

HPLC 同时测定降脂灵片中 8 个指标性成分的含量

蔡珊珊, 米宝丽, 张振秋*, 高晓旭, 郑艳超, 张杰
(辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:** 建立以高效液相色谱法同时测定降脂灵片中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量测定方法。**方法:** 采用 Phenomexsil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 284 nm, 柱温 30 °C。**结果:** 在本色谱条件下, 橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的进样量分别在 0.10 ~ 0.50, 0.066 ~ 0.33, 0.037 ~ 0.19, 0.019 ~ 0.093, 0.028 ~ 0.14, 0.24 ~ 1.2, 0.11 ~ 0.55, 0.17 ~ 0.87 μg 与色谱峰面积呈良好的线性关系; 加样回收率 ($n = 6$) 均在 97.0% ~ 102.9%, RSD 均 < 2.0%。**结论:** 该法快速、准确, 重复性好, 可以满足降脂灵片的含量测定要求。

[关键词] 高效液相色谱; 降脂灵片; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0077-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014070077

Determination of the Content of Eight Ingredients in Jiangzhiling Tables by HPLC

CAI Shan-shan, MI Bao-li, ZHANG Zhen-qiu*, GAO Xiao-xu, ZHENG Yan-chao, ZHANG Jie
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of aurantioobtusin, aloee-emodin, rhein, chrysoobtusin, obtusin, emodin, chrysophanol, physcion in Jiangzhiling tables. **Method:** The separation was performed on a Phenomexsil-C₁₈ ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with the gradient elution of acetonitrile-water of 0.1% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength at 284 nm and the column temperature was set at 30 °C. **Result:** Aurantioobtusin, aloee-emodin, rhein, chrysoobtusin,

[收稿日期] 20130705(014)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(20110700703)

[第一作者] 蔡珊珊, 在读硕士研究生, 从事中药制剂分析研究, Tel: 0411-87586058, E-mail: caishanshan2011@sina.com

[通讯作者] * 张振秋, 博士, 教授, 从事中药制剂分析研究, Tel: 0411-87586058; E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 80.
- [7] 孙熠, 耿婷, 单鸣秋, 等. HPLC 测定荆芥内酯的含量和有关物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 52.
- [8] 黄洪勇, 催利娜, 唐辉, 等. RP-HPLC 测定蒜氨酸原料药中的有关物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 101.
- [9] 李军, 岳易恒, 张丽萍, 等. HPLC 测定不同产地山药中腺苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 55.
- [10] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia [S]. The Stationery Office, 2012BP: 1772.
- [11] 韩慧琴, 曾春萍, 谢颖, 等. 逍遥丸(水丸)质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 116.
- [12] 张伟明, 李健和, 黎银波, 等. 甘草酸二铵注射液的研制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 35.
- [13] 刘金城, 杭清, 张定善. 高效液相色谱法对甘利欣注射液中 18α-甘草酸和 18β-甘草酸的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2512.

[责任编辑 蔡仲德]

obtusin, emodin, chrysophanol, physcion had good linearity in the ranges of 0.10-0.50, 0.066-0.33, 0.037-0.19, 0.019-0.093, 0.028-0.14, 0.24-1.2, 0.11-0.55, 0.17-0.87 μg . respectively. The average recoveries of matters were 97.0% -102.9%, with RSDs of the recoveries were less than 2.0%. **Conclusion:** The developed method is rapid, accurate with high repeatability and stability, which is helpful to meet the content determination requirements of Jiangzhiling tables.

[**Key words**] HPLC; Jiangzhiling tables; content determination

降脂灵片由制何首乌、枸杞子、黄精、山楂、决明子 5 味中药组成, 收载于 2010 年版《中国药典》, 具有补肝益肾、养血明目的功效, 用于肝肾不足型高脂血症, 症见头晕、目眩、须发早白^[1]。在 2010 年版《中国药典》中降脂灵片项下, 采用高效液相色谱法测定制何首乌中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -葡萄糖苷含量以控制药物质量。本文采用高效液相色谱法, 以梯度洗脱同时测定降脂灵片中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 8 个成分的含量^[2-6], 丰富并完善了降脂灵片质量控制标准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent-1100 型高效液相色谱仪(仪器编号 20041191 DE43607375), 配置四元梯度泵、在线脱气机、VWD 检测器; 2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司), METTLER AB135-S 1/10 万电子天平(瑞士), DZKW-Q-4 型恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)。

