

高效液相色谱法测定三黄片中蒽醌类衍生物的含量

柳仁民*, 丁瑞芳 (聊城大学化学化工学院, 山东 聊城 252059)

摘要:目的 建立同时测定三黄片中蒽醌类衍生物含量的 RP-HPLC。方法 用 YWG-C₁₈ 反相柱 (200mm × 4.6mm, 10μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液 (90:10), 流速为 1.0mL/min, 检测波长为 440nm。结果 本法线性关系良好, 平均回收率为 96.37% ~ 101.28%, RSD 0.8% ~ 1.08%。结论 建立的定量方法可用于三黄片质量控制标准。

关键词:三黄片; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)05-0411-03

Determination of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion in Sanhuang tablets by HPLC

LIU Ren-min*, DING Rui-fang (Department of Chemistry, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The contents of rhein, emodin, Chrysophanol, physcion and aloe-emodini in Sanhuang tablets were determined by RP-HPLC. **METHODS** The 5 components were separated on YWG-C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm i. d., 10μm),

作者简介: 柳仁民 (1963-), 男, 山东烟台市人, 教授, 从事中药分析研究, 电话: 0635-8230600。

methanol-0.1% phosphoric acid(90:10) was used as mobile phase and the detection wavelength was at 440nm. **RESULTS** The method had a good linear. The average recoveries were from 96.8% to 103.3%, the relative standard deviations were from 0.8% to 1.1%. **CONCLUSION** The method was simple, quick and accuracy. It is suitable for the assay of the rhein, emodin, chrysophanol, physcion and aloe-emodin in Sanhuang tablets.

KEY WORDS: Sanhuang tablets; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion; RP-HPLC

三黄片由大黄、黄芩浸膏、盐酸小檗碱组成,是一种具有清热泻火、消炎利便功效的常见中成药。大黄为方中主药,主要有效成分为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚蒽醌衍生物,以部分游离、大部分与葡萄糖结合成苷的形式存在,约占大黄成分的3%~5%,这类化合物的主要作用是抗病原微生物、抗菌及病毒、抗肿瘤及抗寄生虫等。曾报道 HPLC测定三黄片中的大黄酚、大黄素、黄芩苷(李淑盈、郭增军、王利, HPLC测定三黄片中大黄素、大黄酚及黄芩苷的含量[J].中成药, 2001, 23(6): 445-448.),但对这五种蒽醌衍生物同时进行测定却未见报道。本实验用高效液相色谱对三黄片中的蒽醌类衍生物进行了定量测定,方法简便可行,准确可靠,可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

Angilent HPLC仪(美国安捷伦科技有限公司): G1322A 在线真空脱气机, G1311A 四元泵, G1315B 二极管阵列检测器(190~950 nm), Rheodyne 7725 定量进样阀以及 Angilent HPLC系统化学工作站。色谱柱为 YWG C₁₈反相柱(200 mm × 4.6 mm, 10 μm, 大连江申分离科学技术公司)。

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),三黄片(邯郸制药有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 YWG C₁₈反相柱(200 mm × 4.6 mm, 10 μm, 大连江申分离科学技术公司),流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(90:10),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 440 nm,柱温为室温,进样量为 20 μL。

2.2 对照品溶液及样品的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 分别含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚为 27.2、22.8、33.5、31.9、12.3 μg 的溶液,即得对照品储备液,置冷暗处保存。

2.2.2 供试品溶液的制备 取三黄片 10 片,除去包衣,研细,称取 0.5 g,加 2.5 mol/L 硫酸溶液 30 mL,置沸水浴中加热回流 2 h,稍冷后加入氯仿 30 mL,继续回流 1 h,收集氯仿溶液,酸液再用氯仿 30 mL 回流 3 次,每次 1 h,合并氯仿液,蒸干,残渣加甲醇定容至 25 mL 量瓶中,摇匀即得供试样品液。

2.3 色谱分离

在拟定的色谱条件下,得到芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的标准色谱图(图 1a)以及三黄片样品的色谱图(图 1b)。由图 1 可见,样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚与相邻组分达到基线分离。

