

高效液相色谱法测定四黄膏中大黄素、大黄酚的含量

刘起华,张萱,文谨(中国中医研究院广安门医院,北京 100053)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定四黄膏中大黄素和大黄酚的含量。方法 高效液相色谱法。Spherisorb C₁₈柱,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(90:10),检测波长 254nm,柱温为室温。结果 大黄素进样量在 1.6~8.0μg,大黄酚进样量在 3.2~16.0μg内,线性关系良好,相关系数大黄素 $r=0.9997$,大黄酚 $r=0.9999$,平均回收率大黄素为 100.59%(RSD=1.19%),大黄酚为 100.28%(RSD=1.33%)。结论 本法操作简便,结果准确,重现性好,可用于四黄膏的质量控制。

关键词:四黄膏;大黄素;大黄酚;高效液相色谱法

中图分类号:R917.720.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2007)01-0066-02

Determination of the Contents of Emodin and Chrysophanol in Sihuang Gao by HPLC

LIU Qi-hua, ZHANG Xuan, WEN Jin (Guang'anmen Hospital, China Academy of TCM, Beijing 100053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for the assay of emodin and chrysophanol in Sihuang Gao. **METHODS** It was assayed by HPLC. The column was Spherisorb C₁₈, the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution (90:10). The UV detection wavelength was at 254nm. **RESULTS** Good linearity of emodin was shown within the range of 1.6μg~8.0μg ($r=0.9997$) and chrysophanol within the range of 3.2μg~16.0μg ($r=0.9999$). The average recovery of emodin was 100.59% (RSD=1.19%) and chrysophanol was 100.28% (RSD=1.33%). **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible. It can be used for quality control of Sihuang Gao.

KEY WORDS: Sihuang Gao; emodin; chrysophanol; HPLC

四黄膏主要由大黄、黄连等组成的中药复方制剂,具有清热解毒、消肿止痛之功效,我院临床应用多年,治疗热毒疮疖等,颇有疗效。笔者运用高效液相色谱法对其大黄中的大黄素和大黄酚进行了含量测定,为该制剂的质量控制提供快速准确的测定方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:岛津 LC-10A 高效液相色谱仪(手动进样)、SPD-10A 检测器、威尔色谱工作站;大黄酚对照品(批号 110796-200310)和大黄素对照品(批号 110756-200110):中国药品生物制品检定所提供;四黄膏样品:本院制剂室提供(批号:20040822,20041128,20050110)。所用试剂:水为高纯水;甲醇为色谱纯。其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Spherisorb C₁₈(5μm, 4.6mm×150mm);流动相:

甲醇-0.1%磷酸溶液(90:10);流速:1.0mL·min⁻¹;检测波长:254nm;柱温:室温;进样量:5μL;理论板数按大黄素计算应不低于 3000,大黄素和大黄酚的分离度 $R \geq 2$ 。

2.2 对照品溶液的配制

分别称取大黄素和大黄酚 2mg 和 10mg,精密称定,置 100mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,制成对照品贮备溶液。

2.3 标准曲线制备

2.3.1 大黄素标准曲线的制备 分别精密吸取大黄素贮备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL,置 25mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取 5μL,注入液相色谱仪,每个浓度进样 3 次。按上述色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程为 $Y=22122.6X-14.9$, $r=0.9997$,结果表明:大黄素进样量在 1.6~8.0μg 范围内呈良好的线性关系。

2.3.2 大黄酚标准曲线的制备 分别精密吸取大黄酚贮备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 5 μ L, 注入液相色谱仪, 每个浓度进样 3 次。按上述色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程为 $Y = 27\,493.6X + 345.8$, $r = 0.999\,9$, 结果表明: 大黄酚进样量在 3.2 ~ 16.0 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.4 重复性试验

取同一批号 (20050110) 样品 6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 表 1 回收率测定结果

Tab 1 Results of recovery test

已知量 /mg		加入量 /mg		测得量 /mg		回收率 /%		平均回收率 /%		RSD /%	
大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚
0.0798	0.1685	0.082	0.171	0.1605	0.3404	99.41	100.51				
0.0808	0.1706	0.082	0.171	0.1634	0.3403	100.75	99.23				
0.0818	0.1727	0.082	0.171	0.1648	0.3418	101.25	98.91	100.59	100.28	1.19	1.33
0.0814	0.1718	0.082	0.171	0.1631	0.3454	99.63	101.54				
0.0823	0.1736	0.082	0.171	0.1664	0.3482	102.58	102.12				
0.0826	0.1743	0.082	0.171	0.1646	0.3442	99.96	99.37				

