

HPLC法同时测定虎杖膏中4种成分的含量^Δ

赵萍^{1*},王森¹,欧水平²,任丽¹,王玉和^{2#}(1.遵义医学院药学院,贵州遵义 563006;2.遵义医学院附属医院,贵州遵义 563003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)03-0405-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.33

摘要 目的:建立同时测定虎杖膏中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Xtimate C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为286 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚检测质量浓度线性范围分别为10~60 μg/mL($r=0.999\ 4$)、2.5~15 μg/mL($r=0.999\ 7$)、5~30 μg/mL($r=0.999\ 8$)、2~12 μg/mL($r=0.999\ 6$);定量限分别为0.87、0.44、0.45、0.15 μg/mL,检测限分别为0.46、0.15、0.17、0.07 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为95.00%~102.00%(RSD=2.25%, $n=9$)、95.00%~103.00%(RSD=2.97%, $n=9$)、95.00%~99.56%(RSD=2.05%, $n=9$)、97.50%~102.50%(RSD=1.59%, $n=9$)。结论:该方法准确可靠、操作简便,可用于虎杖膏中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱法;虎杖膏;虎杖苷;白藜芦醇;大黄素;大黄素甲醚;含量测定

Simultaneous Determination of 4 Components in *Reynoutria japonica* Cream by HPLC

ZHAO Ping¹, WANG Sen¹, OU Shuiping², REN Li¹, WANG Yuhe²(1.College of Pharmacy, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563006, China; 2.Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of polydatin, resveratrol, emodin and physcion in *Reynoutria japonica* Cream. METHODS: HPLC was performed on the column of Xtimate C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% Phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 286 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. RESULTS: The linear range was 10-60 μg/mL for polydatin ($r=0.999\ 4$), 2.5-15 μg/mL for resveratrol ($r=0.999\ 7$), 5-30 μg/mL for emodin ($r=0.999\ 8$) and 2-12 μg/mL for physcion ($r=0.999\ 6$); limit of quantitation was 0.87, 0.44, 0.45, 0.15 μg/mL, limit of detection was 0.46, 0.15, 0.17, 0.07 μg/mL; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 95.00%-102.00% (RSD=2.25%, $n=9$), 95.00%-103.00% (RSD=2.97%, $n=9$), 95.00%-99.56% (RSD=2.05%, $n=9$) and 97.50%-102.50% (RSD=1.59%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is reliable, simple, and can be used for the simultaneous determination of polydatin, resveratrol, emodin and physcion in *R. japonica* Cream.

KEYWORDS HPLC; *Reynoutria japonica* Cream; Polydatin; Resveratrol; Emodin; Physcion; Content determination

虎杖膏是由遵义医学院附属医院协定处方,由虎杖粉、冰片等组成,具有清热解毒、消肿定痛之功效,主要用于红肿而未溃烂的疮、痈、疔、疖及无名肿毒等症的治疗,疗效明显^[1]。现有虎杖膏的临床研究较多^[2],尚未有同时测定该制剂中多个成分的报道,鉴于此,本课题组采用高效液相色谱法(HPLC)^[3]建立了同时测定虎杖膏中君药虎杖的主要成分虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的含量,以期对虎杖膏的质量评价提

Δ 基金项目:贵州省科技厅联合基金(黔科合字[2015]7481号、黔科合LH字[2015]7548号);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY-2015-077);贵州省药剂学研究生卓越人才培养计划(黔教研合ZYRC[2014]019);遵义市科技计划课题(遵市科合社字[2014]96号);遵义医学院自然科学招标课题(遵医院办发[2014]10号)

* 硕士研究生。研究方向:医院药学、药物经济学。E-mail: 865593634@qq.com

通信作者:主任药师,教授,硕士生导师。研究方向:医院药学。电话:0851-28609699。E-mail: 1149076068@qq.com

供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括1260型紫外检测器(美国Agilent公司);ME204E型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);BT125D型电子分析天平(德国Sartorius公司);HH-S6型二列方孔水浴(郑州长城科工贸有限公司);Exceed-Cd-20型实验室超纯水机(成都艾科水处理设备有限公司);TGL-16c型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

虎杖膏(遵义医学院附属医院自制,批号:20151125、20151126、20151127,规格:25 g/盒);虎杖苷对照品(批号:111575-200502)、大黄素对照品(批号:110756-201512)、白藜芦醇对照品(批号:111535-200502)、大黄素甲醚对照品(批号:110758-201415)均

