

高效液相色谱法测定 排毒清脂片中大黄素、大黄酚的含量

□张祥俊* 刘振华(河南百年康鑫药业有限公司 周口 477150)
张永敬* (北京联合大学 北京 100012)

摘要:目的:建立高效液相色谱法(HPLC)测定排毒清脂片中的大黄素、大黄酚的含量。方法:色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相:甲醇-磷酸溶液(85:15);流速:1mL·min⁻¹;检测波长:254nm。结果:大黄素、大黄酚分离良好,进样量分别在0.007984~0.047904μg和0.01002~0.06012μg范围内与峰面积是良好线性关系,r值分别为0.9991和0.9998,平均回收率分别为99.18%和99.94%,RSD分别为1.19%和1.16%(n=5)。结论:该方法简便、精确、分离效果好、专属性强,可作为排毒清脂片中大黄成分的质量控制方法。

关键词:排毒清脂片 大黄素 大黄酚 高效液相色谱法 含量测定

排毒清脂片是由大黄、西洋参、麦冬三味药材制成的中成药,具有化瘀降脂、通便消痞的功效,临床用于治疗浊瘀内阻所致的单纯性肥胖,高脂血症,痤疮等疾病^[1]。制剂中大黄具有泻热通肠,凉血解毒,逐瘀通经之功效,与本方功能主治基本一致,故选大黄中大黄素、大黄酚作为本方的定量指标。同时采用高效液相法测定大黄素和大黄酚的含量。本法具有操作简便,结果准确,灵敏度高等特点,可准确控制药品质量。

一、仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津 LC-10ATvp);检测器(日本岛津 SPD-10Avp);N2000 数据工作站;赛多利斯 BP211D 型电子天平;上海科导超声仪器有限公司

生产型号 SK8200HP 超声波清洗器;甲醇为色谱纯;水为重蒸馏水;其他试剂采用分析纯;大黄素对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号为110796-200110,供含量测定用);大黄酚对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号为110756-200412,供含量测定用);排毒清脂片(批号:20081208、20081209、20081210)。

二、方法与结果

1. 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相:甲醇-磷酸溶液(85:15);流速:1mL·min⁻¹;柱温:室温;检测波长:254nm^[2];进样量:10μL。在此条件下,色谱图见图1~4。

2. 溶液的制备

(1)对照品溶液的制备。

收稿日期:2009-03-16

修回日期:2009-07-24

* 联系人:张祥俊,工程师,执业药师,主要研究方向:中药制剂技术,E-mail:zxj2008518@163.com;张永敬,副教授,执业药师,主要研究方向:药事管理、GMP,Tel:010-64909416,E-mail:zybj@163.com。