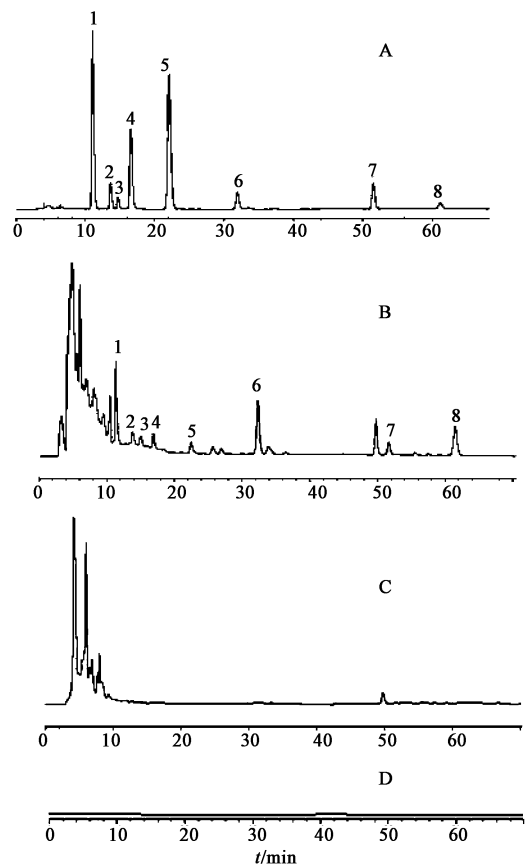
1.2 试剂 橙黄决明素对照品(批号 20120514), 芦荟大黄素对照品(批号 110795-201007), 大黄酸对照品(批号 110757-200206), 大黄素对照品(批号 110756-200110), 大黄酚对照品(批号 110796-201017) 和大黄素甲醚对照品(批号 110758-201013) 均购于中国食品药品检定研究院。黄决明素对照品(批号 20120419), 决明素对照品(批号 20120322) 购于上海永恒科技生物有限公司。降脂灵片 5 批(按药典规定自制), 乙腈色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相 A 乙腈, B 0.1% 磷酸, 梯度洗脱(表 1), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 284 nm。在该色谱条件下, 样品中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰与其他非被测成分峰能够达到基线分离, 阴性对照液无干扰。对照品、供试品、阴性对照液、空白溶剂的色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	30	70
20	30	70
70	40	60



1. 橙黄决明素; 2. 芦荟大黄素; 3. 大黄酸; 4. 黄决明素; 5. 决明素; 6. 大黄素; 7. 大黄酚; 8. 大黄素甲醚

图 1 混合对照品溶液(A)、供试品溶液(B)、阴性液(C)、空白溶剂(D) HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 8 个对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含橙黄决明素 0.228 8 mg、芦荟大黄素 0.111 6 mg、大黄酸 0.077 20 mg、黄决明素 0.112 8

mg、决明素 0.146 3 mg、大黄素 0.754 0 mg、大黄酚 0.149 6 mg、大黄素甲醚 0.551 6 mg 的对照品溶液。分别精密吸取上述 8 个对照品溶液适量,加甲醇稀释制成每 1 mL 橙黄决明素 25.00 μg 、芦荟大黄素 16.41 μg 、大黄酸 9.264 μg 、黄决明素 4.625 μg 、决明素 6.876 μg 、大黄素 58.81 μg 、大黄酚 27.68 μg 、大黄素甲醚 43.58 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取降脂灵片 20 片,称定质量,研细,精密称取 3 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,加热回流 2 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液 10 mL,加 2.5 mol·L⁻¹ 硫酸溶液 20 mL 和三氯甲烷 40 mL,加热回流 2 h,放冷,分取三氯甲烷液,水层用三氯甲烷振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并三氯甲烷液,用适量水洗涤,三氯甲烷液置水浴蒸干,残渣用甲醇液溶解,至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过滤,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 分别精密量取上述混合对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入高效液相色谱仪,测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 2。

