HPLC 同时测定疗筋涂膜剂中 5 种大黄成分的含量

唐洪梅[1]，李得堂[2]，闫雪[2]，丘振文[1]，蔡庆群[1](1.广州中医药大学第一附属医院，广州 510405; 2.广州中医药大学, 广州 510405)

摘要：目的 建立高效液相色谱法同时测定疗筋涂膜剂中5种成分的含量。**方法** 采用Hypersil ODS-C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm，5 μm)，甲醇-0.05％磷酸(85∶15)为流动相，流速：0.8 mL·min^{-1}，柱温：34 ℃，检测波长：254 nm。**结果** 芦荟大黄素在9.11 ~ 145.76 μg·mL^{-1}（r=0.999 4），大黄酸在5.63 ~ 90.08 μg·mL^{-1}（r=0.999 3），大黄素在5.44 ~ 87.04 μg·mL^{-1}（r=0.999 9），大黄酚在6.13 ~ 98.08 μg·mL^{-1}(r=0.999 9)，大黄素甲醚在2.72 ~ 43.52 μg·mL^{-1} (r=0.999 8)线性良好；平均回收率分别为97.64%、98.14%、99.52%、99.36%、98.43%；RSD分别为1.29%、1.81%、1.40%、0.59%、1.58%。**结论** 该方法简便、可靠、准确，可用于疗筋涂膜剂的质量控制。

关键词:疗筋涂膜剂；质量控制；高效液相色谱法

中图分类号：R917.101 **文献标识码：**B **文章编号：**1007-7693（2009）05-0408-04

Simultaneous Determination 5 Contents of the Rhubarb in the Liaojin Film by HPLC

TANG Hongmei[1*], LI Detang[2], YAN Xue[2], QIU Zhenwen[1], CAI Qingqun[1]（1.*The First Affiliated Hospital of Guangzhou*

作者简介：唐洪梅，女，博士，主任药师，教授 Tel: (020)36588708 E-mail: tanghongmei2000@163.com

University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405,*China*；2.*Guangzhou University of Chinese Medicine,Guangzhou* 510405,*China*）

ABSTRACT：**OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the determination of Chrysophanol, Emodin, Physcion, Aloeemodin and in Liaojin film. **METHODS** The determination was performed on Hypersil ODS-C_{18} column(250 mm x 4.6 mm，5 μm)with mobile phase consisted of methanol-0．05％phosphoric acid (85∶15)at a flow rate of 0.8 mL·min^{-1}. The UV detection wavelength was set at 254 nm. **RESULTS** The calibration curves were linear in the range of 9.11−145.76 μg·mL^{-1}（r=0.999 4）for Aloeemodin，5.63−90.08 μg·mL^{-1}（r=0.999 3）for Rhein，of 5.44−87.04 μg·mL^{-1}（r=0.999 9）for Emodin，6.13−98.08 μg·mL^{-1} (r=0.999 9)for Chrysophanol and 2.72−43.52 μg · mL^{-1}(r=0.999 8) for Physcion. The average recovery was 97.64%，98.14%，99.52%，99.36%，98.43%；RSD was1.29%，1.81%，1.40%，0.59%，1.58%.**CONCLUSION** The determination method is simple，reliable，accurate, and it can be used for quality control of Liaojin film.

KEY WORDS:Liaojin film；quality control；HPLC

疗筋涂膜剂由大黄、赤芍、黄芩等中药组成，具有活血祛瘀、消肿止痛的功效。主要用于外伤性疾病和风湿性疾病。疗筋膏在本院已使用十七年，属于医院院内制剂，有很好的疗效，但使用中存在诸多不便。课题组成员通过重新开发为涂膜剂，具有携带使用方便、药物释放度高、使用量小等诸多优点。为更好的控制本品质量，笔者对该药进行含量测定的研究。本试验采用高效液相色谱法对其君药大黄的成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚的含量进行测定。该方法简便、可靠、准确，可用于疗筋涂膜剂的含量测定。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪，包括四元梯度泵、紫外检测器、7725i手动进样器，Chemstation数据处理软件系统（美国Agilent公司）。超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）；恒温干燥箱（北京市朝阳区来广营医疗器械厂）。DK-S_{24}型电热恒温水浴锅（上海精宏试验设备有限公司），AA-200电子分析天平（Denver仪器公司）。

1.2 试药

疗筋涂膜剂（本制剂室自制，批号：070925、070927、070930）；大黄素对照品（供含量测定用，批号：0756-200110 ,中国药品生物制品检定所）；大黄酚对照品（供含量测定用，批号：796-9301 ,中国药品生物制品检定所）；芦荟大黄素对照品（供含量测定用，批号：795-9301 ,中国药品生物制品检定所）；大黄酸对照品（供含量测定用，批号：0757-9804 ,中国药品生物制品检定所）；大黄素甲醚对照品（供含量测定用，批号：110758-200509 ,中国药品生物制品检定所）；甲醇为色谱纯，水为二次蒸馏水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱：Hypersil ODS-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），柱温：34 ℃，检测波长：254 nm，流动相：甲醇-0.05％磷酸（85∶15），流速：0.8 mL ·min^{-1}，进样量 10 μL。理论板数以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚计算均不低于 10 000，5 个活性成分与相邻峰之间分离度均大于 1.5，对称因子在 0.95～1.05 之间。