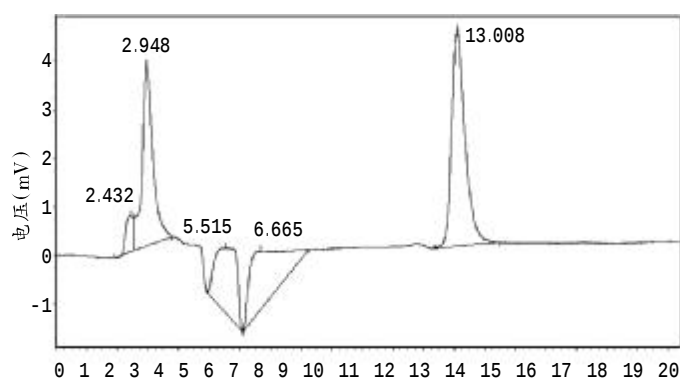


图1 大黄素对照品色谱图

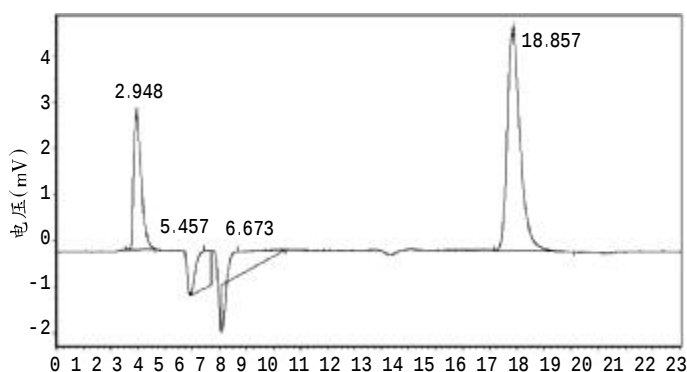


图2 大黄酚对照品色谱图

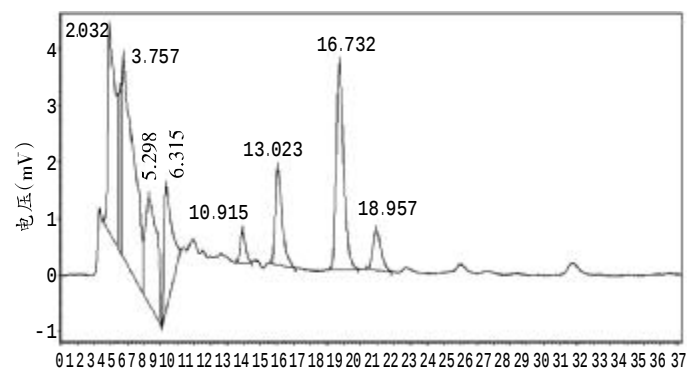


图3 排毒清脂片样品色谱图

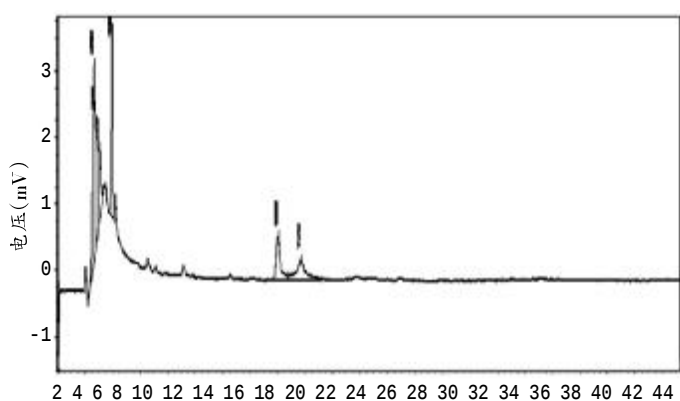


图4 阴性对照样品色谱图

精密称取大黄素、大黄酚对照品各 5mg, 分别置 50mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 分别精密量取大黄素溶液、大黄酚溶液各 1mL, 置 25mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得(大黄素每 1mL 含 3.992 μ g、大黄酚每 1mL 含 4.008 μ g)。

(2) 供试品溶液的制备。

取本品 20 片, 除去包衣, 研细, 取 0.1g, 精密称定, 置 50mL 锥形瓶中, 精密加甲醇 25mL, 称定重量, 加热回流 30min, 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 5mL, 置 50mL 圆底烧瓶中, 挥去甲醇, 加 2.5mol·L⁻¹ 硫酸溶液 10mL, 超声处理 5min, 再加氯仿 10mL, 加热回流 1h, 冷却, 移置分液漏斗中, 用少量氯仿洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取氯仿液, 酸液用氯仿振摇提取 2 次, 每次 10mL, 合并氯仿液, 以无水硫酸钠脱水, 氯仿液移至 100mL 锥形瓶中, 挥去氯仿, 残渣精密加甲醇 10mL, 称定重量, 微热使溶解, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

(3) 缺大黄阴性对照溶液的制备。

依据《国家中成药标准汇编》内科心系分册[处方]中的比例, 按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

3. 方法学考察

(1) 阴性干扰试验。

取阴对照品溶液进样, 依法测定。结果表明, 阴性对照对含量测定无干扰。

(2) 线性关系的考察。

①大黄素的线性关系考察。分别精密取大黄素对照品溶液 (3.992 μ g·mL⁻¹), 2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L、10 μ L、12 μ L 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 试验结果见表 1。

以峰面积积分值为纵坐标, 进样量为横坐标绘制标准曲线, 计算回归方程, $Y=14801X-2026.9$, $r=0.9995$, 表明大黄素在 0.007984~0.047904 μ g 之间呈良好的线性关系。

②大黄酚的线性关系考察。分别精密取大黄酚对照品溶液 (4.002 μ g·mL⁻¹) 2.5 μ L、5 μ L、7.5 μ L、10 μ L、12.5 μ L、15 μ L, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 试验结果见表 2。

