

HPLC 法测定胃血止糊剂中大黄素和大黄酚的含量

李湘宏¹, 余晓玲², 姜莉云²

(1. 南华大学附属南华医院药剂科, 湖南 衡阳 421002; 2. 云南昆明市中医医院药剂科)

摘要: **目的** 通过测定胃血止糊剂中大黄素和大黄酚含量, 为控制该制剂质量提供相关指标和方法。**方法** 用高效液相色谱(HPLC)建立测定大黄中大黄素和大黄酚含量的方法。**结果** 大黄素和大黄酚的平均回收率为 97.56%, 98.81%, 变异系数(RSD)分别为 1.27%, 1.47%。大黄素的回归方程为 $y = 2\ 842.3x - 4.159\ 1$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围为 0.009 2 ~ 0.184 μg ; 大黄酚的回归方程为 $y = 4\ 080x - 5.985\ 3$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围为 0.020 8 ~ 0.416 μg 。**结论** 本文建立的 HPLC 法测定大黄素和大黄酚在胃血止糊剂中的含量, 简便易行, 重现性好, 具有一定的专属性, 可作为该药质量控制的指标和方法。

关键词: 胃血止糊剂; 高效液相色谱; 大黄素; 大黄酚

中图分类号: R927.2 文献标识码: A

Determination of the Archin and Chrysophanol in Bastric Blood Paste by HPLC

LI Xianghong, YU Xiaoling, JIANG Liyun

(Department of Pharmacy, Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

Abstract: **Objective** To determine the content of archin and chrysophanol in gastric blood paste, by which provide the indexes for evaluating the preparation quality control. **Methods** To establish the method of determination of archin and chrysophanol in rhubarb by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The average recovery of Emodin or Chrysophanol was 97.56%, 98.81%, and the relative standard deviation (RSD) was 1.27%, 1.47%, respectively. The regression equation of archin is $y = 2\ 842.3x - 4.159\ 1$ ($r = 0.999\ 9$), the linear range is 0.009 2 ~ 0.184 μg . The regression equation of chrysophanol is $y = 4\ 080x - 5.985\ 3$ ($r = 0.999\ 8$), the linear range is 0.020 8 ~ 0.416 μg . **Conclusions** The HPLC method set for determination of Archin and Chrysophanol in Bastric Blood Paste in this study is Simple, good for repetition and Specialization, which could provide the indexes for evaluating the preparation quality control.

Key words: stomach blood paste; HPLC; archin; chrysophanol

胃血止糊剂的君药为白及与 大黄, 白及的主要成分为白及胶等, 其有效成分尚不完全清楚, 但关于白及的含量测定文献报道较少, 而大黄的有效成分较为清楚, 主要为蒽醌、有机酸、鞣质等^[1-5]。因此, 选用大黄中的大黄素和大黄酚作为含量测定成分, 建立测定胃血止糊剂中大黄素和大黄酚方法对检察本药的质量具有重要意义。

1 材料与 方法

1.1 仪器

Agilent-1100 高效液相色谱仪(包括真空脱气泵, 四元泵, 自动进样器, DAD 检测器); FA1004 型电子天平(万分之一, 上海精密科学仪器有限公司), 色谱柱为 Diamonsil™ C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

1.2 药品与试剂

大黄素(批号 110756-200110)和大黄酚(批号 110796-200514)对照品购自中国药品生物制品检定所; 胃血止糊剂供试品(批号: 110308)由昆明市中医医院制剂室提供。甲醇、磷酸等流动相所用试剂

收稿日期: 2011-11-04

基金项目: 云南省卫生厅院内制剂专项资助项目—云财社[2005]198号。

通讯作者: 余晓玲, 电话: 0871-3129342, E-mail: yxl9810@yahoo.

com.cn.

均为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为注射用水。

1.3 方法

1.3.1 溶液制备 分别精密称取大黄素、大黄酚对照品适量,加无水乙醇制成每 1 mL 含大黄素 9.2 μg,大黄酚 20.8 μg 制成对照品溶液。

胃血止糊剂研细、混匀,精密称定 5 g,置具塞锥形瓶中,加入无水乙醇 50 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用无水乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密吸取续滤液 25 mL,置烧瓶中,水浴蒸干,加 2.5 mol/L 硫酸溶液 20 mL,超声处理 2 min,再加三氯甲烷 20 mL,加热回流 1 h,放冷,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,酸液再用三氯甲烷萃取 4 次,每次 15 mL,合并三氯甲烷液,加 2 g 无水硫酸钠脱水,60 ℃ 水浴挥干,残渣加无水乙醇使溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀、滤过,取续滤液,即得供试品溶液。阴性样品液制备按处方量称取除大黄以外的所有药材,按样品制备工艺制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性样品液。

