

HPLC法同时测定牛黄上清丸中4种蒽醌类化合物的含量

赵丽君*(鞍山市疾病预防控制中心,辽宁鞍山 114002)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0402-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.40

摘要 目的:建立同时测定牛黄上清丸中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚4种蒽醌类化合物含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为甲醇-0.5%磷酸(75:25, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚检测质量浓度线性范围分别为1.50~150、0.95~95、1.30~130、1.15~115 mg/L($r \geq 0.995 0$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD < 2%;加样回收率分别为97.03%~100.40%(RSD=1.23%, $n=9$)、98.37%~102.50%(RSD=1.15%, $n=9$)、98.03%~101.10%(RSD=1.05%, $n=9$)、97.83%~104.50%(RSD=2.16%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于牛黄上清丸中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚4种蒽醌类化合物含量的测定。

关键词 牛黄上清丸;蒽醌类化合物;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Four Anthraquinone Compounds in Niu Huang Shangqing Pill by HPLC

ZHAO Lijun(Anshan Center for Disease Control and Prevention, Liaoning Anshan 114002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of rhein, emodin, chrysophanol and physcion in Niu Huang Shangqing pill. METHODS: HPLC was performed on the column was Kromasil C₁₈ with mobile phase of methanol-0.5% phosphoric acid(75:25, V/V), the column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was 230 nm, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 1.50-150 mg/L for rhein, 0.95-95 for emodin, 1.30-130 for chrysophanol and 1.15-115 mg/L for physcion($r \geq 0.995 0$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 97.03%-100.40% (RSD=1.23%, $n=9$), 98.37%-102.50% (RSD=1.15%, $n=9$), 98.03%-101.10% (RSD=1.05%, $n=9$) and 97.83%-104.50% (RSD=2.16%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, stable with good reproducibility, and can be used for the contents determination of rhein, emodin, chrysophanol and physcion in Niu Huang Shangqing pill.

KEYWORDS Niu Huang Shangqing pill; Anthraquinone compounds; HPLC

牛黄上清丸是由人工牛黄、黄连、大黄、连翘、冰片等19味中药配伍而成的一种中成药,具有清热泻火、散风止痛等功效,可以用于治疗头痛眩晕、目赤耳鸣、咽喉肿痛、口舌生疮等病症^[1]。中成药由于药味较多、成分复杂,在其产品质量的控制上有一定难度。蒽醌类化合物具有较强的泻下、消炎、抗菌作用^[2-3],是牛黄上清丸的主要成分,其含量测定主要为高效液相色谱(HPLC)法^[4-9]。同时测定牛黄上清丸中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等4种蒽醌类化合物含量目前尚未见文献报道。本试验采用HPLC法同时测定了牛黄上清丸中上述4种蒽醌类化合物的含量,以其质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1525型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Waters公司);AL-204型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);HH-2型恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

1.2 药品与试剂

牛黄上清丸(长春人民药业集团,批号:20141001、20141125、20141216,规格:6 g/丸);大黄酸对照品(批号:110757-200005)、大黄素对照品(批号:110756-200110)、大黄酚对照品(批号:110796-201319)、大黄素甲醚对照品(批号:110758-201013)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均为99.8%;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

*主管药师。研究方向:公共卫生管理与药物分析。电话:0412-2962836。E-mail:qpdiao@163.com

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.5%磷酸(75:25, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,理论板数以大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰计分别为9 035、8 804、6 946、4 073,分离度>1.5,各成分基线分离良好。色谱见图1。

