

HPLC 测定四季三黄片中 5 种蒽醌类衍生物的含量

冯源,张德全,周浓*,姜北,康小丽
(大理学院,云南 大理 671000)

[摘要] 目的:建立四季三黄片中同时测定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量的方法。方法:色谱柱为 Agela Venusil XBP-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 226 nm。结果:芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚分别在 0.040~0.800,0.040~0.800,0.040~0.800,0.040~0.800,0.020~0.400 μg 呈良好的线性关系,平均回收率($n=6$)分别为 97.62%,99.48%,99.72%,96.23%,95.68%,RSD 1.62%,1.24%,1.13%,1.19%,1.67%。结论:所建立的定量方法快速简单,方法可靠,可作为四季三黄片的质量控制方法。

[关键词] 四季三黄片;高效液相色谱法;蒽醌;含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)07-0096-04

Five Anthraquinone Derivatives in Siji Sanghuang Tablets Determined by HPLC

FENG Yuan, ZHANG De-quan, ZHOU Nong*, JIANG Bei, KANG Xiao-li
(DaLi University, DaLi 671000, China)

[Abstract] Objective: To develop a method for simultaneous determining aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion in Siji Sanghuang tablets. Method: The method was conducted on Agela Venusil XBP-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid (B) with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 226 nm. Result: The linear ranges of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcione were 0.040-0.800, 0.040-0.800, 0.040-0.800, 0.040-0.800, 0.020-0.400 μg respectively, the average recoveries ($n=6$) were 97.62% (RSD 1.62%), 99.48% (RSD 1.24%), 99.72% (RSD 1.13%), 96.23% (RSD 1.19%), 95.68% (RSD 1.67%) respectively. Conclusion: The method is accurate, reliable, repeatable and can be used for the quality control of Siji Sanghuang tablets.

[Key words] Siji Sanghuang tablets; HPLC; anthraquinons; content determination

四季三黄片由大黄、黄芩、黄柏、栀子 4 味药组成,具有消炎退热、通便利水之功效,用于口鼻生疮、咽疼齿痛、口干舌燥、目眩头晕、大便秘结、小便赤黄^[1]等症。大黄为方中君药,其主要有效成分为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等蒽醌衍生物,占大黄成分的 3%~5%,以部分游离、大部分与葡萄糖结合成苷的形式存在^[2];这类化合物具有较强的泻下、抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、保肝、利胆、降血脂、镇痛等生物活性^[3],因此,常将其作为评价大黄药材及其含大黄成方制剂质量的指标成分^[4]。

现行部颁标准未收载鉴别、含量测定项^[1],文献报道中较多的也是对黄芩苷、栀子苷、盐酸小檗碱及大黄素、大黄酚等单一成分进行含量测定^[5-8],难以全面控制其质量。为进一步有效控制药品质量,完善质量标准,本研究采用 HPLC 同时测定四季三黄片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量,以多成分指标体系综合评价其质量,实现对药物成分整体把握,保证临床疗效的稳定性。

1 仪器与试剂

1100 LC 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),

[收稿日期] 20111101(001)

[第一作者] 冯源,博士,讲师,从事药用植物学研究,Tel:0872-2219051,E-mail:fengyuancoral@163.com

[通讯作者] *周浓,硕士,副教授,从事药用植物栽培与质量控制,Tel:0872-2257411,E-mail:erhaizn@126.com

KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),RE-2000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-Ⅲ循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),AE240 型天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

四季三黄片样品(购于大理市药品零售商店);芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110795-200806, 110757-200206, 110756-200110, 110796-201017, 110758-200912, 供含量测定用)。乙腈为色谱醇(美国 Tedia 试剂公司),水为娃哈哈牌纯净水,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agela Venusil XBP- C_{18} 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),进行梯度洗脱(0 ~ 10 min, 10% ~ 25% A; 10.00 ~ 25.00 min, 25% ~ 40% A; 25.00 ~ 30.00 min, 40% ~ 50% A; 30.00 ~ 37.00 min, 50% ~ 55% A, 37.00 ~ 55.00 min, 55% ~ 74% A);检测波长 226 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40 $^{\circ}$ C,进样量 5 μ L。

