

HPLC法同时测定六味能消丸中8种成分的含量

康 慧^{1*}, 刘亚蓉^{2#}(1.青海省人民医院药房, 西宁 810008; 2.青海省药品检验检测院, 西宁 810016)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3433-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.35

摘要 目的:建立同时测定六味能消丸中土木香内酯、异土木香内酯、没食子酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为254 nm(土木香内酯、异土木香内酯、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚)、270 nm(没食子酸),柱温为25 ℃,进样量为10 μL。结果:土木香内酯、异土木香内酯、没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚检测进样量线性范围分别为0.121~3.63 μg($r=0.999\ 9$)、0.122~3.66 μg($r=0.999\ 9$)、0.219~6.57 μg($r=0.999\ 9$)、0.016 4~0.492 μg($r=0.999\ 7$)、0.017 3~0.519 μg($r=0.999\ 9$)、0.015 3~0.459 μg($r=0.999\ 9$)、0.007 2~0.216 μg($r=0.999\ 9$)、0.016 2~0.486 μg($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.41、0.26、0.35、0.13、0.17、0.14、0.15、0.13 ng,检测限分别为0.12、0.08、0.11、0.04、0.05、0.04、0.05、0.04 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为98.05%~102.46%(RSD=1.75%, $n=6$)、98.55%~102.89%(RSD=1.91%, $n=6$)、98.53%~102.34%(RSD=1.66%, $n=6$)、101.71%~103.41%(RSD=0.57%, $n=6$)、101.04%~103.01%(RSD=0.69%, $n=6$)、101.63%~102.75%(RSD=0.39%, $n=6$)、96.94%~101.11%(RSD=1.61%, $n=6$)、98.06%~99.10%(RSD=0.40%, $n=6$)。结论:该方法准确、简便,可用于六味能消丸中8种成分含量的同时测定。

关键词 六味能消丸;土木香内酯;异土木香内酯;没食子酸;大黄素;芦荟大黄素;大黄酸;大黄素甲醚;大黄酚;高效液相色谱法;含量

Simultaneous Determination of 8 Components in Liuwei Nengxiao Pills by HPLC

KANG Hui¹, LIU Yarong²(1.Dept. of Pharmacy, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810008, China; 2.Qinghai Institute for Drug Control, Xining 810016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of alantolactone, isoalantolactone, gallic acid, emodin, aloe-emodine, rhein, physcion and chrysophanol in Liuwei nengxiao pills. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.1% glacial acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 254 nm (alantolactone, isoalantolactone, emodin, aloe-emodine, rhein, physcion and chrysophanol), 270 nm (gallic acid). The column temperature was 25 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of alantolactone, isoalantolactone, gallic acid, emodin, aloe-emodine, rhein, physcion, chrysophanol were 0.121-3.63 μg($r=0.999\ 9$), 0.122-3.66 μg($r=0.999\ 9$), 0.219-6.57 μg($r=0.999\ 9$), 0.016 4-0.492 μg($r=0.999\ 7$), 0.017 3-0.519 μg($r=0.999\ 9$), 0.015 3-0.459 μg($r=0.999\ 9$), 0.007 2-0.216 μg($r=0.999\ 9$), 0.016 2-0.486($r=0.999\ 9$). The limits of quantification were 0.41, 0.26, 0.35, 0.13, 0.17, 0.14, 0.15, 0.13 ng; limits of detection were 0.12, 0.08, 0.11, 0.04, 0.05, 0.04, 0.05, 0.04 ng. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 98.05%-102.46%(RSD=1.75%, $n=6$), 98.55%-102.89%(RSD=1.91%, $n=6$), 98.53%-102.34%(RSD=1.66%, $n=6$), 101.71%-103.41%(RSD=0.57%, $n=6$), 101.04%-103.01%(RSD=0.69%, $n=6$), 101.63%-102.75%(RSD=0.39%, $n=6$), 96.94%-101.11%(RSD=1.61%, $n=6$), 98.06%-99.10%(RSD=0.40%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is accurate, simple and suitable for simultaneous determination of 8 components in Liuwei nengxiao pills.

