

高效液相色谱法测定槐黄丸中大黄素、大黄酚的含量

张 玲, 张婷婷

(江苏省连云港市中医院, 江苏 连云港 222004)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定槐黄丸中大黄素、大黄酚含量的方法。方法: 色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ 柱 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm); 流速为 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流动相: 甲醇-0.1%磷酸溶液 (85:15); 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μ L。结果: 大黄素在 10.01~80.08 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.9998$), 平均回收率 ($n=6$) 为 99.3% (RSD=0.6%); 大黄酚在 10.06~80.48 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.9997$), 平均回收率 ($n=6$) 为 99.2% (RSD=0.7%)。结论: 该方法简便、准确, 专属性强, 可作为槐黄丸的质量控制指标。

[关键词] 高效液相色谱法; 槐黄丸; 大黄素; 大黄酚

[中图分类号] R284.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-659X(2011)06-0557-02

槐黄丸是连云港市中医院的医院制剂, 由槐角、大黄、黄芩、黄柏、当归等 9 味药组成, 具有清热收敛、润肠通便、止痛止血的功效。临床上用于内痔出血、肠炎、便秘。为完善标准, 控制其产品质量, 采用反相高效液相色谱法对制剂中的大黄素、大黄酚进行了定量分析^[1]。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪; 大黄素、大黄酚对照品 (供含量测定用, 中国药品生物制品检定所提供, 批号 110756-200110、110796-200310); 槐黄丸 (连云港市中医院制剂室, 批号 20090531、20090720、20091026); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

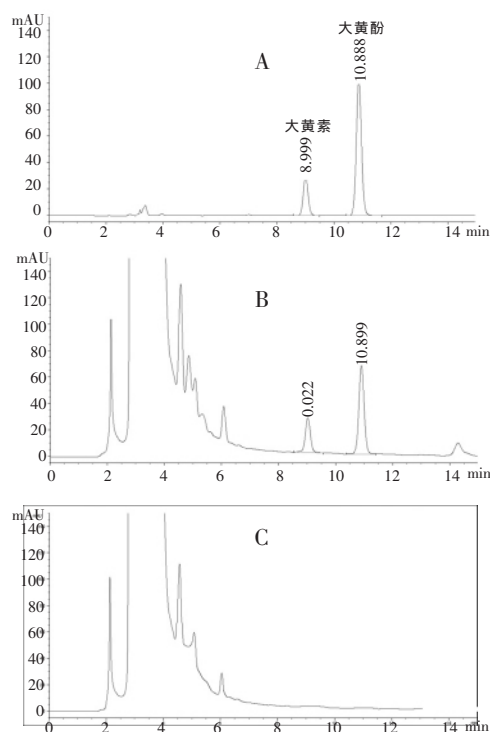
2.1.1 对照品溶液制备 精密称取大黄素对照品 10.01 mg、大黄酚对照品 10.06 mg, 分别置 100 mL 容量瓶中, 用无水乙醇-乙酸乙酯 (2:1) 混合溶液溶解并定容至刻度, 吸取大黄素溶液 1 mL、大黄酚溶液 2.5 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用无水乙醇-乙酸乙酯 (2:1) 混合溶液溶解并定容至刻度, 制成每毫升含大黄素 10.01 μ g、大黄酚 25.15 μ g 的混合溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液制备 取槐黄丸, 研细, 混匀, 过三号筛, 取约 5 g, 研细, 精密称取 2.0112 g, 置锥形瓶中, 精密加乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 置水浴上加热回流 1 h, 放冷, 用乙醇补足减失的质量, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置烧杯中, 水浴蒸干, 加 30%乙醇-盐酸 (10:1) 混合溶液 15 mL, 置水浴中加热回流 1 h, 立即冷却, 用三氯甲烷强力振摇提取 4 次, 每次 15 mL, 合并三氯甲烷液, 置水浴上蒸干, 残渣用无水乙醇-乙酸乙酯 (2:1) 混合溶液溶解, 移置

25 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性对照品溶液的制备 按处方比例配制缺大黄素、大黄酚的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ 柱 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm); 流速为 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流动相: 甲醇-0.1%磷酸溶液 (85:15); 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μ L。在此条件下, 色谱图见图 1。



A. 对照品 B. 供试品 C. 不含大黄素、大黄酚的阴性对照

图 1 槐黄丸的色谱图

2.3 方法学考察 标准曲线的绘制: 用无水乙醇-乙酸乙酯 (2:1) 混合溶液分别制成含大黄素 0.1001 mg/mL 和大黄酚 0.1006 mg/mL 溶液, 分别精密量取大

[收稿日期] 2011-03-25

[作者简介] 张玲 (1975-), 女, 江苏连云港人, 主管中药师, 主要从事中药制剂工作。

素对照品溶液和大黄酚对照品溶液 1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)混合溶液稀释至刻度。按上述色谱条件进样 10 μ L，分别以大黄素、大黄酚对照品浓度为横坐标，以大黄素、大黄酚对照品峰面积为纵坐标，进行线性回归。结果表明：大黄素在 10.01~80.08 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好，其回归方程为： $Y=36.218X-15.47$ ， $r=0.9998$ ；大黄酚在 10.06~80.48 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好，其回归方程为： $Y=51.67X+25.355$ ， $r=0.9997$ 。