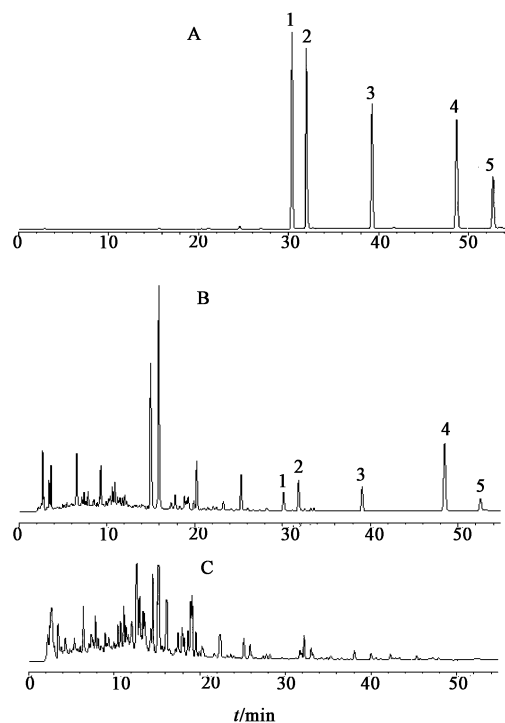
2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密量取上述对照品溶液适量,混匀,即得混合对照品溶液(每 1 mL 中含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚分别为 40.0, 40.0, 40.0, 40.0 μ g 和 20.0 μ g)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 20 片,去糖衣,研细,精密称定约 0.60 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加 70% 乙醇 60 mL,室温浸泡 2 h,超声处理 30 min,重复提取 3 次,合并提取液,减压回收溶剂至干,用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方组成,取除大黄外的其余药味,按工艺要求制成缺大黄的片剂。按 2.2.2 项下同法操作,得阴性样品溶液。依 2.1 项下色谱条件测定,结果在芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰出现的位置上无对应峰出现,表明其他组分对测定无干扰,见图 1。

2.3 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液(分别含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 40.0, 40.0, 40.0, 40.0, 20.0 mg·L⁻¹) 1, 2, 5, 10, 15, 20 μ L,注入液相色谱仪,得进样量 X



A. 混合对照品;B. 供试品;C. 缺大黄阴性样品;

1. 芦荟大黄素;2. 大黄酸;3. 大黄素;4. 大黄酚;5. 大黄素甲醚

图1 四季三黄片 HPLC

(μ g)与峰面积 Y 的线性方程。结果表明,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚进样量分别在 0.040 ~ 0.800, 0.040 ~ 0.800, 0.040 ~ 0.800, 0.040 ~ 0.800, 0.020 ~ 0.400 μ g 与峰面积成良好的线性关系,回归方程分别为 $Y = 7\,507.9X + 56.403$ ($r = 0.999\,4$); $Y = 6\,433.7X + 46.431$ ($r = 0.999\,3$); $Y = 5\,444.1X + 42.397$ ($r = 0.999\,2$); $Y = 5\,729.2X + 48.774$ ($r = 0.999\,3$); $Y = 5\,721.6X + 92.706$ ($r = 0.999\,6$)。

2.4 精密度试验 以混合对照品溶液连续进样 6 次,测定峰面积,计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.77%, 1.82%, 1.57%, 1.45%, 2.74%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 取同一批号四季三黄片样品 6 份 0.60 g(企业 1,批号 20100101),按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条件测定,测定峰面积,计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.62%, 0.28%, 0.41%, 0.52%, 1.06% ($n = 6$),表明本方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 取同一批号四季三黄片样品溶液(企业 1,批号 20100101),室温密闭放置,分别在