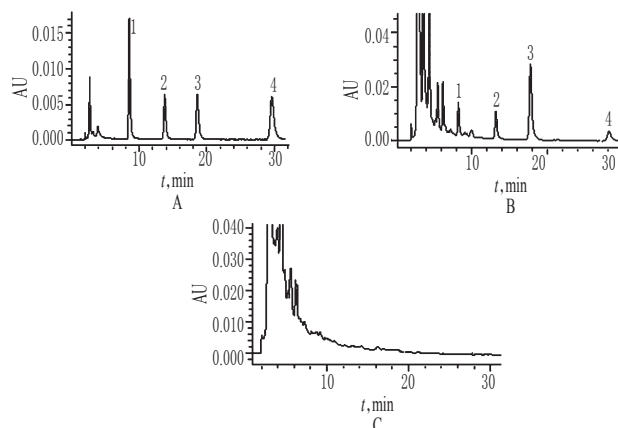


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.大黄酸;2.大黄素;3.大黄酚;4.大黄素甲醚

Fig 1 HPLC chromatograms

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

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精确称取大黄酸(3.0 mg)、大黄素(1.9 mg)、大黄酚(2.6 mg)、大黄素甲醚(2.3 mg),分别置于10 ml棕色量瓶中,用乙醇溶解并定容,得大黄酸(300 mg/L)、大黄素(190 mg/L)、大黄酚(260 mg/L)、大黄素甲醚(230 mg/L)单一对照品贮备液。分别移取上述4种单一对照品贮备液0.1 ml,置于同一10 ml棕色量瓶中,用乙醇定容,制成大黄酸(3.0 mg/L)、大黄素(1.9 mg/L)、大黄酚(2.6 mg/L)、大黄素甲醚(2.3 mg/L)混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精确称取剪碎的样品约1.0 g,置于100 ml圆底烧瓶中,加入20 ml 20% H₂SO₄于沸水浴下水解30 min,用布氏漏斗抽滤除去水解液,滤渣用蒸馏水清洗,滤纸和滤渣在80 ℃下烘干后,以丙酮为溶剂进行索氏提取(60 ℃水浴提取30 min),回流液转移至100 ml量瓶中,用乙醇定容,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按牛黄上清丸处方和制备工艺制备缺大黄的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下单一对照品贮备液各适量,以2、10、20、100、200倍进行倍比稀释,制成系列单一对照品溶液。精密吸取上述系列单一对照品溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各成分质量浓度(x, mg/L)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚回归方程分别为 $y=58\ 126x+5\ 060.6$ ($r=0.998\ 3$)、 $y=41\ 067x+1\ 996.7$ ($r=0.999\ 0$)、 $y=36\ 166x+2\ 121.8$ ($r=0.999\ 0$)、 $y=54\ 987x+5\ 965.5$ ($r=0.995\ 0$)。结果表明,大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚检测质量浓度线性范围分别为1.50~150、0.95~95、1.30~130、1.15~115 mg/L。

2.4 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,大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.26%、0.99%、1.18%和1.01%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:20141001)适量,分别于放置0、2、4、8、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.11%、0.83%、0.94%和1.07%($n=5$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20141001)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.97%、1.02%、1.13%和0.86%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20141001)适量,共9份,分别加入高、中、低质量的大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品,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,计算各成分含量并计算加样回收率,结果见表1。

2.8 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“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并计算各成分含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

