

HPLC 法测定清胰片中芦荟大黄素、 大黄酸、大黄素、大黄酚的含量

王洪志* , 范俊婷, 刘 勇, 樊 华, 李婉晴
(天津市南开医院, 天津 300100)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定清胰片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚的含量。方法: 色谱柱为 TIANHE-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 10 μm), 流动相: 甲醇-0.1% 高氯酸(75: 25), 检测波长 254 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C。结果: 芦荟大黄素、大黄素在(0.062 4~ 0.312) μg·mL⁻¹ 范围内线性良好; 芦荟大黄素 $r = 0.999 9$ 、大黄素 $r = 0.999 2$; 大黄酸、大黄酚在(0.156~ 0.780) μg·mL⁻¹ 范围内线性良好, 大黄酸 $r = 0.999 8$ 、大黄酚 $r = 0.999 9$; 样品平均回收率为: 芦荟大黄素 99.31%, RSD= 1.71%; 大黄酸 99.65%, RSD= 0.56%; 大黄素 99.10%, RSD= 1.82%; 大黄酚 99.51%, RSD= 1.24%。结论: 该方法可靠、准确, 专属性强, 重复性好, 可用于该制剂质量控制。

[关键词] 清胰片; 高效液相色谱法; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)09-0013-03

Determination of Aloemodin, Rhein, Emodin and Chrysophanol in Qingyi Tablets by HPLC

WANG Hong-zhi* , FAN Jun-ting , LIU Yong , FAN Hua , LI Wan-qing
(Tian Jin Nan Kai Hospital , Tian jin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of aloemodin, rhein, emodin and chrysophanol in Qingyi Tablets by HPLC. **Method:** C₁₈ column was used with mobile phase consisted of methanol-0.1% . Perchloric acid solution(75: 25) , at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ . The detecting wavelength was set at 254nm. **Result:** The linearity of this method was good in the ranges of (0.062 4~ 0.312) μg for aloemodin ($r = 0.999 9$); (0.156~ 0.780) μg for rhein ($r = 0.999 8$); (0.062 4~ 0.312) μg for emodin ($r = 0.999 2$); (0.156~ 0.780) μg for chrysophanol($r = 0.999 9$) . The recoveries of aloemodin, rhein, emoclin and chrysophanol were 99.31% , 99.65% , 99.10% and 99.51% . RSD were 1.71% , 0.56% , 1.82% and 1.24% , respectively. **Conclusion:** The method is accurate, precise and is suitable for assayment of aloemodin, rhein, emodin and chrysophanol in Qingyi Tablets.

[Key words] Qingyi Tablets; HPLC; aloemodin; rhein; emodin; chrysophanol

清胰片是由大黄、白芍、黄芩等 7 味中药组成的纯中药制剂, 具有清热解毒, 通里攻下, 调气疏肝, 缓急止痛的功效。为了有效控制该制剂质量, 采用 HPLC 法测定方中君药大黄的主要成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚含量。建立了可靠、准确, 专属性强的质量控制方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(岛津 LC-10AT), 威玛龙色谱数据工作站, MP200A 型电子天平(上海第二天平仪器厂), LIBROR AEG-120 型电子天平(SHIMADZD CORPORATION), TDA 系列温度显示调节仪 8002 型水浴锅(天津市中环科技开发公司), KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声波仪器厂)。

1.2 试药 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚(中国药品生物制品检定所购置, 为含量测定用对照品), 清胰片本院制剂样品 3 批(批号: 20071016,

[收稿日期] 2008-03-10

[通讯作者] * 王洪志, Tel: (022) 23540116; E-mail: down9669@yahoo.com

20071221, 20080203), 实验用阴性对照品采用与样品清胰片相同的工艺制备, 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Tianhe-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 10 μm) 分析柱; 流动相: 甲醇-0.1% 高氯酸 (75:25); 检测波长: 254 nm, 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C。理论塔板数按大黄素峰计算应不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含各 0.025 mg 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取片剂研细, 精密称取 1.0 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 3.75 mol·L⁻¹ 硫酸 1.5 mL, 室温振摇 5 min, 加三氯甲烷 30 mL, 水浴加热 (90 °C) 回流 1 h, 立即冷却, 吸出氯仿液, 用氯仿洗涤残渣至无色, 合并氯仿液, 加无水硫酸钠 4.5 g, 脱水, 滤过, 用少量氯仿洗涤残渣, 合并, 回收氯仿, 用甲醇溶解残渣, 定溶至 25 mL, 摇匀, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 取缺大黄的阴性样品 1.0 g, 按供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液。

