

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.18.017

高效液相色谱法同时测定阿木日-6胶囊中大黄素和大黄酚含量*

萨日古拉¹, 牧其尔¹, 乌汉其木格², 昂格乐玛¹, 亚男¹, 锡林其其格^{1,△}

(1. 内蒙古医科大学民族医药创新中心, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古国际蒙医医院创新蒙医药工程实验室, 内蒙古 呼和浩特 010065)

摘要:目的 建立同时测定蒙药阿木日-6胶囊中大黄素和大黄酚含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Thermo Scientific C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-0.1% 磷酸溶液 (42:23:35, V/V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。结果 大黄素和大黄酚进样量分别在 16.9~1 352.0 μg ($r=0.999\ 8$) 和 47.45~1 898.0 ng ($r=0.999\ 9$) 范围内与峰面积线性关系良好; 游离大黄素、游离大黄酚、总大黄素、总大黄酚精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率分别为 106.23%, 92.49%, 105.40%, 103.15%, RSD 分别为 1.99%, 3.68%, 2.52%, 1.86% ($n=6$)。每 1 g 制剂含大黄素不得少于 0.56 mg, 结合蒽醌类成分不得少于 0.36 mg。结论 所建立的方法操作简便, 精密性、稳定性、重复性均较好, 可用于阿木日-6 胶囊中大黄素和大黄酚的含量测定。

关键词: 阿木日-6 胶囊; 大黄素; 大黄酚; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)18-0073-04

Simultaneous Determination of Emodin and Chrysophanol in Amuri-6 Capsules by HPLC

Sarigula¹, Muqier¹, Wuhanqimuge², Anggelema¹, Yanan¹, Xilinqiqige¹

(1. Medical Innovation Center for Nationalities, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China 010110; 2. Innovative Mongolian Pharmaceutical Preparation Laboratory, Inner Mongolia International Mongolian Hospital, Hohhot, Inner Mongolia, China 010065)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of emodin and chrysophanol in Amuri-6 Capsules. **Methods** The chromatographic column was Thermo Scientific C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-methanol-0.1% phosphoric acid solution (42:23:35, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of emodin and chrysophanol were 16.9-1 352.0 μg ($r=0.999\ 8$) and 47.45-1 898.0 ng ($r=0.999\ 9$), respectively. The RSDs of the precision, stability and repeatability tests of free emodin, free chrysophanol, total emodin and total chrysophanol were all lower than 2.0%, and the average recoveries of the above components were 106.23%, 92.49%, 105.40%, 103.15% with RSDs of 1.99%, 3.68%, 2.52% and 1.86% ($n=6$), respectively. Each 1 g of the preparation should contain no less than 0.56 mg of rhubarb and no less than 0.36 mg of anthraquinone. **Conclusion** The established method is simple, accurate, stable and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of emodin and chrysophanol in Amuri-6 Capsules.

Key words: Amuri-6 Capsules; emodin; chrysophanol; HPLC; content determination

蒙药阿木日-6胶囊源于内蒙古民间经典验方,由土木香、大黄、山柰、寒水石(煨)、诃子、碱面(制)组成,是蒙医临床治疗消化不良的主方^[1-4]。2020年版《中国药典(一部)》中收录的六味安消胶囊由藏木香、大黄、山柰、诃子、北寒水石(煨)、碱花组成,具有和胃健脾、消积导滞、活血止痛功效,临床多用于治疗胃痛胀满、消化不良、便秘及痛经等症^[5-11]。虽然两药的处方大致相同,但前者用土木香,后者用藏木香,且两种制剂中各药味的比例也不同^[12-13]。为有效控制阿木日-6胶囊的质量,本研究中建立了同时测定制剂中大黄素和

大黄酚含量的高效液相色谱(HPLC)法^[14-15]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BT25S 型电子天平、BSA224S 型电子天平、BSA423S 型电子天平(德国 Sartorius 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); Thermo Ultimate 3000 LC-20AT 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

* 基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目[201802115]; 内蒙古自治区蒙医药研究所蒙药新药研发及药物实验室建设项目[YJS201806]; 内蒙古医科大学蒙药学“一流学科”青年教师创新能力提升重点项目[myxylxkky2020-03]。

第一作者: 萨日古拉, 女, 大学本科, 在读硕士研究生, 研究方向为蒙药学, (电子信箱)161105872@qq.com。

△通信作者: 锡林其其格, 女, 博士, 主任药师, 教授, 研究方向为蒙药现代化, (电子信箱)2528325529@qq.com。

1.2 试药

阿木日-6胶囊(内蒙古自治区国际蒙医医院蒙药制剂中心,批号分别为20170325,20160117,20160417);大黄酚对照品(批号为110796-201621),大黄素对照品(批号为110756-201512),均购于中国食品药品检定研究院,含量均大于98%;甲醇、乙腈为色谱纯,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:Thermo Scientific C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(42:23:35, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:分别取大黄素对照品5.44 mg、大黄酚对照品10.01 mg,精密称定,各置100 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得单一对照品溶液。

