

Analysis of emodin and HPLC in suspension suspension

Yanqiong Yang

Chengdu New Chaoyang Crop Science Co., Ltd., Chengdu, Sichuan, 611630, China

Abstract

This paper focuses on the high performance liquid chromatography (HPLC) analysis method of emodin and emodin methyl ether in the suspension agent of tiger scepweed. The study covers a comprehensive validation of sample preparation and treatment, HPLC analysis condition optimization, specificity identification, linear relationship determination, no distractor determination, accuracy determination, and precision of analytical methods. Through systematic experimental design, this study successfully established accurate and reliable HPLC analysis method, realizing the effective separation, quantification and quality control of emodin and meldon ME in the suspension. This method provides scientific basis and technical support for the quality control and efficacy evaluation of knotweed suspension agent.

Keywords

knotweed suspension; emodin; emodin methyl ether

虎杖悬浮剂中大黄素和大黄素甲醚 HPLC 分析方法研究

杨艳琼

四川省成都市成都新朝阳作物科学股份有限公司，中国·四川 成都 611630

摘 要

文章聚焦于虎杖悬浮剂中大黄素和大黄素甲醚的高效液相色谱 (HPLC) 分析方法。研究涵盖了样品制备与处理、HPLC 分析条件优化、特异性鉴别、线性关系测定、不干扰物测定、准确度测定以及分析方法精密度的全面验证。通过系统的实验设计，本研究成功建立了准确、可靠的 HPLC 分析方法，实现了对虎杖悬浮剂中大黄素和大黄素甲醚的有效分离、定量及质量控制。该方法为虎杖悬浮剂的质量控制及药效评价提供了科学依据和技术支持。

关键词

虎杖悬浮剂；大黄素；大黄素甲醚

1 引言

虎杖作为一种传统中药材，具有多种药理活性。其中，大黄素和大黄素甲醚是虎杖根茎中的主要活性成分，具有抗炎、抗菌等生物活性。0.4% 虎杖根茎提取物已悬浮剂作为一种农药产品，广泛应用于草莓灰霉病、白粉病等农作物病害的防治并开发出悬浮剂、可湿形粉剂等农药剂型。因此，建立准确、快速测定虎杖根茎提取物悬浮剂中大黄素和大黄素甲醚含量的方法对于保证产品质量和疗效具有重要意义。

2 材料与方法

2.1 试验材料及仪器

试剂：0.4% 虎杖根茎提取物悬浮剂；甲醇（色谱纯）、磷酸（色谱纯）；三氯甲烷（分析纯）、甲醇（分析纯）；大黄素标样（纯度 96%）；大黄素甲醚（纯度 98.9%）。

【作者简介】杨艳琼（1988-），女，中国四川成都人，本科，工程师，从事中药提取物分析检测，主要是液相方法研究。

仪器：高效液相色谱仪（美国 Agilent 1260，配有二极管阵列检测器）；超声波清洗器。

色谱条件：色谱柱为 150 mm × 4.6 mm(id) 不锈钢柱，内装 C18(InertSustain) 填充物，粒径 5 μm；以甲醇+0.1% 磷酸溶液为流动相，甲醇：0.1% 磷酸水 = 85：15 (V/V)；流速 1.0 mL/min；柱温 35℃ ± 2℃；波长 287 nm，进样量 5 μL；总运行时间为 15 min，其中大黄素约 5.2 min；大黄素甲醚约 10.0 min。

2.2 样品制备与处理

称取试样 0.2 g(精确至 0.0002 g)，置于 25 mL 容量瓶中，加入 3 mL 三氯甲烷超声溶解 3 min，降至室温后用甲醇稀释定容，摇匀。用 0.45 μm 滤膜过滤，备用。

3 结果与分析

3.1 特异性鉴别

为了精确鉴别虎杖悬浮剂中的大黄素和大黄素甲醚，研究采用了高效液相色谱二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 技术。扫描过程从 190 nm-400 nm 波长范围进行，通过对比标准品和试样的紫外吸收图和光谱纯度图，可以清晰地观察

