

HPLC法同时测定复方消痔栓中3种成分的含量

齐广才*,吴江瑞,张咪咪,崔生飞,刘珍叶(延安大学化学与化工学院,陕西 延安 716000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)15-2138-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.15.41

摘要 目的:建立同时测定复方消痔栓中没食子酸、大黄酸和大黄素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为0.5%磷酸-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为273 nm(没食子酸)、254 nm(大黄酸和大黄素),柱温为28 ℃,进样量为20 μl。结果:没食子酸、大黄酸、大黄素的检测质量浓度线性范围分别为0.296 4~14.82、0.215 0~10.75、0.307 2~15.36 μg/ml($r=0.999\ 6$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为95.1%~97.2%、95.4%~97.2%、96.5%~99.4%,RSD分别为0.64%、0.42%、1.10%($n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确,可用于复方消痔栓中没食子酸、大黄酸和大黄素含量的同时测定。

关键词 复方消痔栓;没食子酸;大黄酸;大黄素;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Three Kinds of Components in Compound Xiaozhi Suppository by HPLC
QI Guangcai, WU Jiangrui, ZHANG Mimi, CUI Shengfei, LIU Zhenye (School of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Shaanxi Yan'an 716000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of gallic acid, rhein and emodin in Compound xiaozhi suppository. METHODS: HPLC was performed on the column of Kromasil C₁₈ with mobile phase of 0.5% phosphoric acid-Acetonitrile solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 273 nm for gallic acid and 254 nm for rhein and emodin, the column temperature was 28 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 0.296 4-14.82 μg/ml for gallic acid ($r=0.999\ 6$), 0.215 0-10.75 μg/ml for rhein ($r=0.999\ 9$) and 0.307 2-15.36 μg/ml for emodin ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3.0%; recoveries were 95.1%-97.2% (RSD=0.64%, $n=6$), 95.4%-97.2% (RSD=0.42%, $n=6$) and 96.5%-99.4% (RSD=1.10%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the contents determination of gallic acid, rhein and emodin in Compound xiaozhi suppository.

KEYWORDS Compound xiaozhi suppository; Gallic acid; Rhein; Emodin; HPLC

复方消痔栓是由五倍子、大黄、白螺蛳壳、青果壳以及冰片组成的复方制剂,具有收敛止血的功效,主要用于内痔出血等病症的治疗。其中,五倍子具有敛肺降火、收湿敛疮的功效,其主要有效成分为没食子酸^[1-4];大黄具有清热泻火、凉血解毒的功效,其有效成分为大黄素和大黄酸^[5-10]。目前,已有文献仅报道了复方消痔栓中大黄素的含量测定^[11],为了更好地控制该药品的质量,提供全面科学的评价标准,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法建立了同时测定复方消痔栓中没食子酸、大黄酸和大黄素含量的方法;并参考相关文献^[12-15],采用固相萃取法对样品进行提取优化,避免杂质的干扰。

1 材料

1.1 仪器

1200 型 HPLC 仪,包括 G1311A 型四元泵、手动进样器、二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);SPE-12G Glass Column Processor 型固相萃取装置(美国 J.T. Baker 公司);HyperSep C₁₈ 型固相萃取柱(美国 Ameritech 公司);AUY220 型万分之一电子分析天平(日本 Shimadzu 公司);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:40 kHz);LG10-2.4A 型高速离心机(北京医用离心机厂)。

1.2 药品与试剂

复方消痔栓(吉林吉春制药股份有限公司,批号:130508、140301,规格:2 g/粒);没食子酸对照品(批号:110831-201204,

纯度:98.1%)、大黄酸对照品(批号:110757-200206,纯度:98.0%)、大黄素对照品(批号:110756-200110,纯度:98.7%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.5%磷酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:273 nm(没食子酸)、254 nm(大黄酸和大黄素)(波长切换程序如下:0~8 min, 273 nm;8~10 min, 370 nm;10~14 min, 254 nm);柱温:28 ℃,进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	A,%	B,%
0~4	22.0	78.0
4~5	30.0	70.0
5~8	45.0	55.0
8~9	59.0	41.0
9~13	69.0	31.0

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取没食子酸对照品、大黄酸对照品和大黄素对照品适量,精密称定,分别置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成每1 ml分别含没食子酸370.4 μg、大黄酸