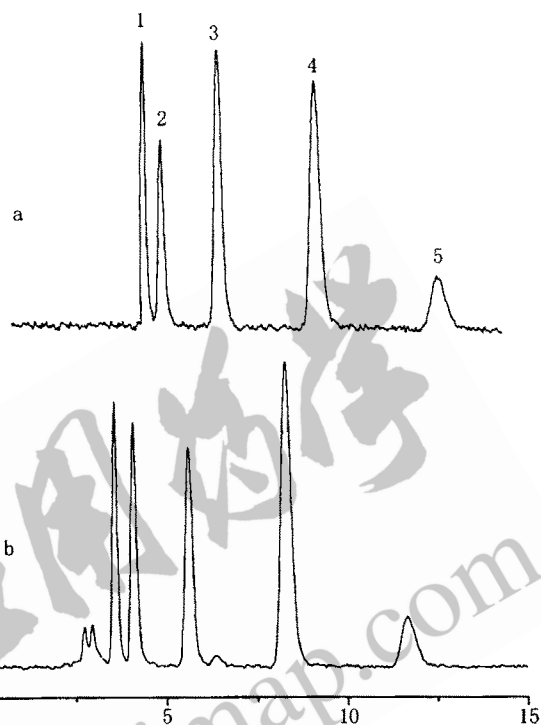


图 1 样品高效液相色谱图

Fig 1 Chromatograms of samples

a. 标准色谱图 b. 三黄片色谱图

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

a. chromatograms of standard samples b. chromatogram of Sanhuang tablets

1. aloe-emodin 2. rhein 3. emodin 4. chrysophanol 5. physcion

2.4 标准曲线

分别精密量取“2.2.1”对照品储备液适量,加甲醇稀释制成标准系列进样测定。以进样量 x 对色谱峰面积 Y 进行线性回归,回归方程、线性范围、相关系数见表 1。

表 1 标准曲线

Tab 1 Calibration curves

对照品种类	线性范围(μg)	回归方程	回归系数(r)
芦荟大黄素	0.15~2.13	$Y = 1438X + 25.71$	$r = 0.9997$
大黄酸	0.11~1.92	$Y = 1717X + 40.02$	$r = 0.9996$
大黄素	0.12~1.68	$Y = 2388X + 50.89$	$r = 0.9997$
大黄酚	0.23~2.75	$Y = 2323X + 202.72$	$r = 0.9996$
大黄素甲醚	0.09~0.98	$Y = 2375X + 47.65$	$r = 0.9996$

2.5 方法的精密度

在上述色谱条件下,对同一对照品溶液重复进样 5 次,测得峰面积的 RSD 为芦荟大黄素 0.92%,大黄酸 1.08%,大黄素 1.04%,大黄酚 0.8%,大黄素甲醚 1.06% ($n = 5$)。

2.6 方法重复性

对同一批样品按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份,在上述色谱条件下,分别进样 20 μ L,进样测定,按外标法测定其含量并计算 RSD,芦荟大黄素为 2.50%,大黄酸为 2.33%,大黄素为 2.87%,大黄酚为 2.81%,大黄素甲醚 2.06%。

2.7 方法回收率

精密称定已知含量的三黄片细粉 0.25g,加入一定量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品,按供试品溶液的制备方法制备,分别进样 20 μ L,同时取相应浓度的对照品溶液 20 μ L进样测定,按外标法测定其含量,计算加样回收率和 RSD,结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果 (n=9)

Tab 2 The results of recovery test (n=9)

样品种类	加入量 (mg)	测出量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
芦荟大黄素	0.698 8	0.680 4	96.37	1.44
大黄酸	0.587 0	0.579 2	98.67	1.27
大黄素	0.481 4	0.487 6	101.28	2.01
大黄酚	0.819 8	0.799 0	97.46	1.28
大黄素甲醚	0.206 8	0.200 1	97.76	2.24

2.8 对照品溶液的稳定性

取对照品以甲醇配制对照品储备液,于 0,0.5,1,2,3,4h 分别进样 20 μ L,记录峰面积,结果 6 次峰面积的 RSD 分别为:芦荟大黄素 1.60%,大黄酸 2.07%,大黄素 1.96%,大黄酚 2.75%,大黄素甲醚 2.21%。结果表明对照品溶液较稳定。

2.9 样品的测定

取供试品溶液,在上述色谱条件下,分别进样 20 μ L,同时取相应浓度的对照品溶液 20 μ L进样测定,按外标法分别测定 4 批三黄片的含量,结果见表 3。

表 3 样品的测定 (mg/g)

Tab 3 The analytical results of samples (mg/g)

编号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
1	2.502 4	2.358 8	1.884 8	3.622 1	0.818 4
2	2.715 4	2.305 6	1.934 3	3.556 4	0.826 7
3	2.717 6	2.336 8	2.025 2	3.619 2	0.840 8
4	2.574 0	2.092 4	1.827 6	3.759 6	0.802 5

3 讨论

3.1 检测波长的选择

用甲醇分别配制芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品溶液,进行紫外-可见扫描,由其紫外-可见扫描图谱可知蒽醌类在 440nm 都有较强吸收,在 440nm 进行色谱测定,各组分能得到很好的分离,杂质干扰少,灵敏度较高。

3.2 流动相的选择

曾试用甲醇-水、甲醇-0.5%醋酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液做流动相,并变换他们的比例,结果发现用甲醇-水做流动相时,尽管也能得到较好的分离,但大黄素表现不稳定,用甲醇-0.5%醋酸溶液做流动相时,这 5 种蒽醌均不能较好地分离,当以甲醇-0.1%磷酸溶液做流动相,且其比例为 90:10 时,蒽醌类衍生物得到了很好的分离。

3.3 提取方法的选择

对提取溶剂(氯仿、乙醚)、提取方法(超声、加热回流、机械震荡)、提取温度及提取时间进行了考察,同时考虑到结合型蒽醌易水解成游离蒽醌,本实验采用 2.5mol/L 硫酸溶液水解,可避免少量醋酸、盐酸被氯仿提出。实验表明,水解 2h 即可将结合型蒽醌完全水解,用氯仿在酸水中回流提取 4 次,以保证提取完全,并可除去水溶性杂质和碱性杂质。