制备后 0,5,10,15,20,25 h 进样,测定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积,RSD 分别为 1.24%,1.68%,1.12%,1.26%,1.98% ($n=6$),表明样品溶液在 25 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的四季三黄片约 0.30 g(企业 1,批号 20100101),共 6 份,分别精密加入一定量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄

素、大黄酚、大黄素甲醚对照品,按 **2.2.2** 项下供试品溶液的制备方法制备及 **2.1** 项下色谱条件测定,结果见表 1。结果表明,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率为 97.62%,99.48%,99.72%,96.23%,95.68%,RSD 为 1.62%,1.24%,1.13%,1.19%,1.67%,符合分析要求。

表 1 三黄片中 5 种成分加样回收率试验($n=6$)

成分	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芦荟大黄素	0.301 8	0.086 7	0.090 0	0.174 7	97.82	97.62	1.62
	0.301 4	0.086 6	0.090 0	0.172 2	95.12		
	0.300 2	0.086 2	0.090 0	0.173 4	96.89		
	0.301 2	0.086 5	0.090 0	0.175 4	98.81		
	0.302 5	0.086 9	0.090 0	0.176 6	99.70		
	0.303 2	0.087 1	0.090 0	0.174 7	97.38		
大黄酸	0.301 8	0.150 3	0.150 0	0.299 7	99.61	99.48	1.24
	0.301 4	0.150 1	0.150 0	0.300 5	100.26		
	0.300 2	0.149 5	0.150 0	0.297 9	98.96		
	0.301 2	0.150 0	0.150 0	0.296 0	97.36		
	0.302 5	0.150 7	0.150 0	0.300 5	99.83		
	0.303 2	0.151 0	0.150 0	0.302 3	100.86		
大黄素	0.301 8	0.155 6	0.150 0	0.302 3	97.81	99.72	1.13
	0.301 4	0.155 3	0.150 0	0.306 7	100.93		
	0.300 2	0.154 7	0.150 0	0.303 4	99.12		
	0.301 2	0.155 2	0.150 0	0.305 2	99.98		
	0.302 5	0.155 9	0.150 0	0.306 9	100.63		
	0.303 2	0.156 3	0.150 0	0.306 1	99.86		
大黄酚	0.301 8	0.498 1	0.500 0	0.974 2	95.21	96.23	1.19
	0.301 4	0.497 5	0.500 0	0.978 9	96.28		
	0.300 2	0.495 5	0.500 0	0.976 5	96.19		
	0.301 2	0.497 1	0.500 0	0.977 7	96.12		
	0.302 5	0.499 3	0.500 0	0.975 5	95.23		
	0.303 2	0.500 4	0.500 0	0.991 6	98.32		
大黄素甲醚	0.301 8	0.099 9	0.100 0	0.194 9	95.03	95.68	1.67
	0.301 4	0.099 8	0.100 0	0.198 2	98.41		
	0.300 2	0.099 4	0.100 0	0.194 6	95.18		
	0.301 2	0.099 7	0.100 0	0.194 8	95.12		
	0.302 5	0.100 1	0.100 0	0.195 2	95.11		
	0.303 2	0.100 4	0.100 0	0.195 7	95.27		

2.8 样品测定 按上述色谱条件对 2 个不同厂家 4 个不同批号四季三黄片进行含量测定,分别精密

吸取对照品、供试品溶液注入色谱仪,测定结果见表 2。

表 2 不同厂家、不同批号的四季三黄片的测定 (n=3)

mg·g⁻¹

生产厂家	批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	总和
企业 1	20100101	0.287 3	0.498 0	0.515 4	1.650 5	0.331 0	3.282 2
	20100102	0.280 1	0.503 0	0.505 8	1.625 2	0.330 4	3.244 5
企业 2	20100101	0.190 1	0.314 2	0.227 3	1.865 2	0.504 2	3.101 0
	20100102	0.198 6	0.332 0	0.230 6	1.940 8	0.490 0	3.192 0