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, %
大黄酸	0.501 3	0.263 2	0.200 0	0.458 1	97.45	99.06	1.23
	0.501 1	0.263 1	0.200 0	0.463 3	100.10		
	0.501 5	0.263 3	0.200 0	0.461 9	99.32		
	0.499 5	0.262 2	0.250 0	0.513 2	100.40		
	0.501 3	0.263 2	0.250 0	0.513 9	100.30		
	0.500 9	0.263 0	0.250 0	0.505 5	97.03		
	0.500 7	0.262 9	0.300 0	0.560 9	99.33		
	0.500 4	0.262 7	0.250 0	0.511 0	99.30		
	0.501 1	0.263 1	0.250 0	0.508 8	98.27		
	0.501 3	0.318 8	0.266 0	0.591 5	102.50		
0.501 1	0.318 7	0.266 0	0.585 5	100.30			
0.501 5	0.319 0	0.266 0	0.586 6	100.60			
0.499 5	0.317 7	0.323 0	0.641 3	100.20			
0.501 3	0.318 8	0.323 0	0.642 1	100.10			
0.500 9	0.318 6	0.323 0	0.646 7	101.60			
0.500 7	0.318 4	0.380 0	0.692 3	98.37			
0.500 4	0.318 3	0.380 0	0.697 0	99.66			
0.501 1	0.318 7	0.380 0	0.700 2	100.40			
0.501 3	1.273 0	1.040 0	2.307 0	99.42	99.74	1.05	
0.501 1	1.273 0	1.040 0	2.316 0	100.30			
0.501 5	1.274 0	1.040 0	2.310 0	99.60			
0.499 5	1.269 0	1.300 0	2.583 0	101.10			
0.501 3	1.273 0	1.300 0	2.581 0	100.60			
0.500 9	1.272 0	1.300 0	2.547 0	98.03			
0.500 7	1.272 0	1.560 0	2.812 0	98.72			
0.500 4	1.271 0	1.560 0	2.816 0	99.03			
0.501 1	1.273 0	1.560 0	2.847 0	100.90			
0.501 3	0.138 9	0.115 0	0.259 1	104.50			102.10
0.501 1	0.138 8	0.115 0	0.255 3	101.30			
0.501 5	0.138 9	0.115 0	0.253 7	99.80			
0.499 5	0.138 4	0.138 0	0.273 4	97.83			
0.501 3	0.138 9	0.138 0	0.281 8	103.60			
0.500 9	0.138 7	0.138 0	0.278 8	101.50			
0.500 7	0.138 7	0.161 0	0.306 3	104.10			
0.500 4	0.138 6	0.161 0	0.304 9	103.30			
0.501 1	0.138 8	0.161 0	0.304 6	103.00			

表2 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=3$, mg/g)

批号	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
20141001	0.525	0.636	2.54	0.277
20141125	0.519	0.633	2.52	0.276
20141216	0.524	0.633	2.53	0.274

3 讨论

本试验采用20% H₂SO₄对样品进行水解,使结合态的蒽醌类化合物转化为游离态,以增加样品测定的准确性。并且,本试验比较了二氯甲烷、无水乙醇、甲醇、丙酮、乙醚等不同的索氏提取溶剂的提取效果,发现乙醇、甲醇沸点较高,回流需要较高的温度;二氯甲烷、乙醚提取时间长,并且提取不完全;丙酮的提取效果最为理想,并且在加样回收率试验中证明丙酮提取比较完全,因此选用其作为提取溶剂。

本试验采用甲醇-0.5%磷酸体系作为流动相,其中磷酸作为酸剂调节色谱峰的峰形,提高分离度;甲醇作为有机改性剂。若甲醇比例太高,大黄酸峰与杂质峰分离效果不好;若甲醇比例太低,会延长分析时间。结果表明,当甲醇-0.5%磷酸

HPLC-ELSD 法同时测定脑血栓片中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的含量

周 军*,王 杰,张 蕾(天津市药品检验所中药室,天津 300070)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0404-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.41

摘要 目的:建立测定脑血栓片中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法。色谱柱为 SHIMADZU VP-ODS C₁₈,检测器为蒸发光散射检测器,流动相为乙腈-0.2% 甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸进样量分别在 0.039 84~0.398 4、0.032 064~0.320 64、0.033 952~0.339 52 mg($r \geq 0.999 0$)范围内进样量的对数值与其峰面积的对数值呈良好的线性关系;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 2%;加样回收率分别为 101.33%~104.05%、95.56%~101.38%、96.07%~97.12%,RSD 分别为 0.95%、2.54%、0.44%($n=6$)。结论:该方法简便、准确,适用于脑血栓片中胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸的含量测定。

关键词 高效液相色谱-蒸发光散射检测法;脑血栓片;胆酸;猪去氧胆酸;去氧胆酸

Determination of Cholic Acid, Hyodeoxycholic Acid and Deoxycholate Acid in Naoxueshuan Tablet by HPLC-ELSD