KEYWORDS Liuwei nengxiao pill; Alantolactone; Isoalantolactone; Gallic acid; Emodin; Aloe-emodine; Rhein; Physcion; Chrysophanol; HPLC; Content

藏药是我国传统医药的重要组成部分,尤其在治疗心血管、消化系统等慢性病方面独具优势。藏成药六味能消丸由藏木香、干姜、诃子、大黄、寒水石、碱花6味中药组成,具有助消化、消肿、理风和胃的功效^[1]。六味能消丸现行标准收载于《卫生部颁藏药标准》(第一册)^[2],

* 主管药师。研究方向:中藏药质量控制。电话:0971-8066232。E-mail:736211102@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:中藏药检验及质量标准。电话:0971-8232182

藏文名称西切周巴日布;现行标准中仅有1个理化鉴别反应,无含量测定项,无法全面控制该制剂的质量。鉴于此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定六味能消丸中藏木香主要成分(土木香内酯、异土木香内酯)^[3]、诃子主要成分(没食子酸)^[4-5]、大黄主要成分(大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚)^[6]含量的方法^[7],以期完善该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型HPLC仪,包括2998型光电二极管阵列检测器、四元泵、自动进样器、Empower工作站(美国Waters公司);XS105DU型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);CPA225D型万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);B2500S-MT型超声波清洗器(上海必能信超声清洗有限公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

六味能消丸(青海省格拉丹东药业有限公司,批号:20140401、20140702、20150106,规格:0.3 g/丸;西藏藏医学院藏药有限公司,批号:20141211、20150306,规格:0.6 g/丸);土木香内酯对照品(批号:110760-200507)、异土木香内酯对照品(批号:110761-200203)、没食子酸对照品(批号:110831-201204)、大黄素对照品(批号:110756-200110)、芦荟大黄素对照品(批号:110795-9803)、大黄酸对照品(批号:110757-200206)、大黄素甲醚对照品(批号:110758-201013)、大黄酚对照品(批号:110796-201017%)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-乙腈(B)-0.1%冰醋酸溶液(C),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm(土木香内酯、异土木香内酯、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚)、270 nm(没食子酸);柱温:25℃;进样量:10 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间,min	A,%	B,%	C,%
0~30	40→15	0→60	60→25
30~40	15→5	60→85	25→10
60~80	5→10	0→60	95→30

2.2 溶液的制备

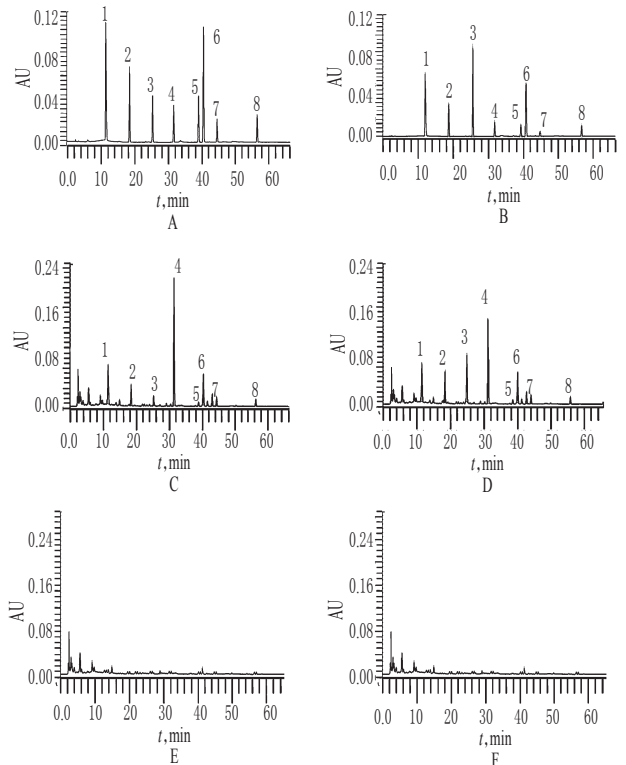
2.2.1 混合对照品溶液 取土木香内酯、异土木香内酯、没食子酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL分别含上述成分0.231、0.256、1.190、0.173、0.153、0.164、0.162、0.072 mg的单一对照品贮备液。分别精密吸取上述单一对照品贮备液各1 mL,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成每1 mL分别含上述成分0.023 1、0.025 6、0.119 0、0.017 3、0.015 3、0.016 4、0.016 2、0.007 2 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过40目筛)约0.5 g,精密称定,置于100 mL锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声(功率:110 W,频率:42 kHz,下同)处理30 min,放至室温,再次称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例制备缺藏木香、诃子、大黄的阴性样品,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