购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;乙腈为色谱纯,磷酸、乙醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Xtime C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 286 nm; 柱温: 30 ℃, 进样量: 10 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0	15	15
15	20	80
25	30	70
40	50	50
41	70	30
51	80	20
60	80	20

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取虎杖苷对照品 20.0 mg、白藜芦醇对照品 5.0 mg、大黄素对照品 10.0 mg、大黄素甲醚对照品 4.0 mg, 分别置于不同的 100 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并定容, 作为单一对照品贮备液。精密吸取上述各对照品贮备液各 2.5 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加 95% 乙醇定容, 制成每 1 mL 分别含虎杖苷 50 μg、白藜芦醇 12.5 μg、大黄素 25 μg、大黄素甲醚 10 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品约 0.5 g, 精密称定, 加 95% 乙醇 30 mL, 于 50 ℃ 水浴加热 2 h, 以半径为 5 cm、2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺, 取除虎杖外的其他辅料制备阴性对照品, 再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

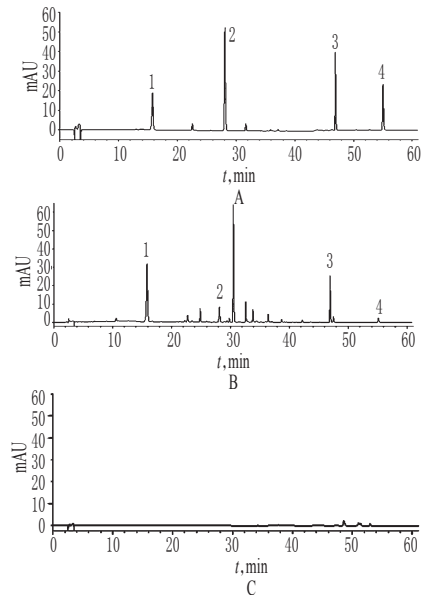
2.3 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可知, 理论板数以虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚计均 ≥ 3 000, 分离度均 > 2; 各成分基线分离良好, 且阴性对照无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 2、4、6、8、10、12 μL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加乙醇定容, 制得系列线性溶液。取上述溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以待测成分质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚的回归方程分别为 $y=87.964x+146.03$ ($r=0.9994$)、 $y=47.841x-6.2733$ ($r=0.9997$)、 $y=45.651x-2.36$ ($r=0.9998$)、 $y=12.474x-0.12$ ($r=0.9996$)。结果, 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲

醚检测质量浓度线性范围分别为 10~60、2.5~15、5~30、2~12 μg/mL。



A.混合对照品; B.供试品; C.阴性对照; 1.虎杖苷; 2.白藜芦醇; 3.大黄素; 4.大黄素甲醚

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.polydatin; 2.resveratrol; 3.emodin; 4.physcion

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 等倍逐步稀释, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。当信噪比为 10:1 时, 得定量限(LOQ); 当信噪比为 3:1 时, 得检测限(LOD)。结果, 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的 LOQ 分别为 0.87、0.44、0.45、0.15 μg/mL, LOD 分别为 0.46、0.15、0.17、0.07 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.35%、0.59%、0.39%、0.89% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号: 20151125)适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.59%、0.89%、0.94%、1.27% ($n=8$), 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号: 20151125)适量, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。结果, 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的平均含量

