

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.016

高效液相色谱法同时测定骨折挫伤胶囊中羟基红花黄色素 A 和大黄素含量*

胡小祥¹, 何 艳^{2△}

(1. 郴州市食品药品检验检测中心, 湖南 郴州 423000; 2. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423000)

摘要:目的 建立同时测定骨折挫伤胶囊中羟基红花黄色素 A 和大黄素含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Waters sunfire-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-0.2% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~9 min 时 15% A, 9~10 min 时 15% A~85% A, 10~25 min 时 85% A), 检测波长为 403 nm(0~10 min)、254 nm(10~25 min), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35℃, 进样量为 10 μL。结果 羟基红花黄色素 A、大黄素的质量浓度分别在 2.12~29.68 μg/mL($r=0.999\ 8$)和 2.04~28.36 μg/mL($r=0.999\ 8$)范围内与峰面积线性关系良好;平均加样回收率分别为 99.27% 和 99.55%, RSD 分别为 1.83% 和 1.18% ($n=9$)。结论 该方法简单、专属性强、重复性好,可用于骨折挫伤胶囊中红花药材和大黄药材的质量控制。

关键词:骨折挫伤胶囊;羟基红花黄色素 A;大黄素;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)01-0054-03

Content Determination of Hydroxysafflor Yellow A and Emodin in Guzhecuoshang Capsule by HPLC

HU Xiaoxiang¹, HE Yan²

(1. Chenzhou Institute Center for Food and Drug Control, Chenzhou, Hunan, China 423000; 2. School of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan, China 423000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of hydroxysafflor yellow A and emodin in Guzhecuoshang Capsule. **Methods** The chromatographic column was Waters sunfire-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisted of acetonitrile(A)-0.2% phosphoric acid(B) with gradient elution(0-9 min, 15% A; 9-10 min, 15% A-85% A; 10-25 min, 85% A) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were 403 nm(0-10 min) and 254 nm(10-25 min). The column temperature was set at 35℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** Good linearity of hydroxysafflor yellow A and emodin was obtained in the range of 2.12-29.68 μg/mL($r=0.999\ 8$), 2.04-28.36 μg/mL($r=0.999\ 8$), respectively. The average recovery rate were 99.27% ($RSD=1.83\%$, $n=9$) for hydroxysafflor yellow A, 99.55% ($RSD=1.18\%$, $n=9$) for emodin. **Conclusion** The method is simple, feasible and repeatable, and can be used for the quality control of hydroxysafflor yellow A and emodin in Guzhecuoshang Capsule.

Key words: Guzhecuoshang Capsule; hydroxysafflor yellow A; emodin; HPLC; content determination