结果表明,不同厂家生产的四季三黄片中 5 种蒽醌类化合物的含量差异较小,但组成大黄总蒽醌的 5 种主要蒽醌衍生物的比例也有较大差别,这种有效成分含量和比例的显著差异有可能影响药物的疗效,这可能由于各不同厂家采用的制备工艺或者大黄内在质量等原因引起的。因此,为控制四季三黄片的质量,保证临床用药的安全性和有效性,进行四季三黄片的含量测定研究,规范四季三黄片制备工艺极其重要,表明在标准中增加含量测定项等很有必要性和重要性。

鉴于我国现行药品标准尚未对四季三黄片中大黄含量作出规定,建议各生产厂家稳定药材来源,控制生产工艺,从控制本品中所含的指标成分入手,规定其指标成分含量限度的上、下限,制定出科学、统一的质量标准,使有效成分含量稳定,促使生产企业提高四季三黄片的质量。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择 考察了超声提取、加热回流、索氏提取等方法的提取效果^[9-11],以超声提取法的提取效率最高,能保留制剂中更多成分,避免了溶剂提取中药中有效成分的损失。而超声提取法中,又分别比较了不同的溶剂(水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯等)、不同的提取时间、不同的提取次数等的提取效果,试验表明以 70% 乙醇为提取溶剂,提取 30 min,提取 3 次可将四季三黄片中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚基本提取完全。

3.2 流动相的选择 比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液等流动相系统^[9-11],从分离情况和出峰时间等综合分析选择乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱为佳,峰形对称且分离度较好,保留值适宜,柱后处理简便、省时。在此基础上,对柱温进行了考察,结果显示 40 ℃ 时色谱峰的分度要优于 30 ℃ 和 35 ℃。

3.3 检测波长的选择 分别取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的甲醇溶液于 190 ~ 400 nm 扫描,结果表明这 5 个成分在 226 nm 附近

均有最大吸收,再参考文献[10],确定 226 nm 为检测波长。

应用本方法测定,5 种蒽醌成分和制剂中的其他成分可完全分离,样品制备方法简单,测定结果准确,回收率、线性、精密度均符合中药分析要求,且方法简便、快速、准确且灵敏,可用于四季三黄片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的多指标成分的含量测定,也可用于其制剂及体内指标成分的研究。

[参考文献]

[1] 卫生部药品标准. 中药成方制剂. 第 20 册[S]. 1998: 67.

[2] 张丹, 蒋心惠. 反相高效液相色谱法测定大黄药材中游离及结合型蒽醌衍生物的含量[J]. 分析化学, 2003, 31 (4): 459.

[3] 南海江, 许旭东, 陈士林, 等. 大黄属植物研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21 (4): 690.

[4] 李鑫楠, 黄毅岚, 张丹, 等. RP-HPLC 测定熊胆降热丸中的 5 种大黄蒽醌类化合物[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(6): 697.

[5] 许江红, 张若良. HPLC 法测定四季三黄片中黄芩苷的含量[J]. 江西中医学院学报, 2006, 18 (6): 12.

[6] 黄淑彰. RP-HPLC 法测定四季三黄片中栀子苷的含量[J]. 广西中医药, 2004, 27 (4): 53.

[7] 吴晓勇, 许江红, 张若良. 高效液相色谱法测定四季三黄片中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业, 2010, 19 (16): 32.

[8] 冯看, 杨黎. HPLC 测定四季三黄片中大黄素和大黄酚的含量[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11 (2): 50.

[9] 王勤, 邸多隆, 蒋生祥. 大黄类药物分析方法研究概况[J]. 中成药, 2007, 29 (8): 1199.

[10] 夏从龙, 周浓, 种佳. HPLC 测定不同厂家牛黄消炎片中 5 种蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (2): 83.

[11] 代婉莹, 孙维宏, 毛淑杰, 等. 铈水大黄外观性状与所含 5 种蒽醌成分含量的关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (9): 1.

[责任编辑 蔡仲德]