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,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数均>4 000。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.混合对照品(254 nm);B.混合对照品(270 nm);C.供试品(254 nm);D.供试品(270 nm);E.阴性对照(254 nm);F.阴性对照(270 nm);1.土木香内酯;2.异土木香内酯;3.没食子酸;4.大黄素;5.芦荟大黄素;6.大黄酸;7.大黄素甲醚;8.大黄酚

A.mixed control (254 nm); B.mixed control (270 nm); C.test sample (254 nm); D.test sample (270 nm); E.negative control (254 nm); F.negative control (270 nm); 1.alantolactone; 2.isoalantolactone; 3. gallic acid; 4. emodin; 5.aloe-emodine; 6.rhein; 7. physcion ; 8.chrysophanol

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、5、10、15、20、25、30 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量为横坐标(x, μg)、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,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LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD,结果见表3。

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	r	线性范围, μg
土木香内酯	$y=3.52 \times 10^3x-1.99 \times 10^4$	0.999 9	0.121~3.63
异土木香内酯	$y=1.48 \times 10^3x+5.92 \times 10^3$	0.999 9	0.122~3.66
没食子酸	$y=1.85 \times 10^3x-7.48 \times 10^3$	0.999 9	0.219~6.57
大黄素	$y=3.45 \times 10^3x-5.10 \times 10^3$	0.999 7	0.016 4~0.492
芦荟大黄素	$y=4.65 \times 10^3x-3.26 \times 10^3$	0.999 9	0.017 3~0.519
大黄酸	$y=4.05 \times 10^3x-7.10 \times 10^3$	0.999 9	0.015 3~0.459
大黄素甲醚	$y=3.47 \times 10^3x-2.94 \times 10^3$	0.999 9	0.007 2~0.216
大黄酚	$y=5.20 \times 10^3x-9.46 \times 10^3$	0.999 9	0.016 2~0.486

表3 LOQ与LOD测定结果(ng)

Tab 3 Determination results of LOQ and LOD(ng)

待测成分	LOQ	LOD
土木香内酯	0.41	0.12
异土木香内酯	0.26	0.08
没食子酸	0.35	0.11
大黄素	0.13	0.04
芦荟大黄素	0.17	0.05
大黄酸	0.14	0.04
大黄素甲醚	0.15	0.05
大黄酚	0.13	0.04

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”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,土木香内酯、异土木香内酯、没食子酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚峰面积的RSD分别为0.87%、1.12%、0.96%、0.97%、1.27%、1.33%、1.82%、1.64%(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:20140401)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,土木香内酯、异土木香内酯、没食子酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚峰面积的RSD分别为1.22%、1.29%、1.71%、1.47%、1.62%、1.55%、1.39%、1.66%(n=8),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

取同一批样品粉末(批号:20140401)约0.5 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,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,土木香内酯、异土木香内酯、没食子酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚的含量平均值分别为1.02、1.11、4.76、0.33、0.34、0.65、0.15、0.52 mg/g, RSD分别为1.27%、1.36%、1.51%、1.44%、1.72%、1.98%、1.02%、0.96%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:20140401)适量,共6份,分别置于100 mL量瓶中,各加入一定质量的待测成分对照品,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。