*基金项目:湖南省高等学校“双一流”药学应用特色学科[湘教通[2018]469号]。

第一作者:胡小祥,男,硕士研究生,主管技师,主要从事药品检验工作,(电子信箱)hxx3318@126.com。

△通信作者:何艳,女,硕士研究生,实验师,主要从事中药质量标准研究,(电子信箱)526378710@qq.com。

~~~~~

测定黄芪中重金属含量[J]. 中药材,2014,37(12):2148-2149.

[9] 张 慧,林小凤,刘 嘉,等. 七叶莲中微量元素含量的电感耦合等离子光谱法测定[J]. 时珍国医国药,2013,24(12):2894-2895.

[10] ZHANG Q, SUN J, ZHAO Y, et al. Content Determination of Heavy Metal in 4 kinds of Chinese Herbal Medicine by ICP-OES[J]. China Pharmacy, 2012, 23(23):2172-2174.

[11] MKETO N, NOMNGONGO PN, NGILA JC. Environmentally friendly microwave-assisted sequential extraction method followed by ICP-OES and ion-chromatographic analysis for rapid determination of sulphur forms in coal samples[J]. Talanta, 2018, 18(2):567-573.

[12] POHL P, SZYMCZYCHAMADEJA A, WELNA M. Simple ICP-OES based method for determination of selected elements in brewed ground and soluble coffees prior to evaluation of their in-

take and chemical fractionation[J]. Food Chemistry, 2018, 26(3):171-179.

[13] BONTA M, FRANK J, TAIBL S, et al. Online-LASIL: Laser Ablation of Solid Samples in Liquid with online-coupled ICP-OES detection for direct determination of the stoichiometry of complex metal oxide thin layers[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1000(13):93-99.

[14] GAZULLA MF, ANDREU C, RODRIGO M, et al. Development of a rapid and accurate method for the determination of sodium in vacuum gas oils (VGOs) by ICP-OES[J]. Talanta, 2018, 18(8):600-605.

[15] WEN S, ZHU X. Speciation of inorganic arsenic(Ⅲ) and arsenic(V) by a facile dual-cloud point extraction coupled with inductively plasma-optical emission spectrometry[J]. Talanta, 2018, 18(1):265-270.

(收稿日期:2019-04-17;修回日期:2019-06-27)

骨折挫伤胶囊由猪骨、炒黄瓜子、煅自然铜、红花、大黄、当归、醋乳香、醋没药、血竭、土鳖虫 10 味药材组方,具有舒筋活络、接骨止痛的功效,主治跌打损伤、消肿散瘀、扭腰盆气等症<sup>[11188]</sup>。现行质量标准收载于 2015 年版《中国药典(一部)》,含量测定项下仅以血竭素为指标成分来控制血竭的质量,未对方中红花和大黄等药材进行质量控制。方中红花活血通经、散瘀止痛,主要成分为羟基红花色素 A<sup>[11151]</sup>;大黄逐瘀通经、跌打损伤,主要成分为大黄素<sup>[11123]</sup>。目前,关于该制剂中羟基红花色素 A 和大黄素的含量测定采用不同液相色谱法进行单独测定<sup>[2-3]</sup>,耗时费力。本研究中拟建立同时测定该制剂中羟基红花色素 A 和大黄素含量的高效液相色谱(HPLC)法,为控制该制剂的质量提供参考。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,配置 G1315D 型 DAD 检测器(美国 Agilent 公司);AUW-220D 型电子天平(日本岛津公司,感量为 0.01 mg);KQ-300DE 型超声清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

骨折挫伤胶囊(厂家 A,批号分别为 180103, 171001;厂家 B,批号为 20170602);羟基红花黄色素 A 对照品(批号为 111637-2013086,纯度为 96.5%),大黄素对照品(批号为 110756-201512,纯度为 98.7%)均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters sunfire-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~9 min 时 15% A,9~10 min 时 15% A→85% A, 10~25 min 时 85% A);检测波长:403 nm(0~10 min), 254 nm(10~25 min);流速:1.0 mL/min,柱温:35℃;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液制备