精密度试验：精密吸取混合对照溶液 10 μ L，重复进样 6 次，按上述色谱条件测定峰面积。大黄素 RSD 为 0.5%，大黄酚 RSD 为 0.5%，表明进样精密度良好。

稳定性试验：吸取同一供试品溶液，每隔 2 h 按上述色谱条件测定 1 次，12 h 内连续测定 6 次。结果大黄素的 RSD 为 0.4%，大黄酚的 RSD 为 0.4%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

重现性试验：取同一批号(20090531)样品，按含量测定项下方法操作，平行操作 6 份，按上述色谱条件测定。结果大黄素平均含量为 0.58 mg/g，RSD=0.9%，大黄酚平均含量为 0.68 mg/g，RSD=0.9%，表明方法重现性较好。

加样回收试验：将已知含量的样品溶液(20090531)，用无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)混合溶液稀释 100 倍后，精密量取 6 份，分别精密加入大黄素、大黄酚对照品溶液，按上述测定方法进行测定。大黄素平均回收率 99.3%，RSD 为 0.6%($n=6$)，大黄酚平均回收率 99.2%，RSD 为 0.7%($n=6$)。

2.4 样品测定 取 3 批不同批号的槐黄丸，按供试品溶液制备方法制备成供试液，分别精密吸取对照品溶液和供试品试液 10 μ L，按上述色谱条件测定并计算其总含量。结果见表 1。

表 1 样品含量测定($n=6, m/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	大黄素	大黄酚	RSD(%)
20090531	0.55	0.69	0.9
20090720	0.61	0.72	0.6
20090126	0.59	0.71	0.7

3 讨论

槐黄丸由槐角、大黄、黄芩、黄柏、当归等 9 味药组成，具有清热收敛、润肠通便、止痛止血的功效，用于内痔出血、肠炎、便秘疗效显著。其中大黄含有游离的蒽醌类衍生物如大黄素、大黄酚、大黄酸等，它们对多种病毒和细菌具有抑制和杀灭作用^[2]。随着中药质量控制技术的进展，测定中药或复方中的单一成分已不能满足全面控制中药制剂质量的要求，多成分含量测定则能够更进一步提高中药控制质量。由于大黄中大黄素、大黄酚 2 种蒽醌类成分含量均较高，故本实验选择以上 2 种蒽醌类成分作为含量测定的指标成分。在本实验研究过程中，参照文献报道的色谱条件^[3-4]，进行了样品提取溶剂、提取方法和提取次数等因素的考察，结果表明以无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)混合溶液为溶剂效果较好，且杂质较少，供试品中的大黄素、大黄酚可提取完全。本方法简单、可靠，可作为槐黄丸的质控指标之一。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 328.
[2] 余玖霞, 吴超, 丁宁, 等. 抗菌抗病毒大黄素型蒽醌类成分提取分离技术的研究与应用[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(1): 42-45.
[3] 胡晋娟, 凌向阳. HPLC 测定泻痢丸中大黄素、大黄酚的含量[J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(1): 53-54.
[4] 唐洪梅, 李得堂, 闫雪, 等. HPLC 同时测定马钱子中 5 种大黄成分的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(5): 409-411.

(上接第 547 页)

3.2 壳聚糖是一种含有 -NH₂ 的相对高分子质量的天然弱碱性物质，溶解于酸性溶液中而带正电荷，能与酸性的高分子化合物(如酸性多糖)反应形成聚电解质的复合物，在水中不溶解而沉淀析出。沉淀物具有较大的表面积，沉降的过程中能够吸附药液中不溶性的微粒，使药液澄清。

3.3 本实验前期对壳聚糖吸附过程进行了单因素考察，考察了壳聚糖加入量、放置时间、搅拌温度等，确定了对壳聚糖澄清效果影响较大的条件，在此基础上设计了正交试验的因素以及水平。

3.4 壳聚糖吸附法相对于传统水提取乙醇沉淀法能较多的保留活性成分，尤其对高分子活性成分的

保留较乙醇沉淀法优越。但从本实验中可看出，壳聚糖吸附法仍然能够造成活性成分的损失，因此不应盲目的肯定壳聚糖的絮凝效果。

[参考文献]

[1] 谢欢, 袁海龙. 壳聚糖絮凝剂在中药纯化工艺中的应用[C]// 中医药学术发展大会论文集, 2005.
[2] 王海宁, 谢印芝, 樊飞跃. 壳聚糖及 ZTC1+1- 澄清剂对大青叶提取液的澄清工艺研究[J]. 中国药房, 2008, 19(21): 1625-1628.
[3] 任红莉, 阿依努尔, 宋达. 壳聚糖用于银杏叶提取液澄清工艺的研究[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(1): 25.
[4] 马双成, 魏锋. 保健食品功效成分检测技术与方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 341-349.