

# HPLC法同时测定三黄滴丸中5种蒽醌类成分的含量

魏艳婷<sup>1,2\*</sup>, 张静宜<sup>1,2</sup>, 张华潭<sup>1,2</sup>, 李春花<sup>2#</sup>(1.河北医科大学研究生学院, 石家庄 050017; 2.河北中医学院药学院, 石家庄 050091)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3867-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.44

**摘要** 目的:建立同时测定三黄滴丸中5种蒽醌类成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.23%磷酸溶液(85:15, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为440 nm,柱温为室温,进样量为10 μl。结果:芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量分别在0.070~0.700、0.646~6.460、0.130~1.300、0.150~1.500、0.074~0.740 μg范围内与各自峰面积呈良好的线性关系(*r*均为0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均≤1.96%;平均加样回收率分别为100.92%、97.39%、99.29%、100.73%、99.81%,RSD分别为2.80%、1.39%、1.81%、2.60%、2.06%(*n*=9)。结论:该方法简便、准确、专属性强,可作为三黄滴丸中5种有效成分的含量控制方法。

**关键词** 高效液相色谱法;三黄滴丸;芦荟大黄素;大黄酸;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚

## Content Determination of 5 Anthraquinones Constituents in Sanhuang Drop Pills by HPLC

WEI Yan-ting<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing-yi<sup>1,2</sup>, ZHANG Hua-tan<sup>1,2</sup>, LI Chun-hua<sup>2</sup>(1.Past-graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2.School of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determining contents of 5 anthraquinones constituents in Sanhuang drop pills. METHODS: HPLC method was adopted. The column was Diamonsil C<sub>18</sub> with the mobile phase of methanol-0.23% phosphoric acid (85:15, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 440 nm and the volume temperature was room temperature. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.070-0.700 μg for aloemodin (*r*=0.999 9), 0.646-6.460 μg for rhein (*r*=0.999 9), 0.130-1.300 μg for emodin (*r*=0.999 9), 0.150-1.500 μg for chrysophanol (*r*=0.999 9) and 0.074-0.740 μg for physcion (*r*=0.999 9), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were no more than 1.96%. The average recoveries were respectively 100.92% (RSD=2.80%, *n*=9), 97.39% (RSD=1.39%, *n*=9), 99.29% (RSD=1.81%, *n*=9), 100.73% (RSD=2.60%, *n*=9) and 99.81% (RSD=2.06%, *n*=9). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific, and can used for the content control of 5 constituents in Sanhuang drop pills.

**KEYWORDS** HPLC; Sanhuang drop pills; Aloemodin; Rhein; Emodin; Chrysophanol; Physcion

三黄滴丸由大黄、黄芩浸膏、盐酸小檗碱组成,是按照临床常用的非处方药三黄片组方比例进行投料,运用固体分散技术制成的中药复方制剂,具有清热解毒、泻火通便的功效。三黄滴丸较传统片剂具有溶散速度快、药物颗粒小、生物利用度高等优点。对于这一新型制剂,目前生产工艺、含量测定等的研究均较少,质量标准暂不统一。因此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法,同时测定了该复方制剂中5种蒽醌类成分的含量,操作简便,结果准确,在2010年版《中国药典》(一部)三黄片<sup>[1]</sup>的基础上提高了质量标准,现报道如下。

### 1 材料

LC-15C型HPLC仪,包括SPD-15C紫外检测器、LCsolution色谱工作站(日本岛津公司);1810-BC型石英自动双重高纯水蒸馏器(江苏金坛市白塔石英玻璃仪器厂);TG328B型分析天平(上海精科分析仪器厂);KQ-100E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);有机微孔滤膜(0.22 μm)。

三黄滴丸(河北中医学院药学院自制,批号:20130315-01、

20130315-02、20130315-03)。芦荟大黄素对照品(批号:20120412,纯度≥98%)、大黄酸对照品(批号:MUST-11032801,纯度≥98%)、大黄素对照品(批号:MUST-12022715,纯度≥98%)、大黄酚对照品(批号:20120320,纯度≥98%)、大黄素甲醚对照品(批号:PF0223 SA13,纯度≥98%)均由上海源叶生物科技有限公司提供;甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水(河北中医学院药学院自制)。