2.2 对照品溶液的制备[1-2]

精密称取五氧化二磷减压干燥的芦荟大黄素对照品、大黄酸对照品、大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄素甲醚对照品适量，加甲醇分别制成1 mL含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚各约80 μg，大黄素甲醚约40 μg的溶液；分别精密量取上述对照品溶液2 mL至10 mL量瓶中，混匀，即得。

2.3 供试品溶液的制备[3-5]

取本品约0.6 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，称定重量，超声，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5 mL，置烧瓶中，挥去溶剂，加8%盐酸溶液10 mL，超声处理2 min，再加三氯甲烷10 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，酸液用三氯甲烷提取3次，每次10 mL，合并三氯甲烷液，减压回收溶剂至干，残渣加甲醇使溶解，转移至10 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 专属性试验

按处方比例制成缺大黄阴性对照，按“2.3”项下方法制备缺大黄阴性样品溶液，精密吸取上述

对照品、供试品、阴性样品溶液各10 μL，照“2.1”项下色谱条件测定，结果阴性对照液在各个对照品保留时间位置上均未见干扰。对照品溶液、样品溶液、缺大黄的阴性样品溶液HPLC见图1。

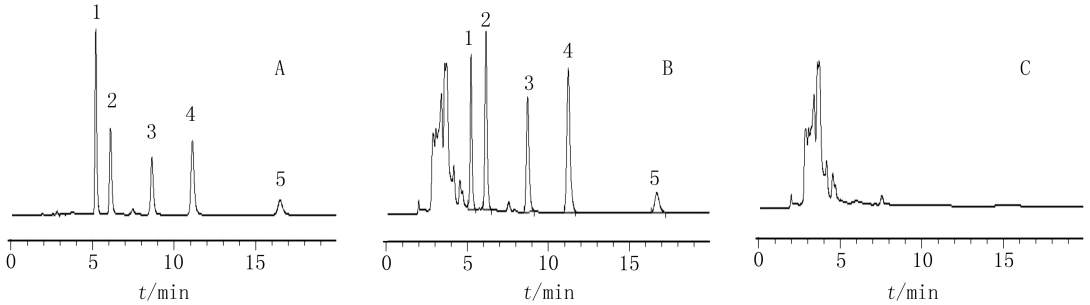

图 1 样品中芦荟大黄素(1)、大黄酸(2)、大黄素(3),大黄酚 (4)和大黄素甲醚(5)的色谱图

A-对照品；B-样品；C-阴性对照品

Fig 1 HPLC chromatograms of aloeemodin(1),rhein(2),emodin(3),Chrysophanol (4)and physcion(5)in Liaojin film

A-reference substances；B-sample；C-negative reference substance

2.5 线性关系考察

精密量取含芦荟大黄素（0.182 2 mg·mL^{-1}）、大黄酸（0.112 6 mg·mL^{-1}）、大黄素（0.108 8 mg·mL^{-1}）、大黄酚（0.122 6 mg·mL^{-1}）、大黄素甲醚（0.054 4 mg·mL^{-1}）的混合对照品溶液0.5、1、2、4、8 mL,分别置10 mL量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，0.45 μm微孔滤膜滤过，按“2.1”项下的色谱条件测定，以进样浓度（μg·mL^{-1}）为横坐标，对峰面积为纵坐标进行线性回归，其回归方程及线性范围如下：芦荟大黄素：$Y = 22.35\ X + 12.35$，r=0.999 4，9.11～145.76 μg·mL^{-1}；大黄酸：Y=17.10 X+31.75，r =0.999 3，5.63～90.08 μg·mL^{-1}；大黄素：$Y = 19.57\ X－23.63$，r =0.999 9，5.44～87.04 μg·mL^{-1}；大黄酚：$Y = 25.68\ X－23.32$，r = 0.999 9，6.13～98.08 μg·mL^{-1}；大黄素甲醚：Y = 9.913 X+15.94，r=0.999 8，2.72～43.52 μg·mL^{-1}。

2.6 精密度试验

精密量取供试品溶液10 μL，连续进样6次，测得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的相对标准差(RSD) 分别为0.49%、0.33%、0.29%、0.32%、0.19%，该样品在5 d制备分析一次，以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积来计算日间精密度，相对标准差(RSD)分别为0.56%、0.62%、0.88%、0.45%、0.52%。

2.7 稳定性试验

取样品溶液分别在0、2、4、8、12、24 h按“2. 1”项下色谱条件测定，测得样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的相对标准差(RSD) 分别为2.43%、1.87%、2.45%、2.09%、1.40%，结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 重复性试验

取同一批研究用样品，平行制备 6 份供试品溶液，按上述色谱条件测定峰面积并计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量，其相对标准偏差分别为 2.21%、2.03%、1.41%、2.02%、2.29%。

