

高效毛细管电泳法测定生发灵酊中大黄酸的含量

郭 丹¹, 陈娜娜², 杨西晓¹, 侯连兵^{1*}

(1. 第一军医大学南方医院 药学部, 广东 广州 510515; 2. 第一军医大学药物研究所, 广东 广州 510515)

生发灵酊剂为本部研制的一种中药复方外用擦剂, 临床用于治疗脱发。处方中主含何首乌。目前测定何首乌中大黄酸的方法有 HPLC 法^[1,2]。高效毛细管电泳(HPCE)是近年来发展迅速的一种新的分离分析技术, 与传统的分离分析手段相比较, 具有高效、快速、微量和易于自动化等优势。本实验建立了 HPCE 内标法测定生发灵酊剂中的大黄酸, 简便灵敏、结果可靠, 重现性好, 能满足生发灵酊的药品质量监控。

1 仪器与试剂

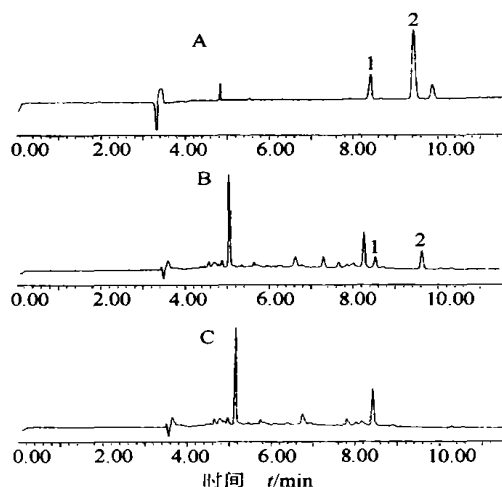
Waters 公司高效毛细管电泳仪, 石英毛细管柱(60 cm × 75 μm), Millennium 32 数据处理系统, 离心机(ABBOT, 美国); 大黄酸、咖啡酸对照品(中国药品生物制品检定所), 生发灵酊剂(100 mL, 批号: 030612、030626、030718, 自制), 四硼酸钠、氢氧化钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 缓冲液的配制: 精密称取 5.74 g 四硼酸钠溶于 500 mL 超纯水中, 配成 30 mmol/L 四硼酸钠电泳缓冲液溶液, 磷酸调 pH 为 8.2。

2.2 电泳操作条件: 分离电压为 12 kV; 检测波长为 254 nm; 进样量为 50 kPa × 5 s; 缓冲液为 30 mmol/L 四硼酸钠溶液(pH 8.2)。每次进样前用缓冲液冲洗毛细管柱 10 min, 每次分析后用 0.1 mol/L 氢氧化钠冲洗 2 min, 水冲洗 10 min。所用溶液均经 0.45 μm 纤维树脂膜滤过。上述电泳条件, 得电泳图, 见图 1。

2.3 对照品溶液和内标溶液的配制: 精密称取大黄酸对照品 15.0 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。吸取上述溶液 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成 30 μg/mL 的大黄酸对照品溶液。精密称取咖啡酸对照品 30.0 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。吸取上述溶液 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成 60 μg/mL 的咖啡酸内标溶液。



1-大黄酸 2-内标咖啡酸

1-rhein 2-internal standard caffeic acid

图 1 对照品(A)、生发灵酊(B)和阴性对照(C)的 HPCE 图谱

Fig. 1 HPCE chromatograms of reference substance (A), Shengfalíng Tinctura (B), and negative sample (C)

2.4 供试品溶液的制备: 精密量取生发灵酊剂 10 mL, 加 2.5 mol/L 硫酸 10 mL, 沸水浴回流 1 h, 冷却, 移至分液漏斗中, 用氯仿分 4 次振摇提取(30、30、20、10 mL), 合并氯仿液, 水浴蒸干。残渣加甲醇适量, 微热使之溶解, 定量转移至 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取 2 mL 溶液到 2 mL 离心管中, 10 000 r/min 离心 15 min。取上清液, 用 0.45 μm 有机滤膜滤过, 弃去初滤液, 收集续滤液作为供试品溶液。

2.5 阴性对照溶液的制备: 按处方比例及生产制备方法, 制备不含何首乌的阴性样品, 按 2.4 项下方法制备阴性溶液。

2.6 线性关系考察: 精密吸取大黄酸对照品溶液 2、4、6、8、10 mL 置 25 mL 量瓶中, 分别加内标溶液 5 mL, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按上述电泳条件, 分别进样 5 s。以对照品质量浓度为横坐标(C), 大

