

紫白栓中总蒽醌的高效液相色谱法定量控制研究

肖 钦 吴学辉

福建中医药大学附属人民医院药学部, 福建 福州 350004

【摘要】 目的 建立紫白栓中总蒽醌的高效液相色谱法定量控制方法。方法 采用 Capcell C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相采用乙腈-0.2% 磷酸 (80:20); 柱温保持 30 ℃; 流动相选择乙腈-0.2% 磷酸 (80:20), 流速维持 1.0 mL/min; 进样量采用 10 μL; 检测波长选择 254 nm。结果 紫白栓中总蒽醌以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚计分别在 1.48 ~ 29.60 μg/mL ($r = 0.9999$)、0.24 ~ 4.80 μg/mL ($r = 0.9996$)、0.32 ~ 6.40 μg/mL ($r = 0.9995$)、0.45 ~ 9.00 μg/mL ($r = 0.9991$) 和 0.66 ~ 13.20 μg/mL ($r = 0.9998$) 的范围内具有良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 98.95% (1.25%)、100.19% (0.66%)、99.73% (1.01%)、99.01% (0.82%) 和 97.36% (1.57%)。结论 高效液相色谱法检测芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量的方法可用于紫白栓的质量评价。

【关键词】 紫白栓; 芦荟大黄素; 总蒽醌; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚

紫白栓由紫草、白及、大黄、煅石膏、冰片加适量凡士林加工而成, 由福建中医药大学附属人民医院的医院制剂紫白膏改剂型而来。紫白栓为肛肠科用药, 主要用于治疗内、外痔, 肛裂, 肛周炎之血热证。紫白栓现行标准仅有所含药味 TLC 定性及栓剂通则项检查, 检索到与之相关的文献有多成分的定量控制^[1-2], 为了进一步全面科学地评价紫白栓内在质量, 本实验采用 HPLC 法同时测定紫白栓中总蒽醌的含量, 以期为紫白栓质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

LC-20AB 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); XP-6 型电子天平 (瑞士梅特勒托利多公司); JK-250DB 型数控超声波清洗器 (合肥金尼克超声仪器有限公司)。试验所用芦荟大黄素对照品 (批号: 110795-202011, 质量分数: 97.5%)、大黄酸对照品 (批号: 110757-201607, 质量分数: 99.3%)、大黄素对照品 (批号: 110756-201913, 质量分数: 96.0%)、大黄酚对照品 (批号: 110796-201922, 质量分数: 99.4%) 和大黄素甲醚对照品 (批号: 110758-201817, 质量分数: 99.2%) 均来源于中国食品药品检定研究院; 水为纯净水, 乙腈和磷酸为色

谱纯级别, 其它试剂选用分析纯。

2 方法与结果

2.1 混合对照品贮备液 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量, 精密称定并用 70% 甲醇溶液制成 5 种成分质量浓度分别为 0.296 mg/mL、0.048 mg/mL、0.064 mg/mL、0.090 mg/mL 和 0.132 mg/mL 的混合对照品贮备液。

2.2 混合对照品溶液 分别精密吸取混合对照品贮备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL, 各用 70% 甲醇溶液稀释至 20 mL, 摇匀制成 6 个系列的混合对照品溶液 I ~ VI; 取中间混合对照品溶液 III 作为混合对照品溶液 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品的质量浓度分别为 14.8 μg/mL、2.4 μg/mL、3.2 μg/mL、4.5 μg/mL 和 6.6 μg/mL)。

2.3 紫白栓样品溶液 取紫白栓适量, 精密称定 2.0 g, 用 70% 甲醇溶液定容至 25 mL, 对样品保持超声 30 min, 放冷至室温, 再用 70% 甲醇定容, 摇匀, 滤过, 续滤液即为紫白栓样品溶液。

2.4 阴性样品溶液 取按处方工艺制备缺大黄的阴性样品, 按“2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

作者简介: 肖钦 (1975-), 女, 主任药师, 从事药物质量控制等医院药学相关工作。

基金项目: 福建省科技厅引导性项目 (2018Y0043)

2.5 色谱条件 采用 Capcell C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温保持 30 ℃; 流动相选用乙腈-0.2% 磷酸 (80:20), 流速维持 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长选择 254 nm。