到样品中是否存在与标准品相一致的紫外吸收特征。通过扫描样品在特定波长下出现与标准品相似的吸收峰,且峰形

和纯度均符合预期,则可确认样品中存在大黄素和大黄素甲醚。

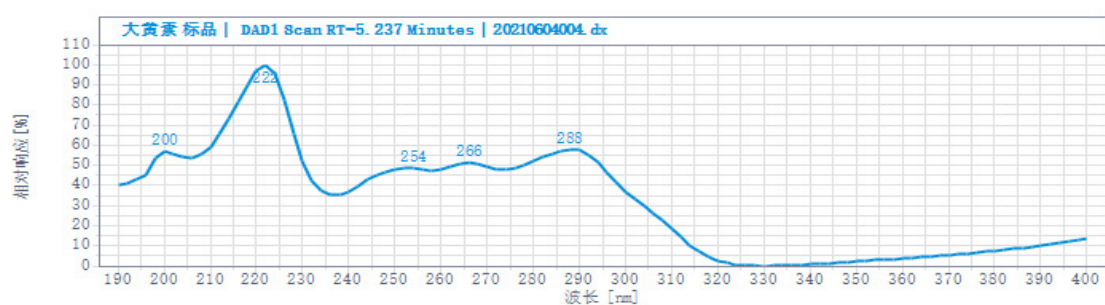


图1 标品(大黄素)紫外吸收图

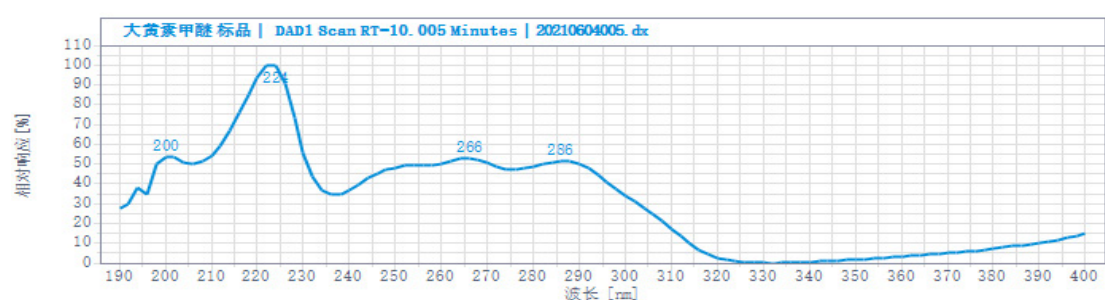


图2 标品(大黄素甲醚)紫外吸收图

3.2 线性关系

大黄素

分别称取5个不同质量的大黄素标准品于25mL容量瓶中,加入20mL三氯甲烷超声溶解降至室温后用甲醇稀释定容至刻度,摇匀。用移液管准确移取5mL置于25mL容量瓶中,用甲醇稀释定容至刻度,摇匀,备用。其大黄素浓度分别为0.0621mg/mL、0.1105mg/mL、0.1383mg/mL、0.1661mg/mL、0.2450mg/mL。满足标准中相关系数应大于0.99的要求。

样品的添加浓度(x)与平均峰面积(y)之间满足线性关系 $y = 21290.1050x + 61.2417$, 线性相关系数 $R^2 = 0.9990$ 。

大黄素甲醚

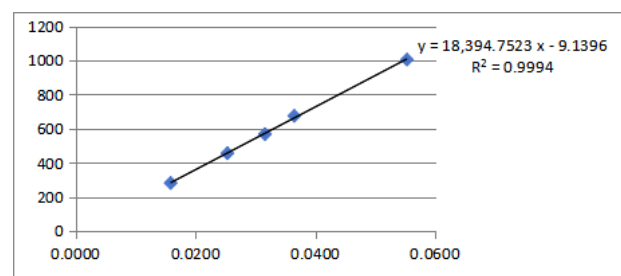
分别称取5个不同质量的大黄素甲醚标准品于50mL容量瓶中,用三氯甲烷超声溶解,降至室温后用三氯甲烷稀释定容至刻度,摇匀。用移液管准确移取2mL置于25mL容量瓶中,加入2mL三氯甲烷,用甲醇稀释定容至刻度,摇匀,备用。其大黄素甲醚浓度分别为0.0159mg/mL、0.0253mg/mL、0.0316mg/mL、0.0365mg/mL、0.0553mg/mL。满足标准中相关系数应大于0.99的要求。

样品的添加浓度(x)与平均峰面积(y)之间满足线性关系 $y = 18394.7523x - 9.1396$, 线性相关系数 $R^2 = 0.9994$ 。

3.3 不干扰物测定

实际样品中可能存在的多种不干扰物质,如溶剂残留、杂质、其他活性成分或制剂辅料,均可能对目标化合物测定产生潜在影响。为全面评估潜在干扰物质对大黄素和大黄

素甲醚测定的影响,研究精心选择了一系列可能的干扰源进行检测。这些干扰源涵盖虎杖根茎提取物母药(未经加工的原始提取物)、试样(经特定处理的悬浮剂)、空白制剂(不含大黄素和大黄素甲醚的制剂)、甲醇(稀释溶剂)和三氯甲烷(提取溶剂)等。实验中,分别对这些干扰源进行HPLC分析,重点关注大黄素和大黄素甲醚的出峰位置。通过对比各干扰源的色谱图,发现0.4%虎杖根茎提取物悬浮剂中,大黄素和大黄素甲醚的出峰位置未受其他干扰峰影响。目标峰周围无未分离物质峰,确保了目标峰的准确性和可靠性。实验结果表明,在分析条件下,虎杖根茎提取物悬浮剂中的大黄素和大黄素甲醚能与其他成分有效分离,且不受潜在干扰物质影响。