1.3.2 色谱条件的建立 使用二极管阵列检测器通过大黄素和大黄酚的对照品色谱图调取大黄素和大黄酚峰的光谱图,参照《中国药典》2010 版一部确定检测波长。

选用 Agilent-1100 高效液相色谱仪,色谱柱为 Diamonsil™ C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相

的选择参照文献[6],通过预实验选用甲醇和 0.2% 磷酸 (78 : 22) 组成流动相。流动相流速 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,理论板数按大黄素峰计算应不低于 3 000。

1.3.3 线性关系的测定 分别精密吸取对照品溶液(每 1 mL 含大黄素 9.2 μg,大黄酚 20.8 μg)1、2、5、10、15、20 μL 注入液相色谱仪,按色谱条件测定峰面积,以峰面积(A)为纵坐标,进样量(C)为横坐标,绘制标准曲线,并计算回归方程。结果大黄素的回归方程为 $y = 2\,842.3x - 4.1591$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.0092 ~ 0.184 μg;大黄酚的回归方程为 $y = 4\,080x - 5.9853$ ($r = 0.9998$),线性范围为 0.0208 ~ 0.416 μg。表明大黄素与大黄酚在线性范围内峰面积与进样量有良好的线性关系。

1.3.4 方法的质控 通过稳定性试验测定样品的稳定性;通过重复性试验和准确度试验,计算变异度(relative standard deviation, RSD)和回收率进行方法的质控分析。

2 结 果

2.1 检测波长的确定

从图 1 可以看出大黄素和大黄酚光谱图相似,均在 225 nm、254 nm 处有最大吸收,参照《中国药典》2010 版一部,选取 254 nm 作为检测波长。

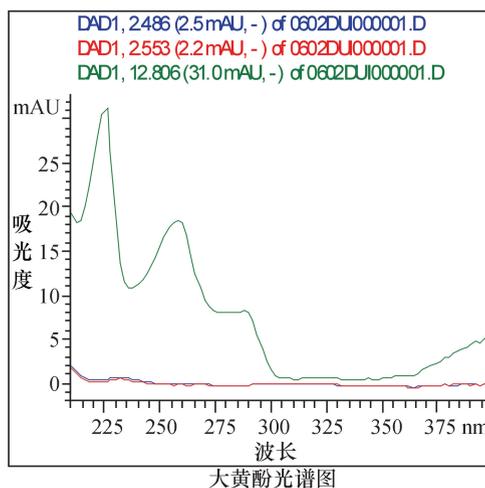
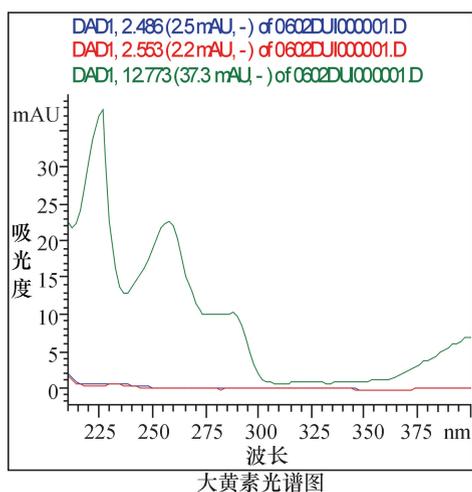


图 1 标准品大黄素和大黄酚的光谱图

Fig. 1 Spectrogram of emodin or chrysophanol

2.2 系统适用性试验

在色谱条件下,取对照品大黄素、大黄酚及供试

品适量依法配制对照品溶液和供试品溶液,分别取 10 μL 注入液相色谱仪进行测定。系统适用性测定

结果见表1;色谱图见图2和图3。从图2可以看出,大黄素和大黄酚的出峰保留时间分别是15.931 min和23.239 min,其峰曲线下面积也分别是256.511 4和840.302 5。图3显示,胃血止糊剂中大黄素和大黄酚的出峰保留时间分别是15.871 min和23.206 min,其峰曲线下面积也分别是185.835 4和746.039 8,这和对照品相一致,说明这种测定方法适用本研究。

表1 系统适用性试验结果

Table 1 System suitability test results

组别	测试品	理论塔板数	分离度(%)		拖尾因子
			前	后	
对照品	大黄素	8 562	—	—	0.99
	大黄酚	12390	—	—	0.98
供试品	大黄素	7 547	7.60	2.63	0.96
	大黄酚	12 095	4.13	9.30	1.01