2.9 回收率试验

精密称取已知含量的样品（含芦荟大黄素 1.044 9 mg·g^{-1}、大黄酸 1.867 8 mg·g^{-1}、大黄素 1.538 9 mg·g^{-1}、大黄酚 2.059 2 mg·g^{-1} 和大黄素甲醚 0.514 7 mg·g^{-1}）6 份,每份约 0.3 g，2 份为 1 组，分别精密加入一定量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品，按“2.3”项下方法制成低、中、高 3 个浓度的溶液，按上述色谱条件测定，计算回收率。平均回收率分别为 97.64%、98.14%、99.52%、99.36%、98.43%；RSD 分别为 1.29%、1.81%、1.40%、0.59%、1.58%。结果见表 1。

2.10 样品的测定

取 3 批疗筋涂膜剂按“2.3”项下方法制备，每批样品 3 份，精密吸取供试品溶液 10 μL，按照上述色谱条件测定并计算含量，3 批次样品含量分别为 7.016 8，6.960 1，7.091 0 mg·g^{-1}。

3 讨论

疗筋涂膜剂由大黄、赤芍、黄芩等中药组成，大黄、赤芍为君药，大黄 5 种蒽醌类成分具有显著活血祛瘀作用，故选择其中的 5 种蒽醌类成分作为含量测定的指标成分。

大黄成分的含量测定方法文献报道较多，色谱条件及制备方法也有多种多样，但是多采用单一成

表 1 加样回收率试验结果（n =6）

Tab 1 Result of recovery test（n =6）

成分	序号	样品量/mg	加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芦荟大黄素	1	0.335 1	0.253 2	0.580 4	96.88	97.64	1.29
	2	0.309 3	0.253 2	0.557 1	97.88		
	3	0.309 6	0.317 2	0.615 8	96.54		
	4	0.334 8	0.317 2	0.651 4	99.81		
	5	0.307 5	0.382 2	0.682 5	98.12		
	6	0.307 3	0.382 2	0.676 4	96.58		
大黄酸	1	0.622 9	0.468 7	1.080 0	97.52	98.14	1.81
	2	0.574 9	0.469 7	1.050 7	101.30		
	3	0.575 5	0.588 2	1.142 8	96.45		
	4	0.622 4	0.588 2	1.192 3	96.89		
	5	0.571 5	0.705 5	1.269 9	98.99		
	6	0.571 2	0.705 5	1.260 3	97.68		
大黄素	1	0.513 2	0.346 6	0.858 4	99.58	99.52	1.40
	2	0.473 7	0.346 6	0.815 9	98.75		
	3	0.474 1	0.435 2	0.914 8	101.25		
	4	0.512 8	0.435 2	0.941 7	98.56		
	5	0.470 9	0.534 5	0.994 1	97.88		
	6	0.470 6	0.534 5	1.011 0	101.11		
大黄酚	1	0.686 7	0.468 8	1.134 8	95.58	96.36	0.59
	2	0.633 8	0.468 8	1.087 7	96.82		
	3	0.634 4	0.613 1	1.225 2	96.36		
	4	0.686 1	0.613 1	1.274 0	95.88		
	5	0.630 1	0.735 6	1.344 5	97.12		
	6	0.629 7	0.735 6	1.338 7	96.39		
大黄素甲醚	1	0.171 7	0.108 8	0.278 2	97.89	98.43	1.58
	2	0.158 4	0.108 8	0.268 7	101.35		
	3	0.158 6	0.163 2	0.316 6	96.85		
	4	0.171 5	0.163 2	0.332 6	98.72		
	5	0.157 5	0.217 6	0.370 0	97.65		
	6	0.157 4	0.217 6	0.370 9	98.14		

分为含量测定，不能全面控制制剂质量，该涂膜剂在提取工艺及制备工艺中，5种蒽醌类成分转移率差别较大，为了更好控制本品质量，笔者在本项目的研究工作中，参照中国药典2005年版一部大黄项下制备方法[5]，并采用其测定波长254 nm同时对5种蒽醌类成分进行定量测定，方法可行，分离度较高。流动相的选择中，甲醇-0.1％磷酸溶液，甲醇-0.05％磷酸溶液，甲醇-水，乙腈-水的洗脱系统进行反复试验考察。以甲醇-水为流动相基础系统，进行了pH及极性调整，由于甲醇-0.1％磷酸溶液系统酸性较强，易对色谱柱产生损害，故以甲醇-0.05％磷酸溶液为流动相，且各峰对称性良好，可用于本品的含量测定。

REFERENCES

[1] NIE M H,ZENG F L.HPLC determination of rhein in Shaotangfujikan [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(12):1873-1874.

[2] YANG X Y,WU A Y,JING H Y. The determination of emodin in Paiduyangyan capsule by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学),2001,18(1):50-51.

[3] XUE L.Determination of emodin and chrysophanol in Zhichuang tablet by HPLC [J].Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学),2003，20(5)：404-405.

[4] BAI L J，WANG C M，LIU J F.HPLC determination of emodin and ehrysophanol in Gan weiqitong tablet [J].Chin J Pharm Anal (药物分析杂志),2006，26(5):689-691.

[5] Ch.P(2005)Vol I(中国药典 2005 年版．一部)[S]．2005:17.

收稿日期：2008-05-09