ZHOU Jun, WANG Jie, ZHANG Lei(TCM Room of Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of cholic acid, hyodeoxycholic acid and deoxycholate acid in Naoxueshuan tablet. METHODS: HPLC-ELSD was performed on the column of SHIMADZU VP-ODS C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.2% formic acid (gradient elution) column temperature was 30 ℃, at flow rate of 1.0 ml/min, and the volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.039 84-0.398 4 mg for cholic acid, 0.032 064-0.320 64 mg for hyodeoxycholic acid and 0.0339 52-0.339 52 μg for deoxycholate acid ($r \geq 0.999 0$), and the logarithm value of volume injection and peak area showed good linear relationship; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 101.33%-104.05% (RSD=0.95%, $n=6$), 95.56%-101.38% (RSD=2.54%, $n=6$) and 96.07%-97.12% (RSD=0.44%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and suitable for the contents determination of cholic acid, hyodeoxycholic acid and deoxycholate acid in Naoxueshuan tablet.

KEYWORDS HPLC-ELSD; Naoxueshuan tablet; Cholic acid; Hyodeoxycholic acid; Deoxycholate acid

脑血栓片是临床治疗中风和脑血栓的常用中成药,由丹参、红花、桃仁、人工牛黄等10味中药材组成,具有活血化痰、醒脑通络、潜阳熄风的功效。该药可用于预防和治疗因淤血、肝阳上亢出现的中风先兆,如肢体麻木、头晕目眩等,以及脑血栓形成出现的中风不语、口眼歪斜、半身不遂等症。其处方

中的人工牛黄具有清热解毒、化痰定惊的功效,为佐制药^[1],主要成分包括胆酸、猪去氧胆酸和去氧胆酸等。脑血栓片具有糖衣片和薄膜衣片两种药品规格,其质量标准分别为《卫生部药品标准(中药成方制剂第十九册)》(标准号:WS₃-B-3666-98)及《国家食品药品监督管理局国家药品标准》(标准号:

体积比为 75:25 时,4 种蒽醌类化合物都能得到较好的分离,因此选用其为流动相。

综上所述,本方法操作简便、稳定、重复性好,可用于牛黄上清丸中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 种蒽醌类化合物含量的测定。

参考文献

- [1] 王玉堂,于永,汪子明,等.高压微波辅助提取法提取牛黄上清丸中的黄芩苷[J].高等学校化学学报,2006,27(10):1 862.
- [2] 张丹,蒋心惠.反相高效液相色谱法测定大黄药材中游离及结合型蒽醌类衍生物的含量[J].分析化学,2003,31(4):459.
- [3] 张吴琼,陈红杰,李邴芸,等.芦荟蒽醌类化合物的生物学功效[J].吉林医药学院学报,2013,34(1):52.

- [4] 许乾丽,茅向军,宋晓宁,等.HPLC 法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J].药物分析杂志,2010,30(10):1 841.
- [5] 施翠英,邓放,任波,等.应用 HPLC 法探究虎杖泻心汤中蒽醌类成分的含量[J].中国药房,2012,23(11):1 010.
- [6] 王胤,沈力,周浓,等.HPLC 同时测定大黄剂中的 5 种蒽醌类衍生物[J].光谱实验室,2012,29(5):2 928.
- [7] 郑艳超,李先宽,米宝丽,等.HPLC 测定血脂灵片中 8 种蒽醌类成分的含量[J].中药材,2013,36(6):1 007.
- [8] 任伟光,王冬梅,黄林芳,等.UPLC 法同时测定大黄中 8 个成分的含量[J].药物分析杂志,2014,34(9):1 565.
- [9] 陆建平. HPLC 法测定健胃消炎颗粒中大黄素和大黄酚的含量[J].中国药房,2013,24(24):2 285.

(收稿日期:2015-03-10 修回日期:2015-08-17)

(编辑:张 静)

* 副主任药师,硕士。研究方向:中药分析。电话:022-23513806。E-mail:happy76dragon.com@aliyun.com