

# 高效液相色谱法测定炎可宁片中大黄素、大黄酚的含量

张大军<sup>\*</sup>, 王兆华, 李湘玉  
(吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 应用高效液相色谱法测定炎可宁片中大黄素、大黄酚的含量。方法: 采用 Shim-pack-C<sub>18</sub> 柱(5 μm, 150 × 4.6 mm), 以甲醇-0.1% 磷酸(85: 15) 为流动相, 检测波长 254 nm。结果: 大黄素、大黄酚线性范围分别为(0.016 128~ 0.080 64 μg,  $r = 0.999 7$ ; 0.032 48~ 0.162 4 μg,  $r = 0.999 8$ )。大黄素、大黄酚的回收率分别为 97.88%, RSD= 1.64%; 97.93%, RSD= 0.71%。结论: 该方法用于测定炎可宁片中大黄素、大黄酚的含量, 具有简便、准确、灵敏的特点, 可作为该制剂质量控制的制标。

[关键词] 高效液相色谱法; 大黄素; 大黄酚; 炎可宁片

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)01-0017-03

## Determination of Emodin, Chrysophanol in Yankening Tablets by HPLC

ZHANG Da-jun<sup>\*</sup>, WANG Zhao-hua, LI Xiang-yu

(Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of Emodin, Chrysophanol in Yankening tablets by high performance liquid chromatography. **Methods:** The determination was carried out on a Shim-pack-C<sub>18</sub> column(5 μm, 150 mm × 4.6 mm) eluted with the mobile phase of methanol water containing 0.1% phosphoric acid(85: 15). The detection wavelength was 254 nm. **Results:** A good linear relationship between the peak areas and the injection amounts was found for emodin within(0.016 128~ 0.080 64) μg, with a correlation coefficient of 0.999 7, for chrysophanol within(0.032 48 ~ 0.162 4) μg, with a correlation coefficient of 0.999 8. The average recovery of Emodin was 97.88% (RSD 1.64%),

and of Chrysophanol was 97.93% (RSD 0.71%). **Conclusion:** The method is simple, accurate, sensitive and can be applied to the quality control of the preparation.

[ **Key words**] HPLC; Emodin; Chrysophanol; Yankening Tablets

炎可宁片是由黄柏、大黄、黄芩等 5 味制成的中药复方制剂。收载于中华人民共和国卫生部标准,成方制剂第七册<sup>[1]</sup>,具有清热泻火,消炎止痢。用于急性扁桃腺炎,细菌性肺炎,急性结膜炎,中耳炎,疖痈瘰疬,急性乳腺炎,肠炎,细菌性痢疾及急性尿道感染。为控制本品的质量,本文采用高效液相色谱法测定了炎可宁片中大黄素,大黄酚的含量,作为内在质量控制指标之一。

## 1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10 AT 高效液相色谱仪; SPD-10A 紫外检测器; KQ-250 型超声波处理器; 大黄素, 大黄酚对照品(购于中国药品生物制品检定所, 大黄素的批号: 110756-200110, HPLC 面积归一化法, 测定含量为 98.87%; 大黄酚的批号: 796-200204 HPLC 面积归一化法, 测定含量为 98.56)。炎可宁片由吉林省鑫辉药业有限公司提供; 其它化学试剂均为国产, AR 级。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[2]</sup> 色谱柱: Shim-pack-C<sub>18</sub> 柱(5 μm, 4.6 mm × 150 mm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水(85:15), 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>, 紫外检测波长: 254 nm, 理论塔板数按大黄素计算, 不低于 3 000; 柱温为室温。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取大黄素、大黄酚对照品各约 5 mg, 分别置于 50 mL 的量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 分别精密量取大黄素溶液 1 mL, 大黄酚溶液 2 mL, 置于 25 mL 的量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即为对照品溶液(每 1 mL 中含大黄素约 4 μg、大黄酚约 8 μg)。

**2.3 供试品溶液的制备** 取本品 20 片, 精密称定, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 以甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置 50 mL 锥形瓶中, 挥去甲醇, 加 8% 盐酸溶液 10 mL, 超声处理(功率为 180 W, 频率为 60 kHz) 5 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 冷却, 移置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液用三氯甲烷萃取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 60 °C 以下挥去三氯甲烷, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量

瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 阴性对照溶液的制备** 按处方量制备不含大黄药材的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪中, 按上述条件测定, 结果表明, 阴性对照溶液色谱图中与对照品位置处无干扰, 此法可行。

## 2.5 线性关系考察

**2.5.1 大黄素线性关系考察** 精密称取大黄素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 4.032 μg 的溶液。精密吸取此溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定其峰面积, 以峰面积值对进样量进行回归, 得回归方程为:  $Y = 2.58 \times 10^6 X - 1.06 \times 10^4$ ,  $r = 0.9997$ , 结果表明大黄素在 0.016 128 ~ 0.080 64 μg 范围内, 进样量与峰面积呈良好的线性关系。

**2.5.2 大黄酚线性范围考察** 精密称取大黄酚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 8.12 μg 的溶液。精密吸取此溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定其峰面积, 以峰面积值对进样量进行回归, 得回归方程为:  $Y = 2.93 \times 10^6 X - 1.66 \times 10^4$ ,  $r = 0.9998$ , 结果表明大黄酚在 (0.032 48 ~ 0.162 4) μg 范围内, 进样量与峰面积呈良好的线性关系。