* 收稿日期: 2004-03-11

作者简介: 郭 丹(1971—), 男, 湖南韶山人, 主管药师, 硕士研究生, 专业方向为药品检验和仪器分析。

Tel: (020) 61641888-87215 E-mail: gdcnn@21cn.com

黄酸峰面积与内标峰面积比为纵坐标(A)作图,得回归方程 $A = 0.0849C - 0.0154$, $r = 0.9998$,表明大黄酸在 $2.4 \sim 12 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和大黄酸峰面积与内标峰面积比线性关系良好。

2.7 精密度试验:同一天配制 $6, 12, 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 大黄酸对照品溶液进行测定,另外同法在不同日内测定,分别计算日内、日间精密度,结果见表1。

表1 精密度试验结果 (n=5)

Table 1 Results of precision test (n=5)

质量浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	日内精密度		日间精密度	
	测得量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD /%	测得量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD /%
2	5.94	1.18	5.95	1.34
12	11.95	1.92	11.92	1.59
20	19.37	2.17	19.68	1.88

2.8 稳定性试验:将同一对照品溶液在相同电泳条件下,分别于 $0, 4, 8, 12, 24 \text{ h}$ 重复进样 5 s ,得大黄酸质量浓度的RSD为 1.92% ,表明大黄酸在 24 h 内测定结果稳定。

2.9 重现性试验:对同一批号样品,分别取样平行测定 5 次,得大黄酸质量浓度的RSD为 2.01% 。

2.10 回收率试验:精密量取已测知质量分数的生发灵酊剂 10 mL 于 25 mL 量瓶中,分别加大黄酸对照品溶液($30 \mu\text{g}/\text{mL}$) $2, 4, 6 \text{ mL}$ 和内标溶液 2.0 mL ,加甲醇至刻度,依法操作,进样 5 s ,以大黄酸峰面积与内标峰面积比代入回归方程计算回收率,结果见表2。

表2 回收率测定结果 (n=5)

Table 2 Results of recovery test (n=5)

样品量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	加入量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	测得量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率 /%	RSD /%
2.98	0.24	3.212	96.67	1.96
2.98	0.48	3.458	99.58	2.17
2.98	0.72	3.689	98.47	2.22

2.11 样品测定:取生发灵酊剂 3 批,精密量取 10 mL 置 25 mL 量瓶中,加内标溶液 2 mL ,加甲醇至刻度,依法操作,进样 5 s ,内标法计算质量分数,结

果见表3。

表3 生发灵酊中大黄酸的测定结果 (n=5)

Table 3 Content of rhein in Shengfaling Tinctura (n=5)

批号	大黄酸/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD/%
030612	7.46	1.87
030626	7.53	2.12
030718	7.62	1.71

3 讨论

中药复方制剂中,所含成分复杂,采用HPLC法进行测定时,往往因杂质太多,容易污染色谱柱,使柱效降低,而采用HPCE法进行分析时,由于毛细管柱易冲洗再生,保持高效,使各成分的分离较佳。

本实验曾比较磷酸盐、硼酸-硼砂、四硼酸钠 3 种缓冲液,发现四硼酸钠对大黄酸的分离最理想。研究表明缓冲液浓度和pH值对分离具有重要影响。高浓度缓冲液可获得较好的分离,但保留时间会变长,而且导致通过毛细管的电流增加,从而增大焦耳热。因此,实验选用 30 mmol/L 四硼酸钠作缓冲液。pH值选择是决定分离成败的一大关键。采用pH为 8.2 的四硼酸钠缓冲液时分析时间短,峰形尖锐,对称并达到基线分离。研究表明,柱温降低分离度变好,但柱效减低,分析时间变长。综合考虑分离度和迁移行为的变化,本实验选用 25 柱温较合适。分离电压是毛细管电泳的一项重要参数,实验表明,增加组份的迁移速度是减少谱带展宽,提高分离效率的重要途径,增加电场强度可以达到提高速度的目的。但高场强度导致通过毛细管的电流增加,从而增大焦耳热。在 12 kV 时,分离选择性最佳。

References

- [1] Feng S L, Chen L R, Zhao H F, *et al.* Determination of rhein, emodin, and tanshinone II_A in Dahuang Jiangzhi Powder by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20 (6): 368-370.
- [2] Yuan H L, Liu Z L, Zhang C, *et al.* Determination of rhein, emodin and physcion in Tuber Fleeceflower (*Polygonum multiflorum*) by supercritical fluid extraction-HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(4): 258-260.

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