表 2 8 种成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
橙黄决明素	$Y = 12\ 066.0X + 23.8$	0.999 8	0.10 ~ 0.50
芦荟大黄素	$Y = 4\ 010.1X + 0.2$	0.999 9	0.066 ~ 0.33
大黄酸	$Y = 2\ 777.6X + 15.1$	0.999 8	0.037 ~ 0.19
黄决明素	$Y = 12\ 897.0X + 2.2$	0.999 6	0.019 ~ 0.093
决明素	$Y = 11\ 153.0X - 5.9$	0.999 9	0.028 ~ 0.14
大黄素	$Y = 7\ 190.1X + 74.1$	0.999 7	0.24 ~ 1.2
大黄酚	$Y = 4\ 365.9X - 12.1$	0.999 7	0.11 ~ 0.55
大黄素甲醚	$Y = 8\ 468.7X - 135.1$	0.999 6	0.17 ~ 0.87

2.3.2 精密度试验 取降脂灵片(批号

20121101),按 2.2.2 项下供试品溶液方法制备,在上述色谱条件下连续进样 6 次,测得橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 1.1%, 1.8%, 1.5%, 1.1%, 0.3%, 1.3%, 0.5%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品(批号 20121101)6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样,测得橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 1.0%, 1.5%, 2.2%, 1.2%, 1.7%, 1.2%, 1.8%, 1.4%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 20121101),在室温下放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 在上述色谱条件下进样测定。橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.5%, 1.4%, 2.4%, 1.8%, 1.3%, 1.2%, 1.5%, 1.9%, 表明供试品溶液中上述 8 种成分在 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取已知含量(橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量分别为 0.018 44, 0.011 58, 0.006 976, 0.003 388, 0.005 138, 0.044 43, 0.020 48, 0.030 37 mg/片)的降脂灵片 6 份,每份约 3 g。分别精密加入橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的对照品溶液适量,按 2.2.2 项下方法进行制备,于上述色谱条件下测定,计算回收率。见表 3。

2.4 含量测定 取 5 个批次降脂灵片,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,并计算样品中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等 8 种成分的含量,结果见表 4。

表 3 降脂灵片中 8 种成分加样回收率试验

成分	取样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
橙黄决明素	3.089	0.183 7	0.182 3	0.363 3	98.5	99.4	1.1
	3.021	0.179 7	0.182 3	0.360 7	99.3		
	3.078	0.183 1	0.182 3	0.365 8	100.2		
	3.051	0.181 5	0.182 3	0.360 2	98.0		
	3.032	0.180 4	0.182 3	0.361 4	99.3		
	3.073	0.182 8	0.182 3	0.367 1	101.1		

续表 3

成分	取样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芦荟大黄素	3.089	0.115 4	0.113 5	0.228 4	99.6	99.7	1.3
	3.021	0.112 9	0.113 5	0.225 0	98.8		
	3.078	0.115 0	0.113 5	0.227 5	99.1		
	3.051	0.114 0	0.113 5	0.229 4	101.7		
	3.032	0.113 3	0.113 5	0.227 5	100.6		
	3.073	0.114 8	0.113 5	0.226 3	98.2		
大黄酸	3.089	0.069 51	0.068 21	0.136 2	97.8	99.4	1.4
	3.021	0.067 98	0.068 21	0.136 6	100.6		
	3.078	0.069 26	0.068 21	0.137 4	99.9		
	3.051	0.068 66	0.068 21	0.135 6	98.1		
	3.032	0.068 23	0.068 21	0.137 3	101.3		
	3.073	0.069 15	0.068 21	0.136 4	98.6		
黄决明素	3.089	0.033 76	0.033 42	0.067 95	102.3	99.2	1.8
	3.021	0.033 02	0.033 42	0.065 70	97.8		
	3.078	0.033 64	0.033 42	0.066 46	98.2		
	3.051	0.033 35	0.033 42	0.065 90	97.4		
	3.032	0.033 14	0.033 42	0.066 26	99.1		
	3.073	0.033 59	0.033 42	0.067 08	100.2		
决明素	3.089	0.051 20	0.050 47	0.100 7	98.1	99.2	1.4
	3.021	0.050 07	0.050 47	0.100 2	99.4		
	3.078	0.051 01	0.050 47	0.101 8	100.6		
	3.051	0.050 57	0.050 47	0.100 9	99.7		
	3.032	0.050 25	0.050 47	0.099 21	97.0		
	3.073	0.050 93	0.050 47	0.101 6	100.3		
大黄素	3.089	0.442 7	0.438 2	0.878 7	99.5	100.6	1.3
	3.021	0.433 0	0.438 2	0.877 8	101.5		
	3.078	0.441 1	0.438 2	0.892 0	102.9		
	3.051	0.437 3	0.438 2	0.874 2	99.7		
	3.032	0.434 5	0.438 2	0.872 3	99.9		
	3.073	0.440 4	0.438 2	0.879 5	100.2		
大黄酚	3.089	0.204 1	0.201 3	0.402 4	98.5	98.7	0.6
	3.021	0.199 6	0.201 3	0.399 1	99.1		
	3.078	0.203 3	0.201 3	0.402 6	99.0		
	3.051	0.201 6	0.201 3	0.399 3	98.2		
	3.032	0.200 3	0.201 3	0.400 8	99.6		
	3.073	0.203 0	0.201 3	0.400 1	97.9		
大黄素甲醚	3.089	0.306 2	0.303 1	0.611 4	100.7	100.4	0.6
	3.021	0.299 5	0.303 1	0.602 3	99.9		
	3.078	0.305 1	0.303 1	0.612 1	101.3		
	3.051	0.302 4	0.303 1	0.606 7	100.4		
	3.032	0.300 6	0.303 1	0.605 5	100.6		
	3.073	0.304 6	0.303 1	0.606 2	99.5		