**2.6 精密度试验** 精密吸取供试品溶液连续 5 次重复进样, 测得大黄素、大黄酚的相对偏差分别为 RSD= 0.33% RSD= 0.84%。

**2.7 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液在 0.2 4.6 h, 分别进样, 进行测定。结果大黄素、大黄酚峰面积的相对偏差分别为 RSD= 0.95%, RSD= 1.15%, 表明在 6 h 内供试品溶液的大黄素、大黄酚含量稳定。

**2.8 重复性试验** 精密称取同一批号样品 5 份, 按供试品溶液的制备方法制备, 依法进样分析, 样品中大黄素、大黄酚含量的相对偏差分别 RSD= 2.17%、RSD= 1.79%, 结果表明其重复性良好。

**2.9 加样回收率试验** 精密称取大黄素、大黄酚对照品适量, 加入到已测大黄素、大黄酚含量的炎可宁

片样品(批号:20080801;大黄素含量 $0.2150\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ;大黄酚含量 $1.4862\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )中,精密加入甲醇 250 mL,回流提取 30 min,精密吸取提取液 5 mL 按供试品制备项下方法操作,制得供试品溶液,精密吸取供试品溶液 5  $\mu\text{L}$ ,进样分析并计算大黄素、大黄酚含量,计算回收率,测定结果见表 1 2。

表 1 大黄素回收率试验测定结果

NO	样品取量(g)	样品中大黄素含量(mg)	大黄素对照品加入量(mg)	实测值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	6.8956	1.4826	1.68	3.1194	97.43		
2	7.0035	1.5058	1.64	3.1334	99.24		
3	6.9457	1.4933	1.63	3.1191	99.74	97.88	1.64
4	6.8953	1.4825	1.73	3.1402	95.82		
5	6.9243	1.4887	1.71	3.1501	97.16		

表 2 大黄酚回收率试验测定结果

NO	样品取量(g)	样品中大黄素含量(mg)	大黄素对照品加入量(mg)	实测值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	6.8956	10.2482	1.85	12.0756	98.78		
2	7.0035	10.4086	1.78	12.1473	97.68		
3	6.9457	10.3227	1.77	12.0657	98.47	97.93	0.71
4	6.8953	10.2478	1.93	12.1332	97.69		
5	6.9243	10.2909	2.11	12.3380	97.02		

2.10 样品的含量测定 按上述方法,制备供试品溶液,测定 3 批炎可宁中大黄素、大黄酚的含量,结果见表 3。

表 3 炎可宁片中大黄素、大大黄酚含量测定结果

批号	大黄素和大黄酚总含量(mg/片)	
20080801	0.419	0.418
20080802	0.407	0.405
20080803	0.414	0.413
20080901	0.428	0.423
20080902	0.411	0.413
20080903	0.409	0.410
20080904	0.406	0.405
20080905	0.418	0.416
20080906	0.409	0.411
20080907	0.413	0.415

根据上述测定结果表明,炎可宁片中大黄素、大黄酚总含量基本稳定,暂定为每片含大黄素和大黄酚总量不得少于 0.40 mg。

### 3 讨论

有关大黄素、大黄酚的 HPLC 含量测定方法较多,流动相有采用乙腈、甲醇、水、冰醋酸等系统<sup>[3,4]</sup>。我们以实验摸索,采用甲醇、磷酸水系统,色谱分离效果较为满意,分离度及峰形对称性较好。

供试品溶液制备考察,大黄素、大黄酚易溶于三氯甲烷,故采用三氯甲烷为提取溶剂;对供试品提取方法进行了考察,采用超声提取和加热回流提取方法,测定结果分别为大黄素、大黄酚总量分别为  $1.548\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $1.715\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,加热回流提取方法含量明显高,提取完全,故选用加热回流提取方法制备供试品溶液;对加热回流提取时间进行了考察,取供试品分别以 0.5、1.0、1.5 h 进行提取,测定结果大黄素、大黄酚总量分别为  $1.458\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $1.714\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $1.715\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,加热回流提取 1 h 以上,可使大黄素、大黄酚完全提出,为了缩短检测时间,故确定超声提取时间为 1 h;对三氯甲烷萃取次数的选择,取供试品分别以二次、三次、四次进行萃取,测定结果大黄素、大黄酚总量分别为  $1.463$ 、 $1.715$ 、 $1.716\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,用三氯甲烷萃取 3 次以上,可使有效成分提取充分,为缩短检测时间,故确定以三氯甲烷萃取 3 次为宜。

本实验方法,用于测定炎可宁片中大黄素、大黄酚的含量,具有简便、准确、灵敏等特点。

### [参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准.成方制剂[S].第七册,1993:104.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部,北京:化学工业出版社,2000:267.

[3] 董丽萍,刘传玲,姚尚辰,等.HPLC法测定牛黄消炎片中大黄素与大黄酚的含量[J].中国药事,2008,22(3):247.

[4] 肖培云,杨永寿,刘光明.HPLC同时测定小儿导赤片中大黄素、大黄酚的含量[J].中成药,2008,30(2):280-282.