*教授,硕士。研究方向:色谱分析。E-mail:qjgc@163.com

336.0 μg、大黄素 96.00 μg 的单一对照品贮备液。分别精密量取上述没食子酸对照品贮备液 1.00 ml、大黄酸对照品贮备液 0.80 ml 和大黄素对照品贮备液 4.00 ml，置于同一 25 ml 量瓶中，加甲醇定容，制成每 1 ml 分别含没食子酸 14.82 μg、大黄酸 10.75 μg、大黄素 15.36 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量，切碎至粉末，精密称取 2.0 g，置于 25 ml 具塞离心管中，精密加入浓度为 0.04 mol/ml 的盐酸溶液 1.00 ml、70% 甲醇 24.00 ml，称定质量，超声(功率:200 W，频率:40 kHz)处理 30 min，冷却至室温，用 70% 甲醇补足减失的质量，以半径为 3.0 cm、7 500 r/min 离心 10 min，取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。精密吸取 5.00 ml 续滤液上样至预先用甲醇活化、水(5 ml)平衡的固相萃取柱中，用 5% 甲醇淋洗，弃去全部淋洗液，最后用 80% 甲醇(5 ml)洗脱，即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按复方清痔栓的处方比例及制备工艺，取处方中除大黄、五倍子的其他味药，制得阴性对照品，按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量，按“2.1”项下色谱条件进样均能达到基线分离，分离度>1.5，理论板数以大黄素峰计不低于 3 000，保留时间为 13 min。结果表明，其他成分对测定无干扰。色谱见图 1。

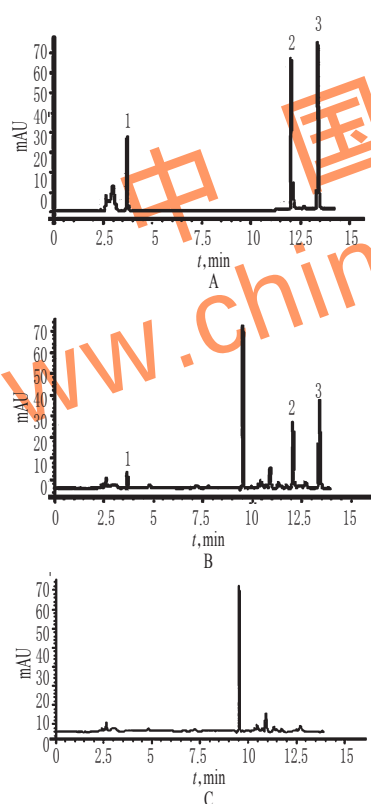


图 1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.没食子酸;2.大黄酸;3.大黄素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.gallic acid; 2.rhein;3.emodin

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液各 0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、25.00 ml，分别置于 25 ml 量瓶中，加甲醇定容，制

成系列混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归，得回归方程与线性范围，详见表 2。

表 2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
没食子酸	y=20.034x+5.001 6	0.296 4~14.82	0.999 6
大黄酸	y=65.246x+12.59	0.215 0~10.75	0.999 9
大黄素	y=52.582x+6.795 5	0.307 2~15.36	0.999 9

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液，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 3:1 时，得检测限(LOD);当信噪比为 10:1 时，得定量限(LOQ)，结果见表 3。

表 3 检测限与定量限考察结果

Tab 3 Determination results of detection limit and quantitation limit

待测成分	LOD,ng	LOQ,ng
没食子酸	0.10	0.35
大黄酸	0.15	0.51
大黄素	0.18	0.59

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10.0 ml，置于 25 ml 量瓶中，加甲醇定容。按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，没食子酸、大黄酸、大黄素峰面积的 RSD 分别为 1.60%、0.96%、0.67%(n=6)，表明仪器精密度高。

2.7 稳定性试验

精密量取同一供试品溶液(批号:130508)20 μl，分别于放置 0、2、4、6、8、10 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，没食子酸、大黄酸、大黄素峰面积的 RSD 分别为 2.40%、2.20%、1.50%(n=6)，表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:130508)适量，按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，再按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，没食子酸、大黄酸、大黄素峰面积的 RSD 分别为 1.80%、1.60%、1.10%(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:130508)适量，共 6 份，分别精密加入一定质量的没食子酸、大黄酸、大黄素对照品，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，记录峰面积并计算加样回收率，结果见表 4。

2.10 样品含量测定

取两批样品各适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，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，结果见表 5。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

3.1.1 提取方式对提取效果的考察 本试验尝试采用水浴回流和超声提取对供试品溶液进行提取。结果，二者所得的提

取效率并无明显差异,基于超声提取方法步骤简便、易于操作、节省时间,故选择超声提取为本试验的提取方式。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量,g	样品含量,μg	加入量,μg	测得量,μg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
没食子酸	2.002	35.20	29.63	63.68	96.1	96.0	0.64
	2.005	35.25	29.63	64.05	97.2		
	2.004	35.23	37.04	70.97	96.5		
	2.001	35.18	37.04	70.48	95.3		
	2.008	35.30	44.45	77.58	95.1		
	2.001	35.18	44.45	77.73	95.7		
大黄酸	2.002	53.39	43.68	95.06	95.4	96.3	0.42
	2.005	53.47	43.68	95.49	96.2		
	2.004	53.45	53.76	105.10	96.1		
	2.001	53.37	53.76	105.20	96.4		
	2.008	53.55	63.84	115.60	97.2		
	2.001	53.37	63.84	115.20	96.9		
大黄素	2.002	95.30	76.80	170.90	98.4	97.8	1.10
	2.005	95.44	76.80	170.40	97.6		
	2.004	95.40	96.00	188.00	96.5		
	2.001	95.25	96.00	189.30	98.0		
	2.008	95.58	115.20	210.10	99.4		
	2.001	95.25	115.20	206.50	96.6		

