

HPLC法测定穿金益肝片中大黄素的含量

Determination of Emodin in Chuanjinyigan Tablets by HPLC

梁珍惠¹ 赖茂祥² 刘华钢³
Liang Zhenhui¹ Lai Maoxiang² Liu Huagang³

(1.广西中医学院 南宁市明秀东路 530001; 2.广西中医药研究所 南宁市东葛路 530022; 3.广西医科大学 南宁市滨湖路 530021)

(1. Guangxi College of Traditional Chinese Medicine, East Mingxiulu, Nanning, Guangxi, 530001, China; 2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Donggelu, Nanning, Guangxi, 530022, China; 3. Guangxi Medical University, Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要 用 C₁₈ ODS为固定相, 甲醇-0.1%磷酸 (85:15) 为流动相, 建立一种高效液相色谱法测定穿金益肝片中大黄素的含量, 检测波长为 290 nm 结果是进样量在 0.05175~0.5175 μg 范围内线性关系良好 ($r = 0.9998$), 平均回收率为 98.56%, RSD 为 1.59% ($n = 5$)。该方法简便, 准确, 重复性好, 可作为该制剂的含量测定方法。

关键词 穿金益肝片 大黄素 HPLC

中图分类号 R284.10

Abstract A HPLC method for determination of emodin in Chuanjinyigan tablets was established. A C₁₈ Column was used with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid (85:15) and the detection wavelength was 290 nm. The calibration curve of lincomycin was linear in the concentration range of 0.05175~0.5175 μg ($r = 0.9998$). The average recovery was 98.56% ($RSD = 1.59%$). The method is simple, accurate and reproducible. It is suitable for determination of emodin in Chuanjinyigan tablets.

Key words Chuanjinyigan tablets, emodin, HPLC

穿金益肝片是国家批准正式上市的药品 (批准文号: 国药准字 Z20025058), 是由穿破石、铁包金、虎杖、龟甲等 8 味中药组成的复方制剂。穿金益肝片具有清热利湿、解毒退黄; 用于黄疸、胁痛及急慢性肝炎属肝胆湿热证。大黄素是穿金益肝片主要有效成分之一^[1,2], 故本文建立高效液相测定法 (HPLC) 测定穿金益肝片中大黄素的含量, 结果该方法简便、准确、重复性好, 可以作为控制穿金益肝片质量的指标之一。

1 仪器与药品

美国 TSP 公司 P400 泵, UV6000LP 二极管阵列检测器, AS1000 自动进样器, SN400 系统控制器; IBM PC300GL 电子计算机; MILLI-Q Labo 超纯水处理器。

大黄素对照品: 批号为 0756-9707, 由中国药品生物制品检定所提供, 经纯度检测符合定量测定要求。

穿金益肝片: 批号为 020108, 由广西中医学院制药厂提供。

实验所用试剂: 甲醇为色谱纯, 水为高纯水, 其它试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 对照品溶液的配制

精密称取于 105℃ 干燥至恒重的大黄素对照品适量, 加无水乙醇: 醋酸乙酯 (2:1) 混合溶液制成每 1 ml 含大黄素 0.025 mg 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备

取本品 10 片, 除去糖衣, 精密称定, 研细 (过 3 号筛), 精密称取 0.2 g, 置锥形瓶中, 精密加入乙醇 50 ml, 称定重量, 置 70℃ 水浴加热 75 min, 放冷, 再称定重量, 用乙醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 精

定量取续滤液 25 ml 置烧瓶中, 水浴蒸干, 加 30% 乙醇: 盐酸 (10:1) 混合溶液 20 ml, 置沸水浴中加热回流 60 min, 立即冷却, 用氯仿振摇萃取 3 次, 每次 25 ml, 合并氯仿液, 蒸干, 残渣用无水乙醇: 醋酸乙酯 (2:1) 混合溶液溶解, 移置 10 ml 容量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 制得供试液

2.3 色谱条件

色谱柱 Kromasil C18 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇 - 0.1% 磷酸 (85:15); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 290 nm; 柱温: 35°C, 进样量为 10 μl

2.4 检测波长的选择

在反相高效液相色谱系统上实现对大黄素的分离后, 以二极管阵列检测器测定它的紫外光谱图, 测定最大吸收波长为 290 nm, 故本实验采用 290 nm 为检测波长 (图 1)