供试品溶液:取骨折挫伤胶囊样品(批号分别为

180103,171001,20170602)内容物适量,研细,取粉末约 2 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声提取(300 W,40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,滤液过 0.45 μm 滤膜,即得。

混合对照品溶液:分别称取羟基红花黄色素 A 和大黄素对照品适量,精密称定,用甲醇定容至刻度,制成质量浓度分别为 42.54 μg/mL 和 40.80 μg/mL 的混合对照品贮备溶液。

阴性对照品溶液:取按处方工艺制备阴性样品,取适量,研细,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

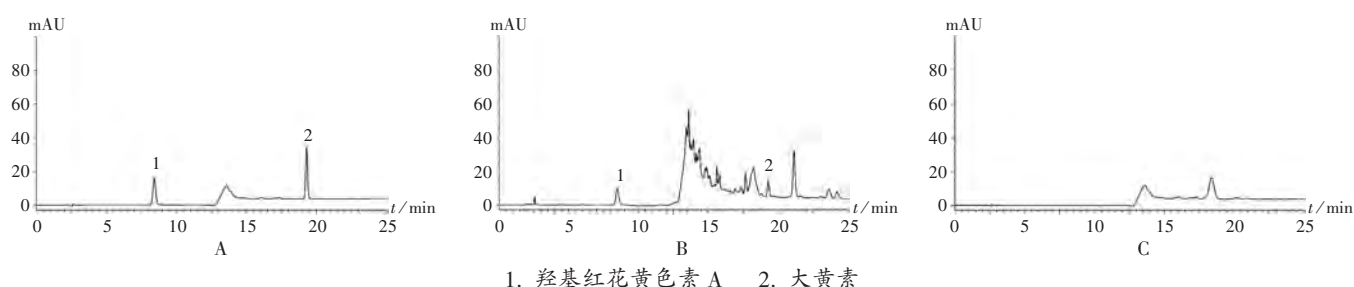
### 2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验:分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。供试品溶液中羟基红花黄色素 A 和大黄素色谱峰可达到较理想的分离效果,分离度大于 1.5;且阴性对照品溶液在与对照品溶液色谱峰相应的保留时间无色谱峰出现,阴性对照无干扰,表明该方法专属性良好。色谱图见图 1。

线性关系考察:分别精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 0.5,1.0,2.0,4.0,5.0,7.0 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积。以进样质量浓度为横坐标( $X, \mu\text{g/mL}$ )、峰面积为纵坐标( $Y$ )进行线性回归,得羟基红花黄色素 A、大黄素回归方程分别为  $Y_{\text{羟}} = 28.014X - 0.793 (r = 0.9998)$ ,  $Y_{\text{大}} = 36.835X - 0.342 (r = 0.9998)$ 。结果表明,羟基红花黄色素 A、大黄素质量浓度分别在 2.12~29.68 μg/mL, 2.04~28.36 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,连续进样 6 次。结果羟基红花黄色素 A 和大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.77% 和 0.57% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取同一批(批号为 180103)供



A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性样品溶液

图 1 高效液相色谱图

表1 加样回收试验结果( $n=9$ )

| 取样量(g)  |         | 样品含量(mg) |       | 加入量(mg) |       | 测得量(mg) |       | 回收率(%) |        | $\bar{X}$ (%) |       | RSD(%) |      |
|---------|---------|----------|-------|---------|-------|---------|-------|--------|--------|---------------|-------|--------|------|
| A       | B       | A        | B     | A       | B     | A       | B     | A      | B      | A             | B     | A      | B    |
| 1.015 4 | 1.015 4 | 0.232    | 0.110 | 0.116   | 0.058 | 0.345   | 0.168 | 97.41  | 100.00 |               |       |        |      |
| 1.024 2 | 1.024 2 | 0.234    | 0.111 | 0.116   | 0.058 | 0.348   | 0.169 | 98.28  | 100.00 |               |       |        |      |
| 0.975 7 | 0.975 7 | 0.222    | 0.105 | 0.116   | 0.058 | 0.337   | 0.163 | 99.14  | 100.00 |               |       |        |      |
| 1.000 5 | 1.005 0 | 0.228    | 0.109 | 0.232   | 0.116 | 0.454   | 0.227 | 97.41  | 101.72 |               |       |        |      |
| 0.946 8 | 0.946 8 | 0.216    | 0.102 | 0.232   | 0.116 | 0.444   | 0.216 | 98.28  | 98.28  | 99.27         | 99.55 | 1.83   | 1.18 |
| 1.004 1 | 1.004 1 | 0.229    | 0.108 | 0.232   | 0.116 | 0.457   | 0.224 | 98.28  | 100.00 |               |       |        |      |
