 5	0.2

3 讨论

3.1 参考文献中采用溶剂回流提取法和超声提取法提取羟基红花黄色素 A, 本实验采用超声提取法提取羟基红花黄色素 A, 方法简单快速。在实验过程中, 曾采用 10% 甲醇、25% 甲醇、35% 甲醇作为提取溶剂进行提取测定。结果表明: 25% 甲醇提取杂质较少且含量较高, 效果最好; 提取时间分别选择在 30、40、50 min 提取。结果表明: 40 min 即可基本提取完全。

3.2 流动相的选择, 有文献报道采用乙腈作为流动相, 成本较高, 为了减少成本, 我们采用甲醇-0.18% 乙酸溶液(30:70) 和甲醇-0.18% 乙酸溶液(20:80), 甲醇-0.5% 乙酸溶液(20:80) 等为流动相, 通过比较, 将流动相定为甲醇-0.5% 乙酸溶液(20:80), 保留时间适宜, 分离度良好。

3.3 伊赫汤共有药材二十五味, 药味较多, 干扰成分较多, 选择含量测定指标较困难, 本实验首次对其进行含量测定研究, 具有一定研究意义。

3.4 本实验对方中的红花进行含量测定, 为更好的控制其质量, 有待于进一步对其他药材或成分进行相关测定。

【参考文献】

- [1] 马领籽, 那 贡. 伊赫汤的药理作用分析[J]. 蒙医药, 2000, 14(4): 37.
- [2] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药标准[S]. 1998: 157.
- [3] 中国药典 2010 版. 一部[S]. 2010: 141.
- [4] 王焕芸, 冯 欣, 武 娜. RP-HPLC 测定七味葡萄散中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(16): 1465.
- [5] 王玉华, 郝美玲, 王 伟. HPLC 测定蒙成药檀香清肺二十味丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中成药, 2008, 30(1): 143.
- [6] 寇培艳. HPLC 法测定当归-10 味散中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 北方药学, 2012, 9(3): 7.
- [7] 陈兴莉, 王慧春. HPLC 法测定回生甘露丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1556.
- [8] 吴 锋, 豆久锋, 陈忠良. HPLC 法测定祛风止痛胶囊中羟基红花黄色素 A[J]. 中草药, 2010, 41(11): 1817.
- [9] 郑永彪. RP-HPLC 测定藏药十三味红花丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(2): 159.
- [10] 韩占友. HPLC 法测定蒙药敖乐木斯-5 中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 4(2): 57.

[收稿日期]2012-06-25

[修回日期]2012-09-19

(上接第 128 页)

复受损的外周神经。本研究仅对降糖合剂的近期目标进行了考察, 其远期疗效和详细作用机制尚有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 中国医师协会内分泌代谢医师分会. 糖尿病周围神经病变诊疗规范(征求意见稿) [J]. 中国糖尿病杂志, 2009, 17(8): 638.
- [2] 中华中医药学会. 糖尿病周围神经病变中医防治指南[J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 9(22): 119.
- [3] 王 琪, 胡良平, 毛 玮, 等. 如何把握实验设计的随机原则[J]. 药学服务与研究, 2010, 10(3): 171.
- [4] 管晓峰, 陈智绍, 黄淑玉, 等. 参生系列方剂在 2 型糖尿病慢性并发症中的临床应用[J]. 临床内科杂志, 2002, 19(增刊): 142.
- [5] 黄秋明, 李 艳, 胡红艳, 等. 降糖合剂的薄层色谱鉴别[J]. 中国药师, 2009, 12(8): 1166.
- [6] 李 庆, 叶 真, 倪海祥. 糖尿病周围神经病变的临床评估和诊断进展[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(10): 1388.

- [7] 张先淑, 胡先明. 茯苓三萜化合物的药理作用及临床应用研究进展[J]. 重庆工贸职业技术学院学报, 2011, 24(4): 46.
- [8] 孙晓生, 谢 波. 山药药理作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 353.
- [9] 刘 朵, 章丹丹, 卞 卡. 地黄药理药化及配伍研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 748.
- [10] 邬浩杰. 丹参的药理作用研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(5): 694.
- [11] 罗丹冬, 张会平, 王沛坚, 等. 桂枝甘草汤提取物抗血栓形成的药效及机理的初步研究[J]. 新中医, 2010, 42(7): 109.
- [12] Mather KJ, Lteif A, Steinberg HO, et al. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(8): 2060.
- [13] 柴伟栋, 陈家伟, 沈 捷, 等. 葡萄糖、胰岛素对内皮细胞一氧化氮和内皮素 1 分泌影响的对比研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(2): 170.
- [14] 王春梅, 刘 艳, 王 艳, 等. 内皮素、一氧化氮与糖尿病周围神经病变关系的研究[J]. 医学新知杂志, 2002, 12(1): 10.

[收稿日期]2012-09-18

[修回日期]2012-11-06