(大黄素甲醚)线性关系图

3.4 精密度

为了全面评估本研究中高效液相色谱(HPLC)分析方法在测定0.4%虎杖根茎提取物悬浮剂中大黄素和大黄素甲醚质量分数时的精密度,进行了系统的实验验证^[4]。

需要选取了同一批次、同一浓度的 0.4% 虎杖根茎提取物悬浮剂作为分析对象，并按照既定的分析方法对其中的大黄素和大黄素甲醚质量分数进行了 5 次平行测定。这一步骤旨在通过多次重复分析，观察并评估分析结果的一致性和稳定性。在完成测定后，计算每次测定结果的标准偏差和变异系数。这两个指标共同构成了评估分析方法精密度的重要依据。同时，为了更加科学地判断本分析方法的精密度是否合格，可以采用了修改的 Horwits 公式作为判定标准。Horwits 公式是一种常用于评估分析方法精密度的统计方法，它能够根据分析方法的特性和待测成分的性质，计算出可接受的最大变异系数范围。实验结果表明，本研究中采用的高效液相色谱分析方法在测定 0.4% 虎杖根茎提取物悬浮剂中大黄素和大黄素甲醚质量分数时，其变异系数均小于修改的 Horwits 公式计算出的可接受范围。这一结果充分说明，本分析方法具有较高的精密度，能够稳定、可靠地对大黄素和大黄素甲醚进行精确分析。另外，还对分析方法的稳定性和重复性进行了进一步的评估，以确保其在不同条件下均能保持良好的分析性能。实验结果显示，本分析方法在多次重复分析过程中，分析结果的一致性程度较高，进一步证明了其稳定性和可靠性。

表 1 精密度（大黄素）实验数据

测定值，%	1.911	1.905	1.910	1.917	1.923
平均值，%	1.91				
标准偏差，%	0.0069				
变异系数，%	0.36				
Horwits 公式计算值	2.43				

表 2 精密度（大黄素甲醚）实验数据

测定值，%	0.468	0.474	0.468	0.470	0.471
平均值，%	0.47				
标准偏差，%	0.0025				
变异系数，%	0.53				
Horwits 公式计算值	3.00				

3.5 准确度

3.5.1 大黄素

为验证本方法的系统误差，对方法的精确度进行了试验，在制剂空白中添加已知含量的虎杖根茎提取物母药的方法，

分别称取 0.1625g 和 0.2541g 至 25mL 的容量瓶加入三氯甲烷超声溶解，降至温室后用三氯甲烷稀释定容，摇匀。再分别从母液中移取 1mL 至制剂空白中，加 3mL 三氯甲烷超声溶解用甲醇稀释定容，测定本方法对大黄素的回收率。对大黄素的添加回收率在 100.33% ~ 102.34% 之间，符合要求范围（97% ~ 103%），可见本方法测定大黄素质量分数的准确度较高。

3.5.2 大黄素甲醚

为验证本方法的系统误差，对方法的精确度进行了试验，在制剂空白中添加已知含量的虎杖根茎提取物母药的方法，分别称取 0.1625g 和 0.2541g 至 25mL 的容量瓶加入三氯甲烷超声溶解，降至温室后用三氯甲烷稀释定容，摇匀。再分别从母液中移取 1mL 至制剂空白中，加 3mL 三氯甲烷超声溶解用甲醇稀释定容，测定本方法对大黄素甲醚的回收率。对大黄素甲醚的添加回收率在 101.37% ~ 103.51% 之间，符合要求范围（95% ~ 105%），可见本方法测定大黄素甲醚质量分数的准确度较高。

4 结语

文章通过对虎杖悬浮剂中大黄素和大黄素甲醚的 HPLC 分析方法进行深入研究，系统地优化了样品制备与处理流程，明确了高效液相色谱的最佳分析条件，实现了对目标化合物的特异性鉴别。同时，通过线性关系测定、不干扰物测定、准确度及精密度的全面验证，本研究建立了准确可靠的 HPLC 分析方法，为虎杖悬浮剂的质量控制提供了科学依据，也为同类药物分析提供了参考，具有重要的实用价值和应用前景。

参考文献

[1] 余应嘉, 叶淑芳, 邓燕芳, 陈庆状, 欧阳勇. 大黄素甲醚对脂多糖诱导肠上皮细胞损伤自噬与缝隙连接蛋白的作用影响[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43 (18): 2032-2036.

[2] 陈家琪, 刘佳琪, 胡会龙, 王长江, 何诚. 大黄素甲醚、大黄酸的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2023, 57 (08): 79-87.

[3] 汪祺, 杨建波, 王莹, 李妍怡, 张玉杰, 文海若, 马双成. 大黄素甲醚大鼠体内毒代动力学研究[J]. 中国药学杂志, 2022, 57 (19): 1666-1672.

[4] 章平平, 甘莉, 吴少杰, 唐传球. 大黄药材HPLC指纹图谱及其真伪鉴别研究[J]. 安徽农业科学, 2022, 50 (16): 119-122+166.