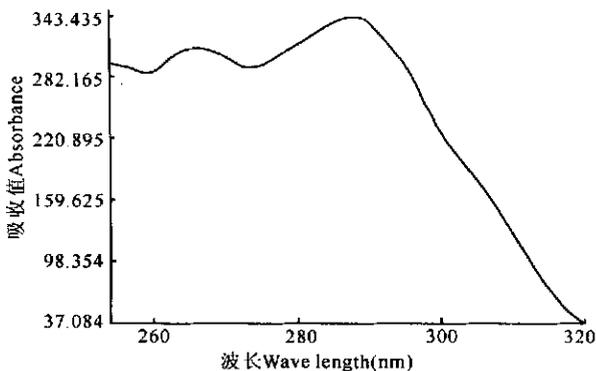


图 1 穿金益肝片紫外吸收光谱

Fig. 1 UV of Chuanjiangyigan tablets

2.5 干扰试验

按相应处方量称取各味药材 (缺虎杖), 照本品工艺进行提取分离, 并按拟定方法进行测定, 结果阴性样品在大黄素出峰处无干扰 (图 2)

2.6 线性关系考察

精密称取大黄素对照品 10.35 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 加甲醇使其溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。分别精密吸取以上对照品溶液 0.5 ml 1.0 ml 2.0 ml 3.0 ml 4.0 ml 5.0 ml, 分别置 10 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样测定。以峰面积积分值对进样量进行回归处理, 大黄素在 0.05175~0.5175 μg 范围内线性关系良好。回归方程为 $Y (\mu g) = 4.7675 \times 10^{-8} X - 0.005943, r = 0.9998$ 大黄素对照品 HPLC 色谱图见图 3 标准曲线见图 4

2.7 精密度试验

对同一大黄素对照品溶液 (浓度为 0.0241 mg/

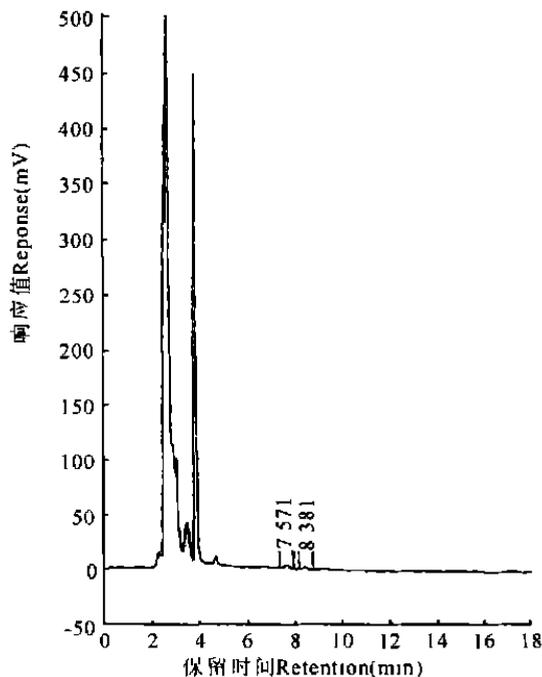


图 2 阴性样品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of solution of blank

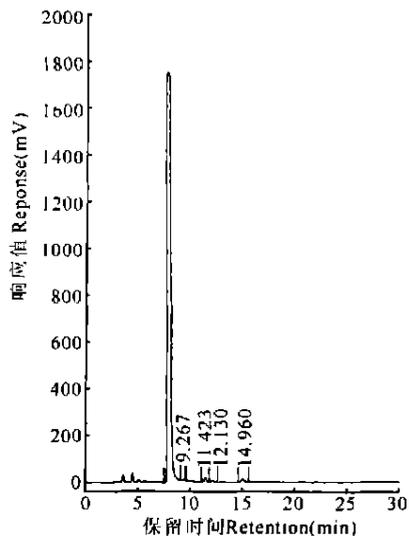


图 3 大黄素对照品 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of standard solution of emodin

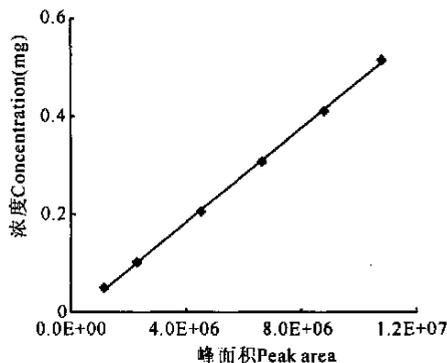


图 4 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of emodin

ml), 按拟定的色谱条件及方法进行测定, 连续测定

次,结果峰面积积分的平均值为 5304222 ($RSD = 0.38\%$, $n = 5$).

2.8 重现性考察

取同一批样品 (批号 020108) 5份,分别依法测定含量,结果分别为每片 0.811 mg 0.801 mg 0.800 mg 0.796 mg 0.804 mg, 大黄素的平均值为每片 0.802 mg, $RSD = 0.70\%$.