以峰面积积分值为纵坐标, 进样量为横坐标绘制标准曲线, 计算回归方程, $Y=19937X-1446.4$, $r=$

0.9999, 表明大黄酚在 0.01002~0.06012 μg 之间呈良好的线性关系。

(3) 精密度试验。

取同一大黄素对照品溶液 (3.992 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和大黄酚对照 (4.008 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 溶液, 分别精密取 10 μL , 重复进样 5 次, 测定大黄素与大黄酚的峰面积, 并计算相对标准偏差。结果见表 3。

结果表明, 精密度良好。

(4) 稳定性试验。

取同一供试品溶液 (20081208), 分别在 0、2、4、6、8h 测定大黄素和大黄酚峰面积, 并计算峰面积积分值的相对标准偏差。结果见表 4。

结果表明, 供试品溶液在 8 小时内稳定。

(5) 重现性试验。

取同一批号 (批号: 20081208) 中试样品, 按供试品溶液制备方法制备 5 份供试液, 分别测定大黄素和大黄酚的峰面积, 并分别计算大黄素和大黄酚的含量和相对标准偏差。结果见表 5。

结果表明, 所建立方法重现性良好。

(6) 加样回收率试验。

取同一批号已知含量供试品 (批号: 20081208; 大黄素和大黄酚含量分别为 0.16、1.05mg/片) 20 片, 除去薄膜衣, 研细, 混匀, 取 0.1g, 精密称定, 共取 5 份, 按下表加入大黄素和大黄酚对照品, 分别按照供试品溶液制备方法制备供试液, 进样量 10 μL , 测得大黄素和大黄酚峰面积, 计算大黄素和大黄酚的含量, 并按下式计算加样回收率, 结果见表 6。

$$\text{加样回收率}(\%) = \frac{\text{测得值} - \text{样品中含量}}{\text{加入量}} \times 100\%$$

结果: 大黄酚平均加样回收率为 99.94%, RSD=1.16%, 大黄素平均加样回收率为 99.18%, RSD=1.19%, 加样回收率符合要求。

表 1 大黄素的线性考察

进样量(μL)	2	4	6	8	10	12
峰面积	25083.15	58978.898	88744.898	116525.805	145028.406	175107.297

表 2 大黄酚的线性考察

进样量(μL)	2.5	5.0	7.5	10	12.5	15
峰面积	49103.699	98640.0	146195.0	197240.047	249153.094	297386.094

表 3 精密度试验(n=5)

序号	1	2	3	4	5	RSD(%)
大黄素峰面积	142372.203	147525.156	146592.906	145412.609	146825.203	1.4
大黄酚峰面积	194309.703	198502.406	196169.703	197466.5	195374.344	0.8

表 4 稳定性试验(n=5)

时间(h)	0	2	4	6	8	RSD(%)
大黄素峰面积	35894.699	35905.848	35006.898	35720.898	35155.805	1.2
大黄酚峰面积	317134.5	317122.219	315391.094	312236.5	312021.906	0.8

表 5 重现性试验(n=5)

序号	1	2	3	4	5	平均值	RSD(%)
大黄素含量(mg/片)	0.156	0.156	0.159	0.160	0.156	0.16	1.23
大黄酚含量(mg/片)	1.034	1.057	1.060	1.065	1.052	1.05	1.12
大黄素大黄酚总和(mg/片)	1.190	1.210	1.220	1.230	1.210	1.210	1.10

表 6 加样回收率试验

取样量(g)	大黄素含量(mg)	大黄酚含量(mg)	加入大黄素量(mg)	加入大黄酚量(mg)	测得值		回收率(%)	
					大黄酚(mg)	大黄素(mg)	大黄酚	大黄素
0.0535	0.0246	0.1612	0.025	0.165	0.3249	0.0490	99.21	97.66
0.0518	0.0238	0.1561	0.025	0.165	0.3219	0.0489	100.47	100.66
0.0534	0.0245	0.1609	0.025	0.165	0.3249	0.0486	101.56	98.65
0.0524	0.0241	0.1579	0.025	0.165	0.3205	0.0491	98.55	100.03
0.0542	0.0249	0.1633	0.025	0.165	0.3218	0.0486	99.92	98.88

4. 样品含量测定

按“溶液的制备”项下方法制备对照品溶液和供试品溶液。各取 10 μL 进样测定, 分别注入液相色谱仪, 记录峰面积, 按外标法计算含量。结果批号为 20080601, 20080903, 20081002 的样品中大黄素和大黄酚的含量总和分别为 1.21mg/片、1.26mg/片、1.30mg/片。