2.6 系统适用性试验

2.6.1 精密吸取 5 份相同含量的同一供试品溶液, 分别注入液相色谱仪, 依法测定峰面积, 结果大黄素 RSD = 1.05% ($n = 5$), 大黄酚 RSD = 1.21% ($n = 5$)。

2.6.2 将供试品溶液在 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 分别进样, 记录峰面积, 大黄素 RSD 为 1.07% ($n = 7$), 大黄酚 RSD 为 0.74% ($n = 7$)。

2.7 阴性样品的配制

按处方配比除去大黄, 并按“样品测定”项下方法制备, 得到阴性对照样品溶液, 按上述色谱条件测定, 结果见图 1。

2.8 样品测定

取供试品 1 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置烧瓶中, 挥去溶剂, 加水 15 mL 使溶解, 再加盐酸 1 mL, 超声处理 5 min, 加热回流 30 min, 立即冷却, 置分液漏斗中, 用少量乙醚洗涤容器, 并入分液漏斗中, 用乙醚分 3 次振摇提取, 每次 15 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加入甲醇使溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。用 0.45 μ m 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 5 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按外标法计算供试中大黄素和大黄酚的含量。测定结果见表 2。高效液相色谱图分别见图 1。

表 2 样品测定结果

Tab 2 Determination results of samples

批号	含量 /(mg/g)		RSD /% ($n = 3$)	
	大黄素	大黄酚	大黄素	大黄酚
20040822	0.1547	0.3371	0.78	0.91
20041128	0.1660	0.3428	0.59	0.58
20050110	0.1621	0.3421	0.62	0.73

按“样品测定”项下方法测定样品中大黄素和大黄酚的含量, 平均结果大黄素为 0.1615 mg/g (RSD = 1.05%), 大黄酚为 0.3391 mg/g (RSD = 1.21%)。

2.5 回收率试验

取已知含量的样品 (20050110) 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入相当于 0.5 g 样品量的对照品大黄素和大黄酚, 按“样品测定”项下方法制备供试品溶液, 并依法测定, 其平均回收率大黄素为 100.59%, RSD = 1.19% ($n = 6$), 大黄酚为 100.28%, RSD = 1.33% ($n = 6$), 结果见表 1。

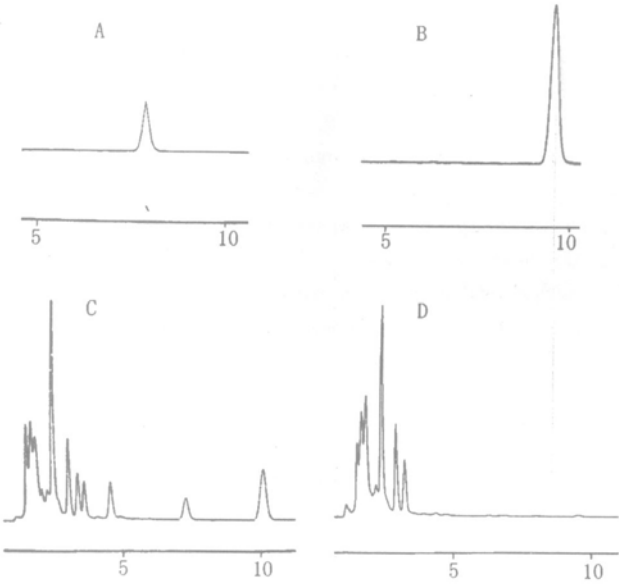


图 1 标准品、样品和阴性样品的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of standard, sample and blank sample

A. 大黄素; B. 大黄酚; C. 样品; D. 阴性样品

A. standard of emodin; B. standard of chrysophanol; C. sample; D. blank sample

3 讨论

以多种比例甲醇 - 0.1% 磷酸溶液 (70:30; 80:20; 90:10) 试验选择流动相, 当比例为 90:10 时, 大黄素和大黄酚色谱峰分离度大于 2, 基线平直, 峰形较对称。本方法操作简便, 结果准确, 可用于该制剂中大黄素和大黄酚的含量测定。

收稿日期: 2006-03-28