

高效液相色谱法测定退障凝胶中大黄素、大黄酚的含量

王国华, 李 慧, 聂其霞, 臧 琛, 张保献*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定退障凝胶中大黄素、大黄酚含量的方法。方法: 采用 Waters 高效液相色谱仪 (Waters 2695-2487 系统); Empower 色谱工作站; 色谱柱 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液 (82: 18); 紫外检测波长 254 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL。结果: 大黄素在 0.02~ 0.125 μg 范围内呈现良好的线性关系, 大黄酚在 0.072~ 0.360 μg 范围内呈现良好的线性关系, 大黄素、大黄酚的加样回收率分别为 99.1%, 99.2%。结论: 该法简便, 准确, 具有专属性, 可用于退障凝胶的质量控制。

[关键词] 退障凝胶; 大黄素; 大黄酚; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0014-03

Quantitative Determination of Emodin and Chrysophanol in Tuizhang Hydrogel by HPLC

WANG Guo-hua, LI Hui, NIE Qi-xia, ZANG Chen, ZHANG Bao-xian*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Medicinal Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for analysis of emodin and chrysophanol in Tuizhang Hydrogel. **Method:** The emodin and chrysophanol in Tuizhang Hydrogel were separated on a Chromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with the mobile phase of methanol-0.1% Phosphoric acid (82: 18). The flowrate was 1.0 mL·min⁻¹, and the UV detector wavelength was set at 254 nm. **Results:** The calibration curves were linear over the concentration range of 0.025~ 0.125 μg for emodin and 0.072~ 0.360 μg for chrysophanol. The recoveries of the emodin and chrysophanol were 99.1%, 99.2%, respectively. **Conclusion:** The method was simple and accurate, it can be used for the determination of emodin and chrysophanol in Tuizhang Hydrogel.

[Key words] Tuizhang hydrogel; Emodin; Chrysophanol; HPLC; assay

退障凝胶由退障眼膏改剂型而来, 退障眼膏原载于部颁标准中药成方制剂第十二册^[1], 主要有决明子、何首乌、木贼、谷精草等 19 味药组成, 具有明目退翳之功效, 可用于治疗初发白内障和角膜斑翳。现代研究表明, 退障眼膏通过提高睫状肌舒缩能力, 增强晶状体弹性, 抑制晶状体混浊发展以及兴奋视网膜感光细胞的新陈代谢作用, 进而达到提高视力目的。原制剂质量控制中只有一个薄层鉴别, 为更好地控制制剂质量, 我们运用高效液相法测定了制

剂中大黄素、大黄酚的含量, 为该制剂的质量控制提供了参考依据。

1 仪器与试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器 (美国 Waters 公司), Empower 色谱工作站; 退障凝胶, 自制; 大黄素对照品 (批号 0756-9707, 中国药品生物制品检定所); 大黄酚对照品 (批号 110796-200412, 中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱 Kromasil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-

[收稿日期] 2006-12-12

[通讯作者] * 张保献, Tel: (010) 84014127

0.1% 磷酸溶液(82:18); 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 254 nm。理论塔板数以大黄素、大黄酚计均不低于 3 000, 分离度均大于 1.5。在此色谱条件下, 供试品

中大黄素、大黄酚能与其他成分较好分离, 空白对照在大黄素、大黄酚处均无干扰, 见图 1。

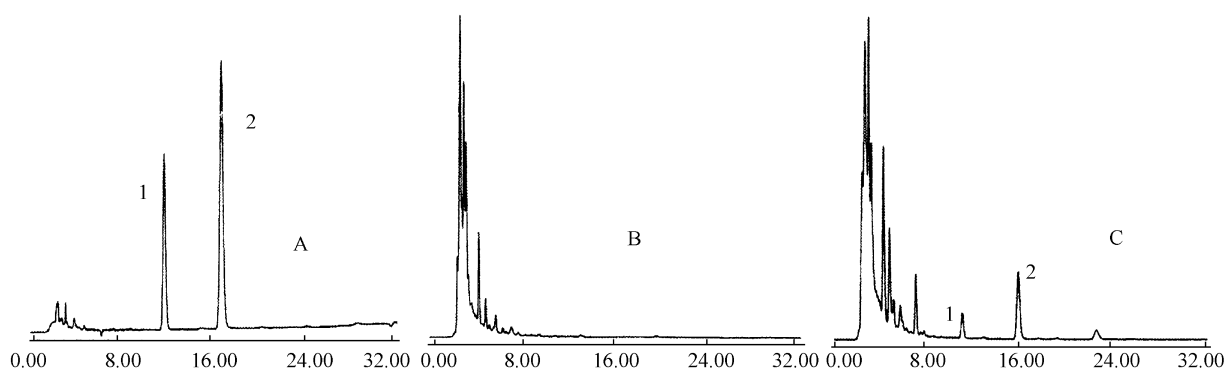


图 1 退障凝胶 HPLC 图

A. 大黄素、大黄酚混合对照品; B. 空白对照; C. 供试品; 1. 大黄素; 2. 大黄酚

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取大黄素、大黄酚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含大黄素 5 μg , 大黄酚 14.4 μg 的混合标准溶液。

2.2.2 供试品溶液 取凝胶样品 0.5 g, 精密称定, 加 40 mL 水溶解, 并转移至 250 mL 平底烧瓶中, 再依次加入 10 mL HCL, 50 mL 三氯甲烷, 沸水浴中回流 1 h, 取出, 立即冷却, 分取三氯甲烷层, 酸水液用三氯甲烷萃取 3 次, 每次 30 mL, 合并三氯甲烷液, 回收三氯甲烷, 残渣用甲醇溶解, 并转移至 5 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 空白对照溶液 按处方比例称取不含决明子、何首乌的药材, 按退障凝胶的制备方法制成缺决明子、何首乌的空白凝剂剂, 按 2.2.2 方法制成空白对照溶液。