三、讨 论

排毒清脂片中大黄素和大黄酚均在 254nm 波长

处有最大吸收,并且从液相色谱图中显示大黄素、大黄酚和其他组分达到了基线分离,峰形对称,且阴性无干扰,专属性好,故以此为测定波长。

本方法简便、准确、稳定性好、专属性强,可作为该制剂中大黄素、大黄酚的定量控制方法。

参考文献

- 1 国家中成药标准汇编.内科.心系分册,188.
- 2 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:化学工业出版社,2005:17.

Determination of the rhubarb content of poison discharging and lipid clearing tablets by HPLC

Zhang Xiangjun¹, Liu Zhenhua¹, Zhang Yongjing²

(1 Bainian Kangxin Pharmaceutical Co., Ltd., Henan 477150, China;

2 Beijing Union University, Beijing 100012, China)

Abstract: HPLC was established for the determination of the rhubarb content of poison discharging and lipid clearing tablets. Using XB-C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5μm) as the chromatographic column and methanol-phosphoric acid (85:15) as the mobile phase, emodin and chrysophanol were well separated at the flow rate of 1mL·min⁻¹ and wavelength of 254nm. Their volumes showed a good linear relationship with the area respectively in the range of 0.007984~0.047904μg and 0.01002~0.06012μg. The r value was 0.9991 and 0.9998, the average recovery 99.18% and 99.94%, and RSD 1.19% and 1.16% (n = 5) respectively for emodin and chrysophanol. The results showed that this method is simple and accurate, with high separating efficiency and good specificity. All these features make HPLC a candidate measure for the quality control of the rhubarb content of poison discharging and lipid clearing tablets.

Keywords: poison discharging and lipid clearing tablet; emodin; chrysophanol; HPLC; determination

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立巍)

科学家找到一种艾滋病治疗全新方法

加拿大和美国的研究人员找到了一种治疗艾滋病全新方法。新方法将定向化疗方法与目前较为普遍使用的高效抗逆转录病毒疗法结合使用,为治疗艾滋病提供了一个新的可能。

据参与研究工作的科学家介绍,这种新的治疗方法既可以杀灭在人体内四处游荡的病毒,还能够杀灭隐藏在免疫细胞内的病毒。该项研究成果的价值在于它为全世界研究艾滋病治疗的科学家指明了前进的方向,为找到一种全新的具有创新性的艾滋病治疗方法奠定了基础。相关文章发表在6月21日出版的《自然医学》杂志上。

迄今为止,抗艾滋病治疗的疗效一直不甚理想,原因是病毒隐藏在免疫系统细胞里,而目前使用的高效抗逆转录病毒疗法对躲藏在免疫细胞内的病毒无计可施。加拿大和美国的研究人员成功地识别出那些躲藏有病毒的细胞,找到了病毒可以逃避现有治疗的“隐身”机理。

参与研究工作的麦吉尔大学血液学家基恩·罗迪教授认为,该项研究成果首次证明所谓的艾滋病病毒潜伏池现象并不是因

为抗逆转录药物缺乏效力,而是由于病毒隐藏在两种不同类型的长寿命CD4记忆免疫细胞内。艾滋病病毒潜伏池有几种类型,每一种类型潜伏池都需要不同的治疗方法来消除它们。一旦病毒隐藏在这些潜伏池细胞里,它们就会对其产生依赖。如果细胞存活,病毒就可以存活,但如果细胞死亡,则病毒也无法存活。因此,消灭这些免疫细胞就能够杀灭这些隐藏其中的病毒。现存的高效抗逆转录病毒疗法可以杀灭在体内流传的病毒,但是无法对付隐藏在潜伏池细胞内的病毒。

主持研究工作的蒙特利尔大学塞卡里教授表示,该研究结果与用于治疗白血病采取的策略相似,即同样是定向化疗,并同时与定向免疫治疗相结合。这种方法既可以杀灭细胞中的病毒,同时也为免疫系统留出时间再生健康细胞。

研究人员认为,目前所得到的成果为开发出全新的抗艾滋病病毒治疗方法提供了一个重要的选项,但要进入实际应用还需要若干年进一步的研究工作。

(文 摘)