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, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
土木香内酯	0.250 6	0.255 0	0.231 0	0.483 5	98.92	99.60	1.75
	0.251 8	0.256 2	0.231 0	0.484 4	98.79		
	0.248 9	0.253 3	0.231 0	0.480 5	98.37		
	0.249 5	0.253 9	0.231 0	0.487 2	101.00		
	0.252 1	0.256 5	0.231 0	0.493 2	102.46		
	0.250 7	0.255 1	0.231 0	0.481 6	98.05		
	0.250 6	0.277 0	0.256 0	0.540 4	102.89		
异土木香内酯	0.251 8	0.278 3	0.256 0	0.530 6	98.55	100.42	1.91
	0.248 9	0.275 1	0.256 0	0.527 7	98.67		
	0.249 5	0.275 8	0.256 0	0.537 3	102.15		
	0.252 1	0.278 7	0.256 0	0.537 9	101.25		
	0.250 7	0.277 1	0.256 0	0.530 5	98.98		
	0.250 6	1.102 0	1.190 0	2.307 7	101.32		
	0.251 8	1.107 3	1.190 0	2.325 2	102.34		
没食子酸	0.248 9	1.094 5	1.190 0	2.302 1	101.48	100.24	1.66
	0.249 5	1.097 2	1.190 0	2.276 9	99.13		
	0.252 1	1.108 6	1.190 0	2.281 1	98.53		
	0.250 7	1.102 4	1.190 0	2.276 3	98.65		
	0.250 6	0.082 5	0.082 0	0.165 9	101.71		
	0.251 8	0.082 9	0.082 0	0.167 3	102.93		
	0.248 9	0.081 9	0.082 0	0.166 4	103.05		
芦荟大黄素	0.249 5	0.082 1	0.082 0	0.166 2	102.56	101.79	0.69
	0.252 1	0.083 0	0.082 0	0.167 2	102.68		
	0.250 7	0.082 5	0.082 0	0.167 3	103.41		
	0.250 6	0.085 1	0.086 5	0.173 4	102.08		
	0.251 8	0.085 5	0.086 5	0.172 9	101.04		
	0.248 9	0.084 5	0.086 5	0.173 6	103.01		
	0.249 5	0.084 7	0.086 5	0.172 8	101.85		
大黄酸	0.252 1	0.085 6	0.086 5	0.173 4	101.50	102.06	0.39
	0.250 7	0.085 1	0.086 5	0.172 7	101.27		
	0.250 6	0.162 3	0.153 0	0.318 4	102.03		
	0.251 8	0.163 1	0.153 0	0.318 7	101.70		
	0.248 9	0.161 2	0.153 0	0.317 4	102.09		
	0.249 5	0.161 6	0.153 0	0.317 9	102.16		
	0.252 1	0.163 3	0.153 0	0.318 8	101.63		
大黄素甲醚	0.250 7	0.162 4	0.153 0	0.319 6	102.75	99.17	1.61
	0.250 6	0.037 1	0.036 0	0.072 0	96.94		
	0.251 8	0.037 3	0.036 0	0.073 0	99.17		
	0.248 9	0.036 8	0.036 0	0.073 1	100.83		
	0.249 5	0.036 9	0.036 0	0.072 2	98.06		
	0.252 1	0.037 3	0.036 0	0.072 9	98.89		
	0.250 7	0.037 1	0.036 0	0.073 5	101.11		
大黄酚	0.250 6	0.129 4	0.324 0	0.450 5	99.10	98.50	0.40
	0.251 8	0.130 0	0.324 0	0.448 1	98.17		
	0.248 9	0.128 5	0.324 0	0.447 9	98.58		
	0.249 5	0.128 8	0.324 0	0.446 5	98.06		
	0.252 1	0.130 2	0.324 0	0.450 2	98.77		
	0.250 7	0.129 5	0.324 0	0.448 1	98.33		

2.10 样品含量测定结果

取5批样品粉末各适量,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含量,结果见表5。

表5 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)Tab 5 Results of contents determination of samples ($n=3$, mg/g)