2.3 线性关系考察 分别精密量取混合标准品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 分别以进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 并以最小二乘法计算得回归方程, 大黄素: $Y_1 = 4.552 \times 10^6 X_1 - 4.007 \times 10^3$ ($r = 0.9999$, $n = 5$); 大黄酚: $Y_2 = 5.924 \times 10^6 X_2 - 1.404 \times 10^4$ ($r = 0.9999$, $n = 5$)。结果表明, 大黄素在 0.025~0.125 μg 范围内线性关系良好; 大黄酚在 0.072~0.360 μg 范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密吸取供试品溶液 20 μL , 在上述同一色谱条件下, 连续进样 6 次, 测定大黄素、大黄酚的峰面积并计算 RSD 值, 结果大黄素、大黄酚的 RSD 值分别为 0.51%, 0.42%。

2.5 重复性试验 用同一批号退障凝胶平行制备 6 份供试品溶液, 在上述同一色谱条件下, 分别进样 20 μL , 测定大黄素、大黄酚的峰面积并计算含量的 RSD 值, 结果大黄素、大黄酚的 RSD 值分别为 1.2%, 1.1%。

2.6 稳定性试验 取新鲜制备的供试品溶液, 在上述同一色谱条件下, 在第 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 分别进样 20 μL , 测定大黄素、大黄酚的峰面积并计算 RSD 值, 结果大黄素、大黄酚的 RSD 值分别为 0.18%, 0.38%, 表明大黄素、大黄酚在 48 h 内稳定。

2.7 回收率试验 采用加样回收法, 精密称取已知含量的退障凝胶样品 6 份, 分别精密加入一定量的大黄素、大黄酚对照品, 按 2.2.2 方法制备样品溶液。计算大黄素、大黄酚的回收率。结果见表 1, 2。

表 1 大黄素加样回收率测定结果

| 样品中含量 (μg) | 加入量 (μg) | 测出量 (μg) | 检出量 (μg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|-----------|---------|
| 0.028 0 | 0.025 0 | 0.053 4 | 0.025 4 | 101.6 | 99.1 | 1.4 |
| 0.025 3 | 0.025 0 | 0.049 9 | 0.024 6 | 98.4 | | |
| 0.025 7 | 0.025 0 | 0.050 4 | 0.024 7 | 98.9 | | |
| 0.025 4 | 0.025 0 | 0.049 9 | 0.024 5 | 98.0 | | |
| 0.026 2 | 0.025 0 | 0.050 8 | 0.024 6 | 98.4 | | |
| 0.026 5 | 0.025 0 | 0.051 3 | 0.024 8 | 99.2 | | |

表 2 大黄酚加样回收率测定结果

| 样品中含量 (μg) | 加入量 (μg) | 测出量 (μg) | 检出量 (μg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|-----------|---------|
| 0.075 4 | 0.072 0 | 0.148 3 | 0.072 9 | 101.2 | 99.2 | 1.2 |
| 0.068 2 | 0.072 0 | 0.139 3 | 0.071 1 | 98.7 | | |
| 0.067 5 | 0.072 0 | 0.138 7 | 0.071 2 | 98.9 | | |
| 0.067 6 | 0.072 0 | 0.137 9 | 0.070 3 | 97.6 | | |
| 0.069 2 | 0.072 0 | 0.140 3 | 0.071 1 | 98.8 | | |
| 0.070 2 | 0.072 0 | 0.142 0 | 0.071 8 | 99.7 | | |

2.8 含量测定 按上述方法, 分别对制备的五批退障凝胶中的大黄素、大黄酚的含量进行测定。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

| 样品批号 | 大黄素含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | 大黄酚含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) |
|--------|--|--|
| 060822 | 15.0 | 59.8 |
| 060918 | 14.5 | 58.6 |
| 061026 | 15.6 | 60.4 |
| 061101 | 15.5 | 60.4 |
| 061120 | 15.2 | 60.2 |

3 小结和讨论

在供试品溶液制备过程中, 曾对水解方式及水解条件进行过考察: 水解方式, 水解后萃取与加入三氯甲烷两相回流萃取相比, 后者萃取效果较好; 酸的种类, 盐酸与硫酸相比较, 硫酸水解易糊化, 选择盐酸较好; 酸的加入量, 加入 8, 10, 12 mL 相比, 加入 8 mL 水解不完全, 加入 10, 12 mL 没有区别; 水解时

间, 分别水解 30, 60, 90 min, 结果 60 min 即可水解完全; 故最终确定 2.2.2 项下方法作为供试品溶液的制备方法。

试验结果表明, 在上述实验条件下, 指标成分的稳定性, 方法的重现性和加样回收率等均符合定量的要求, 该方法可以作为退障凝胶中大黄素、大黄酚的含量测定方法来控制该制剂的质量。

[参考文献]

- [1] 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. 18.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂第十二册, 北京: 卫生部药典委员会编, 1997. 149.
- [3] 王京霞, 许家鸾. 决明子中大黄素和大黄酚含量的测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 49.
- [4] 原永芳, 刘爱, 等. 脂康口服液中大黄素和大黄酚的 HPLC 定量分析[J]. 中国药师, 2004, 7(12): 940-942.