| 1.086 5 | 1.086 5 | 0.248    | 0.117 | 0.348   | 0.174 | 0.601   | 0.289 | 101.44 | 98.85  |               |       |        |      |
| 1.023 8 | 1.023 8 | 0.233    | 0.110 | 0.348   | 0.174 | 0.584   | 0.283 | 100.86 | 99.43  |               |       |        |      |
| 1.074 1 | 1.074 1 | 0.245    | 0.116 | 0.348   | 0.174 | 0.601   | 0.286 | 102.30 | 97.70  |               |       |        |      |

注:A为羟基红花黄色素A,B为大黄素。

试品溶液 10  $\mu$ L,分别于 0,4,8,12,16,24 h 时重复进样。结果羟基红花黄色素 A 和大黄素峰面积的 RSD 分别为 1.11% 和 1.36% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 180103)样品 6 份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10  $\mu$ L,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积。结果羟基红花黄色素 A 和大黄素平均含量分别为 0.228 mg/g 和 0.108 mg/g, RSD 分别为 1.67% 和 1.21% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的(批号 180103)样品 9 份,约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按样品中含羟基红花黄色素 A 和大黄素的 50%,100%,150% 分别精密加入混合对照品溶液 50 mL,按 2.2 项下方法各平行制备 3 份供试品溶液,进样 10  $\mu$ L,计算回收率。结果见表 1。

#### 2.4 样品含量测定

取不同厂家的样品适量,研细,取约 2 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样 10  $\mu$ L,测定峰面积,计算含量。结果羟基红花黄色素 A 和大黄素的含量,厂家 A(批号为 180103)分别为 0.228 mg/g 和 0.108 mg/g,厂家 A(批号为 171001)分别为 0.266 mg/g 和 0.110 mg/g,厂家 B(批号为 20170602)分别为 0.159 mg/g 和 0.051 mg/g ( $n=3$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件选择

采用 DAD 检测器,对羟基红花黄色素 A 和大黄素混合对照品在 200~800 nm 波长范围内进行全波长扫描,结果显示,羟基红花黄色素 A 最大吸收波长为 403 nm,大黄素最大吸收波长为 254 nm。所用检测器具有波长切换功能,故本研究选用 403,254 nm 作为检测波长。参考文献[4-7],比较了乙腈-0.5% 乙酸溶液,乙腈-0.2% 磷酸溶液,甲醇-0.5% 乙酸溶液和甲

醇-0.2% 磷酸溶液作为流动相对供试品溶液进行分离。结果表明,采用甲醇-0.2% 磷酸溶液为流动相,进行梯度洗脱时,羟基红花黄色素 A 和大黄素分离效果好,分离度均大于 1.5,且阴性对照无干扰。

#### 3.2 提取条件选择

本研究中比较了甲醇、70% 甲醇、乙醇和 70% 乙醇作为提取溶剂时的提取效果。采用乙醇和 70% 乙醇作为溶剂时,杂质较多,目标峰有干扰;采用甲醇、70% 甲醇作为提取溶剂时,2 种有效成分在以甲醇为提取溶剂时得率最高,且测定无干扰,最终选择甲醇作为提取溶剂。同时还考察了加热回流提取和超声提取 2 种提取方法的效果,结果显示,2 种提取方法对 2 种有效成分提取的影响相似,但超声提取简单易行,故最终选择超声提取。以甲醇作为提取溶剂时,考察了超声提取 10,20,30,40 min 对 2 种有效成分提取的影响,超声提取 30 min 时,2 种有效成分基本提取完全,故选择超声提取 30 min 处理供试品。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015.
- [2] 杨燕飞. RP-HPLC 测定骨折挫伤胶袋中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国现代药物应用,2008,2(24):30-31.
- [3] 隋艳君,甄丽萍,刘会佳. HPLC 测定骨折挫伤胶袋中大黄素和大黄酚的含量[J]. 黑龙江医药,2004,17(3):179-180.
- [4] 何婷,李柯翔,季志红,等. HPLC 同时测定红花药材中 4 种化学成分含量[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(4):79-82.
- [5] 黄艳,罗定强,李青,等. 乙型肝炎胶囊质量标准改进研究[J]. 中国药业,2018,27(21):31-34.
- [6] 郭娅,王文婷,袁林. 高效液相色谱法同时测定舒筋活血片中 5 种成分[J]. 中国药业,2019,28(3):39-41.
- [7] 金贤武,付彩群,黄道明,等. 高效液相色谱法同时测定复方胆通片中 5 种蒽醌类成分含量[J]. 中国药业,2019,27(6):7-10.

(收稿日期:2019-06-20;修回日期:2019-07-25)