2.5 标准曲线的制备 取芦荟大黄素和大黄素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 mL 各含 31.2 μg 的溶液, 另取大黄酸和大黄酚对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 mL 含 78 μg 的溶液, 作为储备液, 再分别精密量取 2, 4, 6, 8, 10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 分别精密吸取上述 5 种浓度的对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 以进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线回归方程分别为: 芦荟大黄素 $Y = 1.67 \times 10^5 X + 1.37 \times 10^4$, $r = 0.999 9$; 大黄素 $Y = 3.01 \times 10^5 X + 5.14 \times 10^4$, $r = 0.999 2$; 芦荟大黄素、大黄素在 (0.062 4~0.312) μg 范围内线性良好, 大黄酸 $Y = 2.44 \times 10^5 X + 3.30 \times 10^3$, $r = 0.999 8$; 大黄酚 $Y = 5.51 \times 10^5 X + 3.74 \times 10^3$, $r = 0.999 9$; 大黄酸、大黄酚在 (0.156~0.780) μg 范围内线性良好。

2.6 精密度考察 取同一浓度标准品溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 记录峰面积, 考察仪器精密度。结果芦荟大黄素 RSD 为 0.15%, 大黄酸 RSD 为 0.44%, 大黄素 RSD 为 0.08%, 大黄酚 RSD 为 0.17%。

2.7 重复性考察 取同一批号 (20080203) 清胰片, 取 6 份, 研细, 取 1.0 g, 按照 2.3 项方法制备, 每次

进样 10 μL, 测定每份清胰片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚含量。芦荟大黄素平均含量为 0.578 mg·g⁻¹, RSD 为 1.95%, 大黄酸平均含量为 0.839 mg·g⁻¹, RSD 为 1.59%, 大黄素平均含量为 0.444 mg·g⁻¹, RSD 为 1.89%, 大黄酚平均含量为 1.023 mg·g⁻¹, RSD 为 1.74%。

2.8 稳定性考察 取供试品溶液, 分别在 0, 3, 9, 14, 17 h 进样 10 μL, 记录峰面积, 考察其稳定性, 结果芦荟大黄素 RSD 为 0.06%, 大黄酸 RSD 为 0.20%, 大黄素 RSD 为 0.11%, 大黄酚 RSD 为 0.21%, 考察结果表明, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素和大黄酚在 17 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 精密称定已知含量的供试品适量, 分别加入一定量的对照品, 按 2.3 项的方法制备。分别进样 10 μL, 同时取相应浓度的对照品 10 μL 进行测定, 计算加样回收率, 结果芦荟大黄素平均回收率为 99.31%, RSD 为 1.71%; 大黄酸平均回收率为 99.65%, RSD 为 0.56%; 大黄素平均回收率为 99.10%, RSD 为 1.82%; 大黄酚平均回收率为 99.51%, RSD 为 1.24%。结果见表 1。

表 1 大黄各组分加样回收率试验

成分	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
芦荟大黄素	0.289	0.290	0.580	100.35	99.31	1.71
	0.288	0.290	0.577	99.65		
	0.289	0.290	0.575	98.62		
	0.289	0.290	0.578	99.65		
	0.288	0.290	0.573	98.26		
大黄酸	0.289	0.290	0.577	99.31	99.65	0.56
	0.420	0.420	0.839	99.76		
	0.419	0.420	0.833	98.57		
	0.419	0.420	0.839	100.00		
	0.419	0.420	0.838	99.76		
大黄素	0.419	0.420	0.837	99.52	99.10	1.82
	0.419	0.420	0.836	99.28		
	0.222	0.220	0.442	100.00		
	0.222	0.220	0.441	99.55		
	0.222	0.220	0.440	99.10		
大黄酚	0.222	0.220	0.441	99.55	99.51	1.24
	0.221	0.220	0.438	98.64		
	0.222	0.220	0.437	97.75		
	0.512	0.510	1.021	99.80		
	0.511	0.510	1.017	99.22		
大黄素	0.511	0.510	1.020	99.80	99.51	1.24
	0.511	0.510	1.022	100.20		
	0.511	0.510	1.014	98.63		
	0.511	0.510	1.018	99.41		

2.10 样品测定 取3个批号的清胰片样品,按照供试品溶液制备,配制标准混合溶液,芦荟大黄素、大黄素、大黄酚均为 $31.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大黄酸 $35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。吸取对照品溶液及供试品溶液 $10 \mu\text{L}$,记录色谱图,以外标法计算样品中,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素和大黄酚含量。结果见表2。

表2 3批样品含量测定结果

批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	含量之和(mg/片)
20071016	0.488	0.687	0.395	0.842	2.402
20071221	0.583	0.830	0.422	1.023	2.858
20080203	0.534	0.890	0.416	0.919	2.705

3 讨论

本实验对样品提取条件进行了筛选,分别用

$1.88 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $3.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液 1.5 mL ,进行酸化;氯仿回流提取时间为 0.5 h 与 1 h ,结果表明用 $3.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸, 1.5 mL 酸化,氯仿回流提取 1 h ,所测含量最好。

在选择流动相时,依据文献^[1]选用甲醇: 0.1% 高氯酸溶液,当其比例为(75:25)时,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素和大黄酚的峰与其它相邻组分的峰分离效果最好,基线平直,峰形对称,无其它组分及辅料干扰。

[参考文献]

- [1] 陈宁根,黄新生. HPLC法测定三黄片中大黄素及大黄酚的含量[J]. 药品检验,1999,8(8):33.