### 2 方法与结果<sup>[2-6]</sup>

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-0.23%磷酸溶液(85:15, V/V);流速: 1.0 ml/min;检测波长: 440 nm;柱温: 室温;进样量: 10 μl。

#### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品各适量,精密称定,分别置于10 ml量瓶中,加适量甲醇,超声(功率: 250 W, 频率: 33 kHz)处理20 min,使溶解,加甲醇定容,即得对照品贮备液。取对照品贮备液各5 ml,置于同一25 ml量瓶中,制成质量浓度分别为0.035、0.323、0.065、0.075、0.037 mg/ml的混合对照品溶液。

\* 硕士。研究方向: 中药学。E-mail: weiyanting2013@126.com

# 通信作者: 教授, 硕士。研究方向: 中药制剂新技术与新方法。电话: 0311-89926607。E-mail: hbykdxlch@163.com

2.2.2 供试品溶液 取三黄滴丸1.0 g,精密称定,置于25 ml量瓶中,加甲醇适量,超声(功率:250 W,频率:33 kHz)处理20 min,加甲醇定容,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方比例和三黄滴丸的制备工艺制备缺大黄药材的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

### 2.3 系统适用性试验

精密吸取“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  $\mu$ l,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,供试品溶液与混合对照品溶液均在相同保留时间处出现芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚吸收峰,阴性对照溶液在该处无吸收。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰与其他组分峰达到基线分离,分离度均大于1.5,阴性对照溶液在该处无吸收峰。理论板数以相应色谱峰计均不低于10 000。

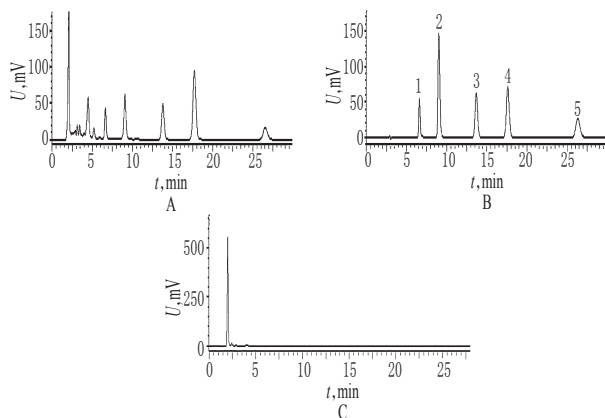


图1 高效液相色谱图

A. 供试品; B. 混合对照品; C. 阴性对照; 1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄酚; 5. 大黄素甲醚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test samples; B. mixed reference; C. negative control; 1. aloemodin; 2. rhein; 3. emodin; 4. chrysophanol; 5. physcion

### 2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液2、5、8、10、15、18、20  $\mu$ l,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量( $x, \mu$ g)为横坐标、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1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear ranges

待测成分	回归方程	线性范围, $\mu$ g	$r$
芦荟大黄素	$y=2\ 152\ 930.9x-10\ 153.2$	0.070~0.700	0.999 9
大黄酸	$y=636\ 059.4x-23\ 348.6$	0.646~6.460	0.999 9
大黄素	$y=1\ 990\ 706.1x-17\ 972.8$	0.130~1.300	0.999 9
大黄酚	$y=2\ 413\ 872.5x-16\ 153.0$	0.150~1.500	0.999 9
大黄素甲醚	$y=2\ 709\ 731.5x-21\ 114.4$	0.074~0.740	0.999 9

### 2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果,芦荟大黄素、大黄

酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.31%、0.25%、0.27%、0.27%、0.23% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

精密量取同一供试品(批号:20130315-01)溶液适量,分别于放置0、6、12、18、24、36 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.91%、1.86%、1.96%、1.31%、1.17% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在36 h内稳定性良好。