“—”代表不需测定

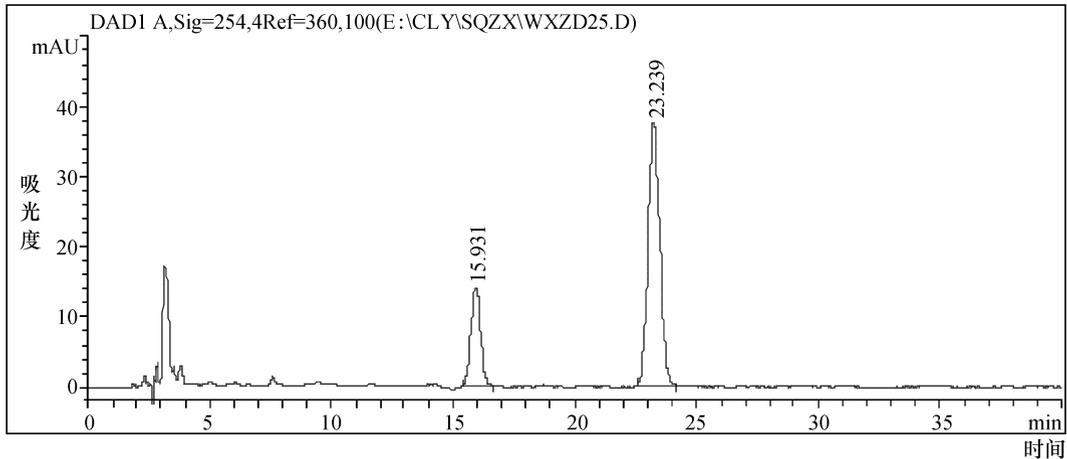


图2 对照品大黄素、大黄酚色谱图

Fig. 2 The standard chromatogram of Emodin and chrysophanol

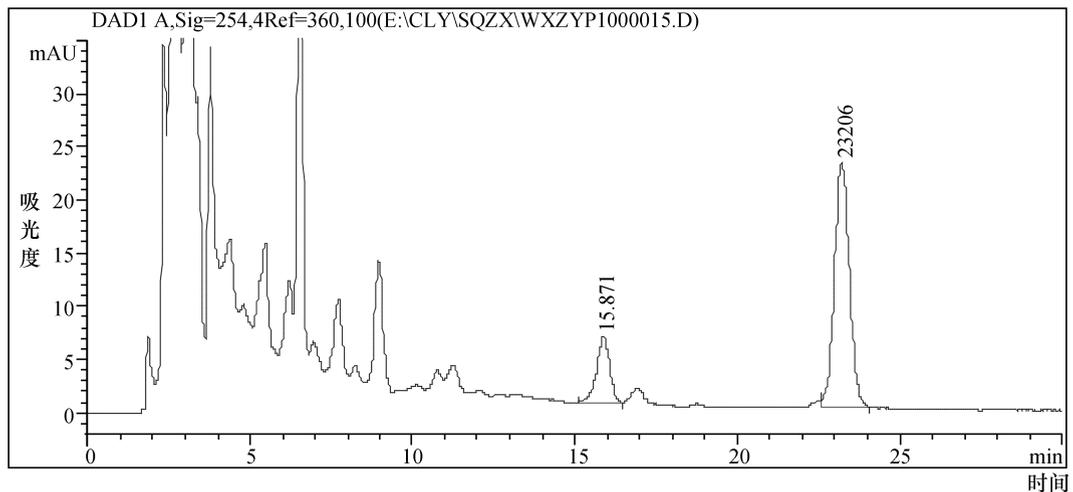


图3 胃血止糊剂色谱图

Fig. 3 Chromatogram of stomach blood paste

2.3 阴性对照试验

取标准品、供试品和阴性样品液各10 μ L注入液相色谱仪,比较色谱图。试验结果表明供试品的色谱图中,有二个色谱峰与大黄素对照品及大黄酚对照品色谱峰的保留时间一致,空白样品的色谱图

中在与对照品相同保留时间($\pm 5\%$)位置上没有吸收峰,说明该制剂中的其它药物及辅料对大黄素、大黄酚的含量测定没有干扰,用本法测定其含量专属性较强、灵敏度高。阴性色谱图见图4。