供试品溶液:取样品3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声(功率200 W,频率40 kHz)处理60 min,放冷,再次称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液Ⅰ;取样品3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸(10:1, V/V)混合溶液25 mL,称定质量,置80℃水浴中加热回流60 min,再次称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液3 mL,置5 mL容量瓶中,加2%氢氧化钠溶液1 mL,再加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液Ⅱ。

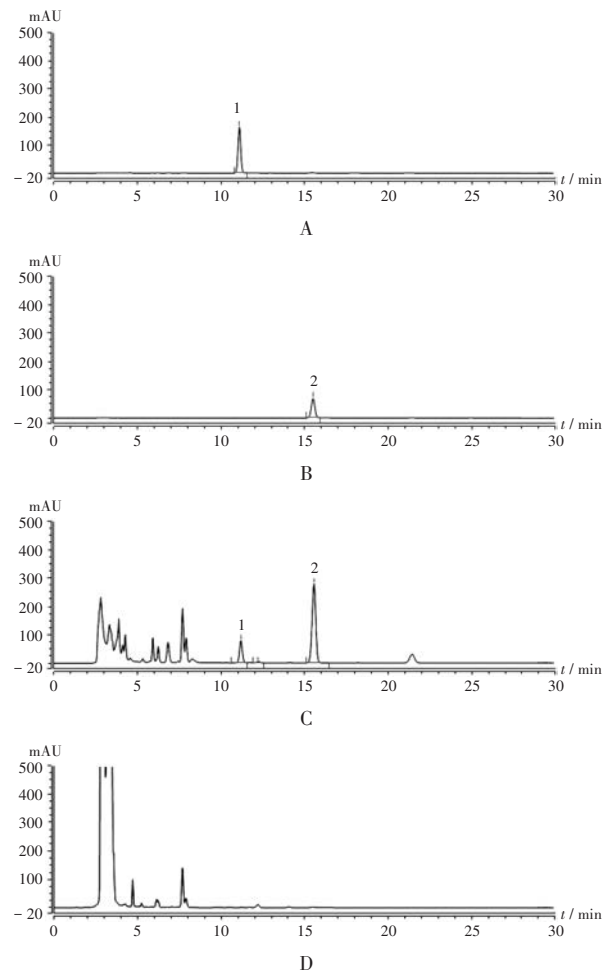
阴性对照品溶液:按阿木日-6胶囊处方和工艺制备缺大黄的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取上述单一对照品溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按大黄酚峰计应不低于3 000;分离度均大于1.5,基线分离良好。详见图1。

专属性试验:取上述单一对照品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照品溶液在与对照品溶液色谱保留时间相同处无干扰峰,表明专属性良好。详见图1。

线性关系考察:取大黄素对照品3.38 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,倍比稀释,制成质量浓度分别为1.69, 3.38, 6.76, 13.52, 27.04, 54.08, 135.20 μg/mL的大黄素系列对照品溶液,精密量取10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积;取大黄酚对照品9.49 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,分别取0.5, 1.0, 2.0, 5.0,



1. 大黄素 2. 大黄酚

A. 大黄素对照品溶液 B. 大黄酚对照品溶液

C. 供试品溶液 D. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Emodin 2. Chrysophanol

A. Emodin reference solution B. Chrysophanol reference solution

C. Test solution D. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

10.0, 20.0 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(X , μg或ng)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得大黄素和大黄酚回归方程分别为 $Y_1 = 0.6844 X_1 - 0.7358$ ($r = 0.9998, n = 7$)和 $Y_2 = 0.0881 X_2 + 0.1661$ ($r = 0.9999, n = 7$)。结果表明,大黄素和大黄酚的进样量分别在16.9~1 352.0 μg和47.45~1 898.0 ng范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下供试品溶液Ⅰ和Ⅱ(批号为20170325)各适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果游离大黄素、游离大黄酚、总大黄素、总大黄酚峰面积的RSD分别为1.66%, 1.99%, 0.81%, 0.96% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液1, 2(批号为20170325)各适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h,

按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果游离大黄素、游离大黄酚、总大黄素、总大黄酚峰面积的RSD分别为1.04%,1.12%,0.83%,0.59%($n=6$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:称取样品(批号为20170328)适量,精密称定,共6份,按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,记录峰面积并计算含量。结果游离大黄素、游离大黄酚、总大黄素、总大黄酚平均含量分别为0.075 1,0.194 5,0.194 1,0.546 8 mg/g, RSD分别为1.66%,1.99%,0.81%,0.96%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为20170325)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的对照品溶液适量,按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1。