### 2.7 重复性试验

取样品(批号:20130315-01)6份,精密称定,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。结果,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均含量分别为0.70、4.69、1.24、2.03、0.75 mg/g, RSD分别为1.56%、1.53%、1.65%、1.80%、1.51% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:20130315-01)9份,每份0.1 g,分别精密加入一定量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品溶液,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2。

### 2.9 样品含量测定

精密称定3批样品各适量,每批2份,每份1.0 g,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,并计算样品含量,结果见表3。

## 3 讨论

### 3.1 测定波长的选择

将配制的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品溶液,采用紫外-可见分光光度计进行扫描,结果发现5种蒽醌类成分在440 nm波长左右均有较强吸收。因此,选择440 nm为本研究的检测波长。

### 3.2 流动相的选择

经查阅文献<sup>[7-8]</sup>,笔者曾试用甲醇-0.1%磷酸溶液(90:10, V/V)为流动相,但芦荟大黄素与大黄酸并未得到较好分离,拖尾现象严重,考虑到加入适当磷酸可以改善色谱峰的拖尾现象,又尝试以甲醇-0.23%磷酸溶液(85:15, V/V)为流动相,结果发现5种蒽醌类成分均可较好的分离,且峰形较好;芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚与相邻峰分离度分别为1.568、2.890、4.723、6.106、9.995,理论板数分别在70 000、16 000、10 000、20 000、40 000以上。

### 3.3 含量限度的确定

测定100粒滴丸,平均质量为50 mg/丸。本试验选取了3批滴丸进行5种蒽醌类成分的含量测定,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚平均含量分别为0.703 72、4.693 09、1.241 60、2.033 54、0.749 34 mg/g,考虑到药材来源、

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test(n=9)

待测成分	称样量, 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, %			
芦荟大黄素	0.153 72	0.055 5	0.056 0	0.109 9	97.14	100.92	2.80			
	0.152 86	0.055 3	0.056 0	0.109 8	97.32					
	0.153 89	0.055 3	0.056 0	0.110 1	97.86					
	0.154 23	0.054 9	0.070 0	0.126 5	102.29					
	0.152 89	0.054 1	0.070 0	0.124 8	101.00					
	0.151 92	0.053 3	0.070 0	0.126 9	105.14					
	0.153 25	0.055 0	0.084 0	0.141 1	102.50					
	0.159 77	0.056 5	0.084 0	0.142 5	102.38					
	0.160 56	0.054 8	0.084 0	0.141 0	102.62					
	大黄酸	0.153 72	0.378 1	0.196 8	0.572 9			98.98	97.39	1.39
		0.152 86	0.374 3	0.196 8	0.568 8			98.83		
		0.153 89	0.377 1	0.196 8	0.571 8			98.93		
0.154 23		0.378 0	0.246 0	0.614 7	96.22					
0.152 89		0.380 6	0.246 0	0.615 4	95.45					
0.151 92		0.373 1	0.246 0	0.610 2	96.38					
0.153 25		0.377 9	0.295 2	0.662 3	96.34					
0.159 77		0.370 2	0.295 2	0.659 6	98.04					
0.160 56		0.385 0	0.295 2	0.672 3	97.32					
大黄素		0.153 72	0.103 5	0.104 0	0.204 1	96.73	99.29	1.81		
		0.152 86	0.103 3	0.104 0	0.205 0	97.79				
		0.153 89	0.103 2	0.104 0	0.204 5	97.40				
	0.154 23	0.103 5	0.130 0	0.231 4	98.38					
	0.152 89	0.104 0	0.130 0	0.233 9	99.92					
	0.151 92	0.103 3	0.130 0	0.232 9	99.69					
	0.153 25	0.103 5	0.156 0	0.261 4	101.22					
	0.159 77	0.102 8	0.156 0	0.259 7	100.58					
	0.160 56	0.103 2	0.156 0	0.262 1	101.86					
	大黄酚	0.153 72	0.159 5	0.120 0	0.276 5	97.50			100.73	2.60
		0.152 86	0.159 3	0.120 0	0.277 4	98.42				
		0.153 89	0.159 8	0.120 0	0.275 7	96.58				
0.154 23		0.159 5	0.150 0	0.312 2	101.80					
0.152 89		0.159 3	0.150 0	0.315 7	104.27					
0.151 92		0.161 1	0.150 0	0.314 2	102.07					
0.153 25		0.159 5	0.180 0	0.343 5	102.22					
0.159 77		0.158 4	0.180 0	0.340 1	100.94					
0.160 56		0.157 9	0.180 0	0.342 9	102.78					
大黄素甲醚		0.153 72	0.065 4	0.059 2	0.122 2	95.95	99.81	2.06		
		0.152 86	0.059 4	0.059 2	0.117 5	98.14				
		0.153 89	0.059 6	0.059 2	0.117 6	97.97				
	0.154 23	0.060 4	0.074 0	0.134 9	100.68					
	0.152 89	0.058 6	0.074 0	0.132 3	99.59					
	0.151 92	0.059 3	0.074 0	0.134 7	101.89					
	0.153 25	0.060 4	0.088 8	0.150 4	101.35					
	0.159 77	0.058 8	0.088 8	0.148 3	100.79					
	0.160 56	0.060 7	0.088 8	0.151 2	101.91					