表4 降脂灵片中8种成分的含量测定

mg/片

样品批号	橙黄决明素	芦荟大黄素	大黄酸	黄决明素	决明素	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
20111226	0.018 60	0.011 55	0.007 275	0.003 345	0.005 241	0.043 81	0.020 18	0.030 15
20120115	0.018 22	0.011 45	0.006 985	0.003 456	0.005 169	0.044 52	0.020 78	0.030 65
20120403	0.018 50	0.011 87	0.006 628	0.003 393	0.005 136	0.045 13	0.020 38	0.030 84
20120705	0.018 55	0.011 64	0.007 029	0.003 417	0.005 047	0.044 11	0.020 58	0.031 23
20121101	0.018 33	0.011 41	0.006 963	0.003 331	0.005 097	0.044 57	0.020 48	0.030 78

3 小结与讨论

考察了超声和回流的提取方法,在提取溶剂的选择上,比较了80%甲醇溶液、90%甲醇溶液、甲醇、乙醇,在流动相选择上,考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-水等3个流动相系统。最终确定采用回流提取法,甲醇为提取溶剂,选用乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相系统^[7-9]。

在2010年版《中国药典》中降脂灵片项下,采用高效液相色谱法测定每片含制何首乌以2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-葡萄糖苷(C₂₀H₂₂O₉)计,不得少于40 μg控制药物质量。本文采用高效液相色谱法,以梯度洗脱同时测定降脂灵片中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酸、黄决明素、决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚8个成分的含量,为2015年版《中国药典》降脂灵片质量控制及药品质量提供参考依据^[10]。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:856.
- [2] 郝延军,桑育黎,赵余庆. 决明子的研究进展[J]. 中草药,2001,32(9):858.

- [3] 韩亚萍. 决明子现代药理研究概述[J]. 环球中医药,2009,2(6):461.
- [4] 李玉美. 中药决明子的研究现状及综合利用[J]. 海峡药学,2007,19(11):62.
- [5] 王玉宝. 紫外分光光度法测定决明子中蒽醌类成分含量[J]. 中医临床杂志,2013(8):730.
- [6] 梁朔,张振秋,米宝丽,等. HPLC法同时测定不同产地生、炒决明子中6种蒽醌类成分[J]. 中成药,2013,3:584.
- [7] 王晖,张振秋. HPLC波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):116.
- [8] 倪冲,裴志东,张稼小,等. 乌骨藤中白桦酯酸的提取分离及抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):172.
- [9] 毛红梅,平欲晖,宗星星,等. HPLC同时测定败酱草中常春藤皂苷元、齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):89.
- [10] 卫莹芳,谢达温,万丽,等. HPLC梯度洗脱法同时测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2009,6(11):868.

[责任编辑 蔡仲德]



欢迎投稿

欢迎订阅