分别为 2.098、0.445、1.402、0.155 mg/g, RSD 分别为 1.20%、0.96%、1.69%、1.54% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:20151125)适量,共6份,分别加入低、中、高质量的虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚对照品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery test ($n=9$)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
虎杖苷	0.239	0.503	0.400	0.886	95.75	97.52	2.25			
	0.239	0.501	0.400	0.883	95.50					
	0.239	0.507	0.400	0.896	97.25					
	0.239	0.502	0.500	0.986	96.80					
	0.239	0.503	0.500	0.990	97.40					
	0.239	0.502	0.500	0.997	99.00					
	0.239	0.505	0.600	1.075	95.00					
	0.239	0.510	0.600	1.122	102.00					
	0.239	0.502	0.600	1.096	99.00					
	0.235	0.104	0.080	0.186	101.09					
白藜芦醇	0.235	0.103	0.080	0.182	98.75	98.54	2.97			
	0.235	0.099	0.080	0.178	98.75					
	0.235	0.101	0.100	0.204	103.00					
	0.235	0.097	0.100	0.196	99.00					
	0.235	0.102	0.100	0.201	99.00					
	0.235	0.106	0.120	0.220	95.00					
	0.235	0.103	0.120	0.218	95.83					
	0.235	0.108	0.120	0.222	95.00					
	大黄素	0.258	0.382	0.304	0.671			95.07	97.06	2.05
		0.258	0.380	0.304	0.671			95.72		
0.258		0.390	0.304	0.685	97.04					
0.258		0.381	0.380	0.759	99.47					
0.258		0.378	0.380	0.739	95.00					
0.258		0.384	0.380	0.745	95.00					
0.258		0.381	0.456	0.834	99.34					
0.258		0.382	0.456	0.826	98.37					
0.258		0.387	0.456	0.841	99.56					
大黄素甲醚		0.303	0.047	0.040	0.088	102.50	99.00	1.59		
	0.303	0.050	0.040	0.090	100.00					
	0.303	0.052	0.040	0.091	97.50					
	0.303	0.048	0.050	0.097	98.00					
	0.303	0.053	0.050	0.103	100.00					
	0.303	0.053	0.050	0.102	98.00					
	0.303	0.049	0.060	0.108	98.33					
	0.303	0.051	0.060	0.110	98.33					
	0.303	0.052	0.060	0.111	98.33					

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 测定指标的选择

表3 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 3 Results of contents determination of samples ($n=3$, mg/g)

样品批号	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素	大黄素甲醚
20151125	2.109	0.443	1.482	0.155
20151126	2.007	0.490	1.531	0.174
20151127	1.774	0.445	1.447	0.190

虎杖作为虎杖膏中的君药,其主要化学成分为二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类等,其中二苯乙烯类主要有白藜芦醇和虎杖苷(白藜芦醇苷)等化合物,蒽醌类主要有大黄素、大黄素甲醚、大黄素苷等化合物^[4]。近年来,有关研究发现虎杖有确切的抗菌、抗病毒、抗炎作用,其抗菌、抗病毒、抗炎作用的主要物质基础可能与其所含二苯乙烯类以及蒽醌类成分有关^[5]。因此,本试验选择虎杖中二苯乙烯类(虎杖苷和白藜芦醇)和蒽醌类(大黄素、大黄素甲醚)化学成分为测定指标。

3.2 检测波长的选择

本试验参考了相关文献中对虎杖相关成分的测定波长^[6](230、280、285、290、303 nm),其中280、285、290 nm 3个波长较接近,因此本课题组选取“2.2.1”项下各单一对照品溶液在250~300 nm波长范围内进行扫描,结果显示虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚在286 nm处均有较强的吸收,因此选择230、286、303 nm进行预试验。结果,在230 nm波长处各成分基线不稳,在286、303 nm波长处各成分基线稳定,检测限均能满足含量测定要求,且各峰的峰形较好,理论板数较高,但大黄素甲醚在303 nm波长处的紫外吸收较低,因此本试验选择286 nm作为检测波长。

综上所述,本方法准确可靠、操作简便,可用于虎杖膏中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚含量的同时测定。

参考文献

- [1] 易学东,杨建文,吴曾贤.虎杖膏微生物限度检查方法的验证[J].遵义医学院学报,2011(3):250-251.
- [2] 周矜宏,谭先群,代群燕,等.虎杖膏外敷用于I期压疮的效果观察[J].吉林医学,2012,33(28):6121-6122.
- [3] 易学东,张倩茹,张小英.高效液相色谱法测定虎杖膏中大黄素的含量[J].中国医院药学杂志,2011,31(17):1483-1484.
- [4] 刘莉,季金苟,唐南南,等.虎杖中大黄素的分离纯化工艺研究[J].中成药,2013,35(9):2034-2037.
- [5] 贾玉梅,王君明,崔瑛.基于二苯乙烯类为主要活性成分的虎杖药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):263-269.
- [6] 陈华国,赵宏宾,赵超,等.虎杖提取物HPLC指纹图谱归属分析及谱效关系初探[J].中国药房,2010,21(19):1775-1776.

(收稿日期:2016-06-15 修回日期:2016-11-11)

(编辑:刘柳)