制备过程中的损耗、储存中损失等诸多因素的影响,按平均值的80%计算<sup>[9]</sup>,暂定三黄滴丸中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量分别不得小于0.028 15、0.187 72、

0.049 66、0.081 34、0.029 98 mg/丸。

表3 样品含量测定结果(n=2)

Tab 3 Results of samples content determination(n=2)

批号	滴丸质量, g	含量, mg/g				
		芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
20130315-01	1.004 94	0.706 36	4.695 46	1.245 41	2.034 88	0.733 64
20130315-01	1.034 94	0.700 91	4.692 82	1.243 71	2.041 23	0.751 90
20130315-02	1.027 45	0.707 11	4.689 52	1.240 09	2.029 28	0.749 80
20130315-02	1.017 50	0.698 93	4.694 86	1.239 93	2.025 43	0.758 72
20130315-03	1.003 65	0.704 12	4.689 91	1.239 23	2.035 67	0.750 92
20130315-03	1.030 78	0.704 91	4.695 98	1.241 23	2.034 76	0.751 03

### 3.4 质量标准的提高

2010年版《中国药典》(一部)对三黄片的质量标准进行了规定,对大黄中的大黄素和大黄酚进行了含量测定,大黄中其余成分并未规定。本研究采用HPLC法,同时测定了大黄中5种蒽醌类成分,全面反映了成品质量,提高了质量标准。该方法简便、准确、专属性强,可作为三黄滴丸中5种有效成分的含量控制方法。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:457-458.
- [2] 王捧英,陈琳,侯芳洁,等. HPLC同时测定人参强心滴丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5):802.
- [3] 夏从龙,周浓,种佳. HPLC测定不同厂家牛黄消炎片中5种蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):83.
- [4] 阚红玉,宋殿荣,王跃飞,等. HPLC法同时测定黄芩中5种黄酮类成分的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(11):1 016.
- [5] 祝忠民,卢晓荣. HPLC法同时测定三黄片中4种成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(5):300.
- [6] 毛泉明,张钰泉,叶福媛,等. 用RP-HPLC法测定三黄片中四种组分的含量[J]. 药学服务与研究, 2009, 9(4):292.
- [7] 柳仁民,丁瑞芳. 高效液相色谱法测定三黄片中蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(5):411.
- [8] 王钰莹,冯伟红,杨菲,等. “一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2):212.
- [9] 李文霞,宋平顺. HPLC法同时测定三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 药学进展, 2011, 35(4):178.

(收稿日期:2014-12-02 修回日期:2015-02-06)

(编辑:余庆华)

《中国药房》杂志——WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊, 欢迎投稿、订阅