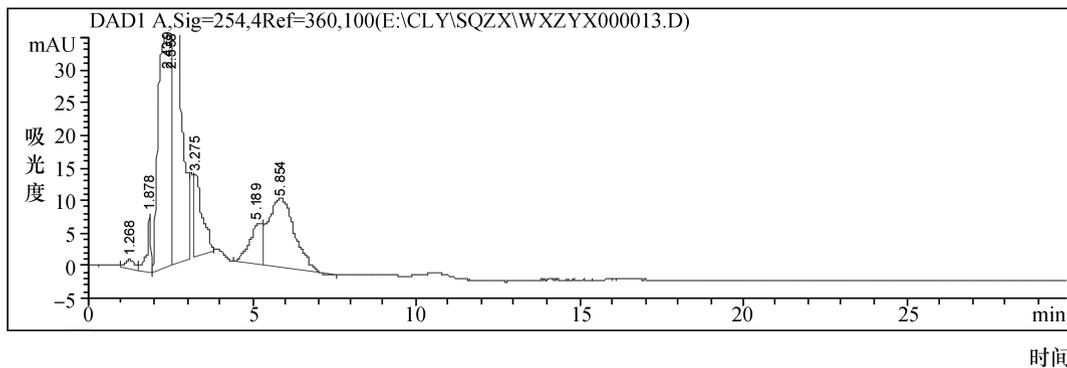


图 4 阴性色谱图

Fig. 4 Chromatogram of negative

2.4 稳定性试验

取大黄素、大黄酚标准品和供试品适量,依法制备对照品溶液(0.009 2 mg/mL、0.020 8mg/mL)和供试品溶液,于第 0、4、8、12、16 h,分别吸取 10 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积。结果表明对照品及供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.5 重复性试验

取同一批胃血止糊剂,研细、称取 6 份,每份精密称定 5.0 g,按供试品溶液制备方法制备供试液,进行含量测定。结果表明:6 份样品的 RSD(%) < 3%,表明本法具有较好的重现性(表 2)。

表 2 重复性试验结果(n=6)

Table 2 Repeatability test results(n=6)

序号	样品量(g)	大黄素含量(%)	大黄酚含量(%)
1	5.103 3	0.006 7	0.018 5
2	5.006 9	0.006 5	0.017 8
3	5.035 1	0.006 8	0.018 1
4	5.106 7	0.007 0	0.018 9
5	4.996 3	0.006 9	0.018 6
6	5.235 6	0.006 6	0.018 5
平均	—	0.006 75	0.018 4
RSD(%)	—	2.77	2.12

—:不需测定;RSD:变异度

2.6 准确度试验

取同一批胃血止糊剂(含大黄素 0.067 5 mg/g, 大黄酚 0.184 mg/g)6 份,每份 2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入对照品无水醇溶液(每 mL 含大黄素 6.9 μg, 大黄酚 16.2 μg)25 mL 和无水乙醇 25 mL,按供试品溶液制备方法制备供试液,进行含量测定,计算回收率。结果见表 3。结果表明:供试

品中大黄素、大黄酚与前后峰的分离度、拖尾因子均能满足《中国药典》2010 年版一部附录 VI D 高效液相色谱法项下规定,理论板数按大黄素峰计算均大于 3 000。加样回收试验结果显示,回收率在 95% ~ 105% 之间,RSD < 3%,表明本方法回收率符合含量测定要求。

2.7 胃血止糊剂中大黄素、大黄酚含量测定及限度

取胃血止糊剂 10 批,依法测定大黄素、大黄酚含量,每批测定两次,其结果见表 4。

根据 10 批样品测定结果,考虑到药材来源的不同,制剂过程中的损失等,将含量限度定为 10 批样品平均含量的 70%,即 0.244 mg/g × 70% = 0.171 mg/g,取整数为 0.17 mg/g。故确定胃血止散的含量限度为每 1 g 含大黄以大黄素(C₁₅H₁₀O₅)和大黄酚(C₁₅H₁₀O₄)总量计,不得少于 0.17 mg。

3 讨 论

胃血止糊剂由大黄、白及、厚朴、枳实、柴胡等 10 余味药物组成,具有清胃泻火、疏肝降逆、凉血止血之功效。主治呕血、黑便、脘腹胀满、返酸、嗝气、腹痛、纳差、口苦口干、舌红或红绛、脉弦数等证。大黄为该制剂的君药之一,具有泻下、抗菌、止血、抗炎等作用^[6],对治疗急性上消化道出血效果显著,其主要有效成分为蒽醌类的大黄素和大黄酚,故选择大黄素、大黄酚作为控制本品质量的重要指标。本实验参考有关文献^[1-5],建立高效液相色谱法测定胃血止糊剂中大黄素、大黄酚的含量,具有分离效果好,灵敏度高、准确度高等优点。