2.6 专属性实验 吸取“2.2~2.4”项下的混合对照品溶液、紫白栓样品溶液和阴性样品溶液, 按“2.5”项下色谱条件进样检测, 结果紫白栓样品液相色谱图中有与芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品保留时间一致的色谱峰, 且与相邻色谱峰的分度度不小于 1.5, 理论板数按芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚色谱峰计均不小于 3500, 大黄阴性样品不干扰检测。

2.7 线性关系考察 分别精密吸取“2.2”项下 6 个系列混合对照品溶液, 按“2.5”项下色谱条件进样检测, 以对照品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的质量浓度 (X, μg·mL⁻¹) 作为横坐标, 峰面积 (Y) 作为纵坐标进行线性回归, 得回归方程、相关系数见表 1。

表 1 紫白栓中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	相关系数 r	范围 / μg·mL ⁻¹
芦荟大黄素	$Y=9.2018 \times 10^5 X - 443.7$	0.999 9	1.48 ~ 29.60
大黄酸	$Y=2.3656 \times 10^5 X + 109.4$	0.999 6	0.24 ~ 4.80
大黄素	$Y=2.0473 \times 10^5 X + 657.2$	0.999 5	0.32 ~ 6.40
大黄酚	$Y=1.9339 \times 10^5 X - 924.5$	0.999 1	0.45 ~ 9.00
大黄素甲醚	$Y=7.1702 \times 10^5 X - 360.1$	0.999 8	0.66 ~ 13.20

2.8 精密度实验 取 2.1 项下混合对照品溶液, 按“2.5”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.95%、1.33%、1.21%、1.19% 和 1.06%, 说明实验用仪器精密度良好。

重复性实验 取同一批紫白栓样品 (批号: 200811), 按“2.3”项下方法配制 6 份样品溶液, 再按“2.5”项下色谱条件检测, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量的 RSD 分别为 1.38%、1.89%、1.72%、1.53% 和 1.47%, 表明方法重复性良好。

稳定性实验 取紫白栓样品 (批号: 200811), 按“2.3”项下方法制备一份紫白栓样品溶液, 于配制后每隔 4 h (即 0、4、8、12、16、20、24 h), 考察至 24 h, 按“2.5”项下色谱条件检测, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.10%、1.45%、1.33%、1.29% 和 1.26%, 结果表明紫白栓样品溶液 24 h 内具有稳定性。

2.9 加样回收率实验 取紫白栓样品 (批号: 200811) 9 份, 每份精密称定 1.0 g, 3 份均分为 1 组, 每组分别精密加入混合对照品溶液 (芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品的质量浓度分别为 0.165 mg/mL、0.029 mg/mL、0.037 mg/mL、0.055 mg/mL 和 0.081 mg/mL) 0.8、1.0 和 1.2 mL, 再按“2.3”项下的方法制成加样回收样品溶液, 按“2.5”项下色谱条件检测, 计算回收率及相应 RSD 值, 结果见表 2。

2.10 含量测定 取 3 批紫白栓样品 (批号: 200811、201006、201119), 按“2.3”项下的方法制成紫白栓样品溶液, 每批平等制备 3 份样品溶液, 按“2.5”项下色谱条件检测, 结果见表 3。

表 3 紫白栓中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量测定结果 (mg/g, n = 3)

批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
200811	0.168	0.026	0.039	0.052	0.075
201006	0.139	0.031	0.033	0.061	0.062
201119	0.190	0.021	0.047	0.043	0.089

3 讨论

本实验在选择确定流动相时, 考察了乙腈-0.2% 磷酸、甲醇-0.2% 磷酸和乙腈-0.1% 甲酸流动相体系, 结果显示以乙腈-0.2% 磷酸检测效果最好, 基线平稳, 峰形好, 分离度 ≥ 1.5。实验还对样品提取方式进行了优化, 考察了 60%、70%、100% 甲醇, 超声和回流提取, 提取 20、30、40 min 时提取率及杂质情况, 结果表明 70% 甲醇提取 30 min 提取率较高且杂质少。