表5 样品测定结果(n=6)

Tab 5 Results of content determination of sample(n=6)

样品批号	没食子酸		大黄酸		大黄素	
	含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%
130508	0.017 58	1.2	0.026 67	1.4	0.047 60	0.96
140301	0.010 29	1.0	0.016 39	1.2	0.030 21	1.1

3.1.2 提取溶剂对提取效果的考察 本试验考察了不同提取溶剂水、乙腈、甲醇、三氯甲烷、乙醇以及70%甲醇对没食子酸、大黄酸、大黄素3组分提取效果的影响。结果,乙腈、三氯甲烷无法提取出没食子酸;水和乙醇对大黄酸以及大黄素的提取率偏低;而甲醇和70%甲醇对三者均具有良好的提取效果。鉴于70%甲醇较甲醇对3组分的提取率更高,故选择70%甲醇作为本试验的提取溶剂。

3.1.3 提取时间对提取效果的考察 本试验还分别考察了不同提取时间10、30、50、70、110 min对没食子酸、大黄酸、大黄素3组分提取率的影响。结果,超声30 min各个组分的提取效果较好,当超声处理超过30 min,各组分的提取率相比差异不大,为节约试验时间,确定超声30 min为本试验的最佳提取时间。

3.2 固相萃取条件的选择

3.2.1 淋洗液对固相萃取效果的考察 本试验还对体积分数分别为1%、3%、5%、7%、10%甲醇作为淋洗溶液进行了考察。结果,5%甲醇不仅能有效除去杂质、得到良好的峰形,而且并未将没食子酸、大黄酸、大黄素3组分洗脱,故选择5%甲醇作为淋洗液。

3.2.2 洗脱溶剂对固相萃取效果的考察 本试验对不同体积分数甲醇(10%、30%、50%、70%、80%、100%)作为洗脱溶剂进行了考察。结果,随着甲醇体积分数的增大,大黄酸与大黄素的回收率呈上升趋势;但当甲醇体积分数达70%时,没食子

酸回收率呈下降趋势;当甲醇体积分数达80%时,三者均可获得较高的回收率。因此,综合考虑选取80%甲醇溶液为本试验的洗脱溶剂。

3.2.3 洗脱体积对固相萃取的影响 在预试验中,考察了不同洗脱体积(1、3、5、7、9、10 ml)对固相萃取效率的影响。结果,当洗脱体积为5 ml时,没食子酸、大黄酸、大黄素3组分可被完全洗脱,为节省溶剂,本试验选取洗脱体积为5 ml。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,可用于复方消痔栓中没食子酸、大黄酸和大黄素含量的同时测定。

参考文献

[1] 刘敏,李水福,程科军.HPLC法测定畚药地稔药材中没食子酸和槲皮素[J].中草药,2012,43(4):721.

[2] 董娟妮,闫高颖,杨洋,等.HPLC法同时测定乐脉胶囊中9种成分[J].中成药,2013,35(12):2 644.

[3] 何兵,刘艳,杨世艳,等.HPLC一测多评法同时测定双青咽喉片中10种成分[J].中草药,2013,44(8):974.

[4] 吴一振,杨洋,董娟妮,等.冠心七味片中丹参素、没食子酸、原儿茶酸和原儿茶醛的测定[J].中成药,2013,35(11):2 418.

[5] 蒋秋香,韦永朴,莫海彦.HPLC同时测定排毒胶囊中的2种有效成分[J].华西药学杂志,2016,31(1):88.

[6] 赵丽君.HPLC法同时测定牛黄上清丸中4种蒽醌类化合物的含量[J].中国药房,2016,27(3):402.

[7] 谢剑琳,张振秋,梁朔,等.HPLC波长切换法同时测定大黄、牡丹皮对提取物中11个成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(1):103.

[8] 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.

[9] 宁恺佳,敬永生.RP-HPLC法测定王氏保赤丸中大黄素的含量[J].河南大学学报,2015,34(4):256.

[10] 刁全平,郭华,吕琳琳,等.高效液相色谱法测定牛黄清火丸中蒽醌类化合物的含量[J].中国生化药物杂志,2015,35(12):177.

[11] 干国平,李秋怡,朱红,等.复方消痔栓质量标准研究[J].中成药,2007,29(1):153.

[12] 贾春燕,王萍,聂继红.消痔栓质量标准的研究[J].新疆中医药,2011,29(3):33.

[13] 王义潮,朱婧怡,崔延堂,等.大黄中大黄酸提取新方法研究[J].西北药学杂志,2011,26(2):84.

[14] 陈云龙,卢小凤,廖锦彬,等.HPLC测定双黄祛毒片中7种成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):119.

[15] 姜晖,王绍志,张熙洁,等.HPLC法同时测定利脑心胶囊中6种成分的含量[J].中国药房,2015,26(3):374.

(收稿日期:2015-10-11 修回日期:2016-03-12)

(编辑:刘 柳)