本实验通过对 25、30、35、40、45℃ 等柱温的考

表3 加样回收率试验结果($n=6$)Table 3 Recovery results of test($n=6$)

序号	取样量(g)	样品含量(mg)		加入量(mg)		实际含量(mg)		回收率(%)	
		大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚
1	2.513 3	0.169 6	0.462 4	0.172 5	0.405 0	0.336 9	0.861 3	96.98	98.49
2	2.496 7	0.168 5	0.459 4	0.172 5	0.405 0	0.337 2	0.861 6	97.80	99.31
3	2.503 9	0.169 0	0.460 7	0.172 5	0.405 0	0.338 6	0.866 2	98.32	100.12
4	2.506 4	0.169 2	0.461 2	0.172 5	0.405 0	0.336 4	0.856 9	96.93	97.70
5	2.518 2	0.170 0	0.463 3	0.172 5	0.405 0	0.341 5	0.870 4	99.42	100.52
6	2.495 6	0.168 4	0.459 2	0.172 5	0.405 0	0.333 8	0.851 0	95.88	96.74
平均值	—	—	—	—	—	—	—	97.56	98.81
RSD(%)	—	—	—	—	—	—	—	1.27	1.47

—:不需测定;RSD:变异

表4 胃血止糊剂中大黄素大黄酚含量测定结果($n=10$)Table 4 Determination result of emodin rhubarb phenols content in stomach blood paste($n=10$)

批号 Lot No	I号样(mg/g)		II号样(mg/g)		平均含量(mg/g)		大黄素、大黄酚含量和(mg/g)
	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	
100802	0.061	0.170	0.059	0.164	0.060	0.167	0.227
100910	0.056	0.157	0.059	0.162	0.058	0.160	0.218
101015	0.072	0.193	0.068	0.189	0.070	0.191	0.261
101103	0.065	0.189	0.067	0.185	0.066	0.187	0.253
101209	0.082	0.196	0.082	0.185	0.082	0.190	0.272
110106	0.075	0.203	0.078	0.192	0.076	0.198	0.274
110222	0.068	0.186	0.067	0.180	0.068	0.183	0.251
110308	0.052	0.160	0.051	0.174	0.052	0.167	0.219
110411	0.067	0.181	0.062	0.166	0.064	0.174	0.238
110524	0.056	0.169	0.59	0.173	0.058	0.171	0.229
平均	—	—	—	—	—	—	0.244

—:不需测定

察发现,柱温为40℃和45℃时,保留时间较短,大黄素的分离度不符合要求,柱温为25、30、35℃时,保留时间均在25 min以内,分离度、对称因子等均符合药典规定,柱温升高,保留时间缩短。综合考虑实际测定要求及色谱柱的使用安全与寿命,柱温选用30℃。

实验中流动相试用过甲醇-0.1%磷酸:85:15、甲醇-0.2%磷酸:85:15、甲醇-0.2%磷酸:78:22、甲醇-0.2%磷酸:75:25、甲醇-0.2%磷酸:70:30、乙腈-0.2%磷酸:50:50等比例,其中比例为75:25时,大黄素和大黄酚的保留时间较长,且对称性较差,比例为85:15、82:18时,供试品色谱中大黄素的分离度小于1.5,比例为80:20时,只有用长柱(250 mm)才能使大黄素分离度达到要求,其中以甲醇-0.2%磷酸:78:22较为理想,且在较小范围内变化,对结果无明显影响。

总之,采用上述条件下,用HPLC方法测定胃血

止糊剂中大黄素和大黄酚的含量,简便易行,重现性好,且有一定的专属性,故该方法可作为本药的质量控制方法。

参考文献:

- [1] 肖燕,刘建锋.高效液相色谱法测定上清丸中大黄素和大黄酚的含量[J].中南药学,2009,7(1):40.
- [2] 罗晨曲.HPLC同时测定大黄蟪虫丸中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量[J].中成药,2005,27(7):764.
- [3] 黄燕萍,王永富.高效液相色谱法测定清火片中大黄素与大黄酚的含量[J].医药导报,2007,26(12):1501-1502.
- [4] 刘东平.HPLC法测定大败毒胶囊中大黄素和大黄酚的含量[J].现代中药研究与实践,2005,19(3):35-37.
- [5] 张毓红,宋丽丽,吕永宁,等.高效液相色谱法测定肾衰丸中大黄酸和大黄酚的含量[J].中国医院药学,2008,28(10):854-855.
- [6] 王友兰,姜莉芸,胡志宇,等.胃血止糊剂止凝血药药效学研究[J].云南中医中药杂志,2010,31(11):56-57.