采用 HPLC 法对紫白栓中总蒽醌以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚计的定量控制研究, 方法操作简便, 结果准确可靠, 可为紫白栓质量控制和综合评价提供更好地技术参考。

表 2 紫白栓样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的加样回收率实验数据

	称取量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD/%
芦荟大黄素	1.0004	0.1681	0.1320	0.2993	99.39	98.95	1.25
	0.9968	0.1675	0.1320	0.2982	99.02		
	1.0101	0.1697	0.1320	0.2973	96.67		
	1.0059	0.1690	0.1650	0.3294	97.21		
	0.9843	0.1654	0.1650	0.3296	99.52		
	0.9717	0.1632	0.1650	0.3265	98.97		
	1.0215	0.1716	0.1980	0.3693	99.85		
	1.0037	0.1686	0.1980	0.3654	99.39		
	0.9890	0.1662	0.1980	0.3653	100.56		
	1.0004	0.0260	0.0232	0.0494	100.86		
大黄酸	0.9968	0.0259	0.0232	0.0490	99.57	100.19	0.66
	1.0101	0.0263	0.0232	0.0496	100.43		
	1.0059	0.0262	0.0290	0.0552	100.00		
	0.9843	0.0256	0.0290	0.0548	100.69		
	0.9717	0.0253	0.0290	0.0540	98.97		
	1.0215	0.0266	0.0348	0.0616	100.57		
	1.0037	0.0261	0.0348	0.0612	100.86		
	0.9890	0.0257	0.0348	0.0604	99.71		
	1.0004	0.0390	0.0296	0.0688	100.68		
	0.9968	0.0389	0.0296	0.0680	98.31		
大黄素	1.0101	0.0394	0.0296	0.0687	98.99	99.73	1.01
	1.0059	0.0392	0.0370	0.0764	100.54		
	0.9843	0.0384	0.0370	0.0757	100.81		
	0.9717	0.0379	0.0370	0.0746	99.19		
	1.0215	0.0398	0.0444	0.0835	98.42		
	1.0037	0.0391	0.0444	0.0836	100.23		
	0.9890	0.0386	0.0444	0.0832	100.45		
	1.0004	0.0520	0.0440	0.0958	99.55		
	0.9968	0.0518	0.0440	0.0951	98.41		
	1.0101	0.0525	0.0440	0.0964	99.77		
大黄酚	1.0059	0.0523	0.0550	0.1059	97.45	99.01	0.82
	0.9843	0.0512	0.0550	0.1063	100.18		
	0.9717	0.0505	0.0550	0.1049	98.91		
	1.0215	0.0531	0.0660	0.1186	99.24		
	1.0037	0.0522	0.0660	0.1175	98.94		
	0.9890	0.0514	0.0660	0.1165	98.64		
	1.0004	0.0750	0.0648	0.1374	96.30		
	0.9968	0.0748	0.0648	0.1371	96.14		
	1.0101	0.0758	0.0648	0.1407	100.15		
	1.0059	0.0754	0.0810	0.1539	96.91		
大黄素甲醚	0.9843	0.0738	0.0810	0.1516	96.05	97.36	1.57
	0.9717	0.0729	0.0810	0.1513	96.79		
	1.0215	0.0766	0.0972	0.1701	96.19		
	1.0037	0.0753	0.0972	0.1713	98.77		
	0.9890	0.0742	0.0972	0.1704	98.97		

参考文献

- [1] 吴学辉,肖钦,肖淋,等.HPLC法同时测定紫白栓中9种成分[J].中成药,2020,42(8):1991-1995.
- [2] 邱水生,肖淋,肖钦,等.正交试验优选紫白栓中大黄的提取工艺[J].海峡药学,2020,32(9):46-48.
- [3] 杨亚婷,王嫦鹤,王荪璇.大黄碳酸氢钠片总蒽醌含量测定及指纹图谱研究[J].西北药学杂志,2020,35(1):45-48.
- [4] 卞理,窦志华,王丹丹,等.《中华人民共和国药典》大黄总蒽醌含量测定方法的改进[J].国际中医中药杂志,2021,43(2):156-160.
- [5] 周燕霞,毛坤军,周慧云,等.大黄通便胶囊中5种蒽醌类化合物的含量测定[J].广州化工,2018,46(22):79-81.