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号 020108), 每隔一定时间测定 1次, 共测定 10次, 结果 10次测定的大黄素含量分别为每片 0.777 mg 0.786 mg 0.780 mg 0.786 mg 0.789 mg 0.789 mg 0.793 mg 0.786 mg 0.806 mg 0.814 mg, 平均值每片含大黄素 0.4102 mg, $RSD = 0.99\%$. 试验表明, 在 15 h内, 被测物稳定.

2.10 回收率试验

用加样回收率方法测定. 取已知含量的穿金益肝片约 0.1 g, (共 5份, 每片含大黄素 0.802 mg, 平均片重为 0.3135 g), 分别定量加入浓度为 0.4016 mg/ml 大黄素 0.8 ml, 按供试品溶液的制备方法进行提取、测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 98.56%, $RSD = 1.59\%$, 详见表 1 符合测定要求.

表 1 大黄素加样回收率计算结果

Table 1 Results of the recovery

序号 No.	取样量 Sampling (g)	样品含量 Content (mg)	加入量 Added (mg)	测得量 Found (mg)	回收率 Recovery (%)
1	0.1024	0.262	0.321	0.577	98.13
2	0.1007	0.258	0.321	0.568	96.57
3	0.0980	0.251	0.321	0.575	100.93
4	0.1075	0.275	0.321	0.592	98.75
5	0.1017	0.260	0.321	0.576	98.44

3 样品测定

分别取 10个批号的样品,按供试品的制备方法进行处理,吸取对照品溶液和样品溶液适量,分别进样,依法测定; 每批样品测定 2个数据. 样品 HPLC 色谱图见图 5 测定结果见表 2

表 2结果表明, 10批样品中, 每片大黄素含量最低为 0.705 mg, 最高为 0.806 mg, 平均为 0.752 mg 考虑到本品在大生产时药材产地不同、药材采收季节不同等原因, 以及在大量加工提取时存在生产条件的差异, 故暂定本品每片含大黄素 ($C_{15}H_{10}O_5$) 计, 不得少于 0.60 mg

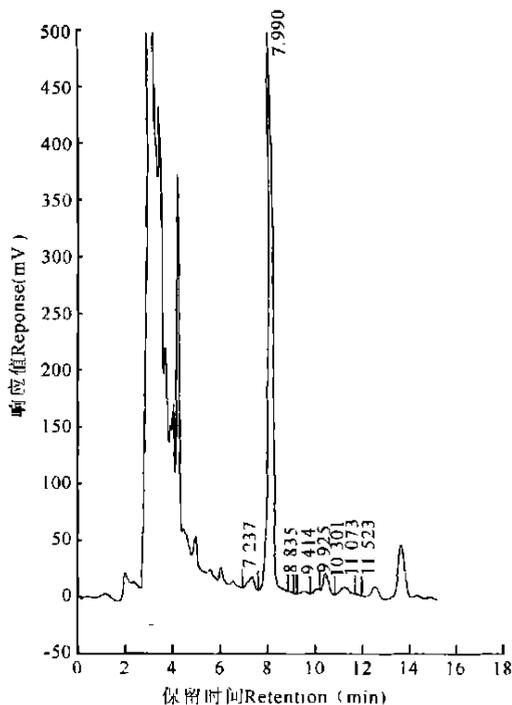


图 5 穿金益肝片样品 HPLC图

Fig. 5 HPLC chromatograms of Chuanjinyigan tablets samples
表 2 10批样品大黄素测定结果

Table 2 Results of assaying the samples

样品批号 Batch sample	含量 1 Content 1 (毫克/片) mg/piece	含量 2 Content 2 (毫克/片) mg/piece	平均含量 Average content (毫克/片) mg/piece	平均相对偏差 Relative average deviation (%)
020418	0.705	0.723	0.71	1.26
020314	0.732	0.741	0.74	0.61
020110	0.757	0.753	0.76	0.26
020313	0.740	0.743	0.74	0.20
020312	0.742	0.745	0.74	0.20
020410	0.733	0.744	0.74	0.74
020204	0.731	0.759	0.74	1.88
020205	0.806	0.784	0.80	1.38
020109	0.765	0.774	0.77	0.58
020311	0.776	0.775	0.78	0.06

4 结束语

对不同比例的甲醇-磷酸进行筛选比较, 最后选定甲醇-0.1%磷酸 (85:15) 为最佳流动相, 分离完全, 所测成分大黄素均与杂质达到基线分离. 大黄素出峰时间为 8 min, 每针高效液相色谱的分析时间为 18 min, 达到分析要求

参考文献

- 周宏晖. 虎杖抗菌活性组分的筛选. 中药材, 1989, 12(11): 48.
- 朱廷儒, 王素贤, 裴月湖, 等. 中药虎杖抗菌活性成分的研究. 中草药, 1985, 16(3): 21.

(责任编辑: 邓大玉)