样品批号	土木香内酯	异土木香内酯	没食子酸	大黄素	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素甲醚	大黄酚
20140401	1.02	1.11	4.76	0.34	0.65	0.33	0.52	0.15
20140702	1.11	1.23	4.13	0.29	0.54	0.26	0.42	0.12
20150106	1.37	1.50	5.64	0.49	0.75	0.42	0.66	0.24
20141211	1.16	1.37	5.12	0.45	0.73	0.41	0.58	0.22
20150306	1.01	1.08	4.15	0.29	0.51	0.27	0.43	0.12

3 讨论

3.1 流动相的选择

本试验曾考察了甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液、甲醇-0.1%冰醋酸溶液和乙腈-0.1%冰醋酸溶液等二相流动相在系统不同梯度条件下进行洗脱时的色谱分离情况^[8-11],结果均未获得满意的分离效果;后采用甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸溶液三相流动相系统在文中所示梯度洗脱程序下进行洗脱,色谱分离均较好,因此选择上述流动相为本试验的最终流动相。

3.2 检测波长的选择

本试验采用光电二级检测器在190~400 nm波长范围内对“2.2.1”项下的单一对照品贮备液进行了全波长扫描,由紫外扫描结果可知,土木香内酯、异土木香内酯、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚在254 nm波长处有最大吸收,没食子酸在270 nm波长处有最大吸收,因此选择本试验的测定波长为254 nm和270 nm。

3.3 提取溶剂和提取方式的选择

本试验曾考察了不同的提取溶剂(50%甲醇溶液、75%甲醇溶液、甲醇、95%乙醇溶液)^[12-13],不同的提取方式(超声处理20、30、40 min,回流30 min、冷浸4 h后提取)。结果,甲醇超声处理30 min的提取率最高,且操作简单,因此选择上述提取溶剂和提取方式处理样品。

综上所述,本方法准确、简便,可用于六味能消丸中8种成分含量的同时测定。

参考文献

- [1] 罗大尚.中华藏本草[M].北京:民族出版社,1997:254-255.
- [2] 卫生部药典委员会.卫生部药品标准:藏药:第一册[S].北京:化学工业出版社,1995:98.
- [3] 肖远灿,胡凤祖.RP-HPLC测定藏木香中土木香内酯和异土木香内酯含量[J].中国药理学杂志,2007,42(7):491-493.
- [4] 李先端,顾雪竹,肖碧英,等.绒毛诃子与诃子质量评价与比较[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(17):48-52.
- [5] 罗光伟,陈建江.诃子的药理作用研究进展[J].云南中医中药杂志,2012,33(11):78-80.
- [6] 贺凡珍,蔡学莹,彭维,等.HPLC法同时测定酒大黄中5种蒽醌的含量[J].中药材,2011,34(9):1384-1385.
- [7] 陈发奎.中药有效成分含量测定[M].北京:人民卫生出版社,2008:259.
- [8] 何盛江,聂阳,陈刚,等.HPLC法同时测定不同产地羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].中国药房,2016,27(33):4719-4721.
- [9] 冯欣,鲁晓光,罗布扎西,等.HPLC法同时测定藏药七味铁屑丸中木香烃内酯和去氢木香内酯[J].中成药,2011,33(9):1535-1538.
- [10] 倪琳,杨锡.HPLC法同时测定达斯玛保丸中木香烃内酯、异土木香内酯和土木香内酯[J].中成药,2012,34(4):664-667.
- [11] 裴贵珍,郭鑫,张雪峰.HPLC法同时测定六味能消胶囊中木香烃内酯、去氢木香烃内酯、大黄素、大黄酚的含量[J].药物分析杂志,2015,35(2):241-245.
- [12] 杨金草,曹炯.HPLC测定藏药六味能消散中蒽醌类成分含量[J].中国中医药信息杂志,2014,21(9):72-74.
- [13] 吴俊珠,周浓,罗碧燕.HPLC测定黄连上清丸中5种大黄蒽醌类化合物的含量[J].云南中医中药杂志,2010,31(9):66-67.

(收稿日期:2017-03-15 修回日期:2017-05-03)

(编辑:刘柳)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