2.4 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按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,平行测定3次,

表1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test($n=6$)							
待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
游离大黄素	1.505 1	0.113 0	0.108 8	0.230 7	108.18	106.23	1.99
	1.505 6	0.113 1	0.108 8	0.228 8	106.34		
	1.505 0	0.113 0	0.108 8	0.228 4	106.07		
	1.505 4	0.113 1	0.108 8	0.231 7	109.01		
	1.505 6	0.113 1	0.108 8	0.226 1	103.86		
	1.504 5	0.113 0	0.108 8	0.226 1	103.95		
游离大黄酚	1.505 1	0.292 7	0.300 3	0.561 1	89.38	92.49	3.68
	1.505 6	0.292 8	0.300 3	0.580 7	95.87		
	1.505 0	0.292 7	0.300 3	0.575 0	94.01		
	1.505 4	0.292 8	0.300 3	0.570 9	92.61		
	1.505 6	0.292 8	0.300 3	0.579 8	95.57		
	1.504 5	0.292 6	0.300 3	0.555 4	87.51		
总大黄素	1.509 3	0.293 0	0.299 2	0.608 9	105.58	105.40	2.52
	1.505 3	0.292 1	0.299 2	0.611 2	106.65		
	1.504 8	0.292 1	0.299 2	0.605 7	104.81		
	1.509 3	0.293 0	0.299 2	0.616 3	108.05		
	1.505 3	0.292 1	0.299 2	0.611 7	106.82		
	1.509 4	0.293 0	0.299 2	0.593 6	100.48		
总大黄酚	1.502 9	0.821 8	0.850 9	1.717 6	105.28	103.15	1.86
	1.505 3	0.823 1	0.850 9	1.688 5	101.70		
	1.506 0	0.823 5	0.850 9	1.684 4	101.18		
	1.506 1	0.823 5	0.850 9	1.723 4	105.76		
	1.505 3	0.823 1	0.850 9	1.691 3	102.03		
	1.506 0	0.823 5	0.850 9	1.699 3	102.93		

表2 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab. 2 Results of content determination of the four components in samples (mg/g, $n=3$)

批号	游离大黄素	游离大黄酚	总大黄素	总大黄酚
20170325	0.074 9	0.186 0	0.196 8	0.535 2
20160117	0.188 3	0.748 4	0.524 0	1.656 8
20160417	0.216 8	0.702 0	0.500 5	1.477 7

记录峰面积并计算样品含量。结果见表2。

由表2可知,3批样品含大黄以总大黄素及总大黄酚的总量计均大于0.7 mg;结合蒽醌类成分以大黄素及大黄酚的总量计均大于0.45 mg。以实测值下浮20%(参照2007年版《内蒙古蒙药制剂规范》),可暂定本品每1 g含大黄不得少于0.56 mg,结合蒽醌类成分不得少于0.36 mg。

3 讨论

蒙药阿木日-6胶囊是蒙古民族药方中广泛使用的方剂,处方安全有效,临床应用较广泛,药效确切^[5-11]。2020年版《中国药典(一部)》收录的六味安消散由藏木香、大黄、山柰、北寒水石、诃子、碱花组方,处方略有不同。本研究中参考六味安消散含量测定方法检测总大黄素、总大黄酚、游离大黄素、游离大黄酚的含量(后两种成分超声提取即可)。大黄素和大黄酚是以与其他化合物结合的形式存在,需加入盐酸后加热回流提取。六味安消散的药典含量测定方法中,以甲醇-盐酸(10:1, V/V)在80℃水浴中加热回流30 min提取;大黄药典的含量测定方法中,先用甲醇加热回流1 h,加8%盐酸溶液再超声处理2 min,再加三氯甲烷加热回流1 h。本研究中参考前法,以甲醇-盐酸(10:1, V/V)加热回流,且经方法学验证,该方法简单、操作简便。

综上所述,本研究中所建立的方法操作简便,精密度、稳定性、重复性均较好,可用于同时测定阿木日-6胶囊中大黄素和大黄酚的含量。

参考文献

[1] 包哈申. 占布拉道尔吉与《蒙药正典》研究[M]. 呼和浩特: 内蒙古教育出版社, 2012: 138-139.
[2] 罗布桑楚日格. 金典注释[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2015: 736.
[3] 松巴堪布·益希班觉. 识药白晶镜[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2015: 87.
[4] 占布拉·道尔吉. 蒙药正典[M]. 北京: 民族出版社, 2006: 138.
[5] 张双林. 蒙药阿木日-6散的临床应用[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(4): 65-66.
[6] 胡春. 蒙药六味安消散与乳果糖治疗老年功能性便秘的效果观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(65): 122.
[7] 青格勒, 朝鲁巴根, 巴特金, 等. 蒙成药阿木日-6临床与药理研究[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(3): 47-48.