

# 菊明提取物中蒽醌类活性成分的质量标准研究<sup>△</sup>

陈建真<sup>1\*</sup>, 陈建明<sup>2</sup>, 吕圭源<sup>3#</sup>, 叶磊<sup>1</sup>(1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.浙江省中医院, 杭州 310006; 3.浙江中医药大学药物研究所, 杭州 310053)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2937-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.21

**摘要** 目的: 建立菊明提取物中蒽醌类成分的薄层色谱(TLC)鉴别及反相高效液相色谱(RP-HPLC)对大黄酚和大黄素同时定量检测的方法, 为制订质量标准提供依据。方法: 以大黄酚、大黄素为对照品, TLC法鉴别方中决明子。以RP-HPLC法同时测定菊明提取物中大黄酚和大黄素的含量; 色谱柱为Discovery C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(85:15, V/V), 流速为1 ml/min, 柱温为30 ℃, 检测波长为254 nm。结果: 决明子的TLC斑点清晰、专属性强。大黄酚和大黄素的质量浓度分别在0.345~172.500 μg/ml和0.246~123.000 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(*r*均为0.999 9); 平均加样回收率分别为98.27%和99.04%, RSD分别为2.26%和2.71% (*n*均为6)。结论: 所建立的方法准确、重复性好, 可用于菊明提取物中蒽醌类有效成分的质量控制。

**关键词** 菊明提取物; 大黄酚; 大黄素; 反相高效液相色谱法; 薄层色谱法

## Study on Quality Standard of Anthraquinones from Juming Extract

CHEN Jian-zhen<sup>1</sup>, CHEN Jian-ming<sup>2</sup>, LYU Gui-yuan<sup>3</sup>, YE Lei<sup>1</sup>(1.College of Pharmacy, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Province Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China; 3.Institute of Materia Medica, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish TLC for anthraquinones from Juming extract and RP-HPLC methods for quantitative detection of chrysophanol and emodin, and to provide reference for the establishment of quality standard. METHODS: TLC was adopted to identify Cassiae Semen, using chrysophanol and emodin as reference substance. The contents of chrysophanol and emodin in Juming extract were determined by RP-HPLC. The determination was performed on Discovery C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (85:15, V/V) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The TLC spots were clear and specific. The linear range of chrysophanol and emodin were 0.345-172.500 μg/ml and 0.246-123.000 μg/ml, respectively. The average recovery rates were 98.27% (RSD=2.26%, *n*=6) and 99.04% (RSD=2.71%, *n*=6). CONCLUSIONS: The method is accurate and reproducible, and can be used for the quality control of anthraquinones from Juming extract.

**KEYWORDS** Juming extract; Chrysophanol; Emodin; RP-HPLC; TLC

菊明降压丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂(第三册)<sup>[1]</sup>, 由野菊花和决明子组成, 用于治疗高血压及其引起的头痛、目眩。菊明降压丸的药效物质主要为野菊花中的黄酮以及决明子中的蒽醌类成分。决明子中蒽醌类物质能显著降低实验性高血压大鼠的血压<sup>[2]</sup>, 其主要成分有大黄酚、大黄素、大黄素甲醚等<sup>[3]</sup>。菊明降压丸原制剂工艺及质量标准较落后、服用剂量较大, 对临床疗效有一定影响。在前期采用大孔树脂分离纯化得到较高纯度提取物的基础上<sup>[4]</sup>, 本研究建立了菊明提取物中蒽醌类活性成分的薄层色谱(TLC)鉴别和反相高效液相色谱(RP-HPLC)含量测定方法, 为菊明降压丸的二次开发及其质量标准的制订提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

△基金项目: 浙江中医药大学首批校级科技创新团队项目

\*教授, 博士。研究方向: 中药有效成分和质量控制及中药新产品开发。电话: 0571-86613657。E-mail: chjz102@aliyun.com

#通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 抗高血压中药新药。电话: 0571-86613601。E-mail: lv.gy@263.net

Varian Prostar HPLC仪, 包括230三元泵、410自动进样器、330二极管阵列检测器(美国Varian公司); KQ5200B型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AG135型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司); ZF-20D型暗箱式紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

菊明提取物(批号: 20070310、20070311、20070312)及决明子的阴性制剂由浙江中医药大学自制; 大黄酚、大黄素对照品及决明子对照药材(中国食品药品检定研究院, 批号分别为110796-200513、110756-200110及121011-200403); 硅胶G(TLC用, 青岛海洋化工有限公司); 含量测定用甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 决明子的鉴别<sup>[5-6]</sup>

取本品1 g, 加甲醇10 ml, 浸渍1 h, 滤过, 滤液蒸干; 加水10 ml溶解残渣, 再加盐酸1 ml, 水浴加热30 min后立即冷却; 用三氯甲烷萃取两次, 每次20 ml, 合并三氯甲烷液, 蒸干; 加三氯甲烷1 ml溶解残渣, 制成供试品溶液。另取大黄酚、大黄素

对照品各适量,加无水乙醇制成质量浓度均为1 mg/ml的对照品溶液。取决明子对照药材0.5 g以及取决明子的阴性制剂1.0 g,同法制成对照药材溶液和阴性对照溶液。按TLC法<sup>[5]</sup>,吸取上述4种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照品、对照药材色谱相应的位置上,显相同的橙色荧光斑点;阴性对照无干扰。菊明提取物中取决明子的TLC图见图1。

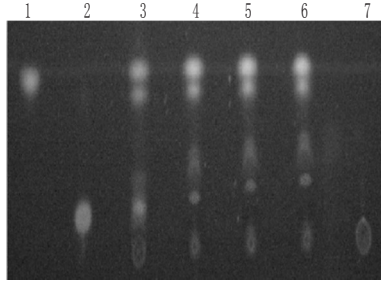


图1 菊明提取物中取决明子的TLC图

1.大黄酚对照品;2.大黄素对照品;3.取决明子对照药材;4~6.供试品;7.阴性对照

Fig 1 TLC of Cassiae Semen in Juming extract

1.chrysophanol control; 2.emodin control; 3.Cassiae Semen reference substance; 4-6.test samples; 7.negative control

## 2.2 大黄素和大黄酚含量测定<sup>[5-9]</sup>

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Discovery C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(85:15, V/V);流速:1 ml/min;柱温:30℃;检测波长:254 nm;进样量:10 μl。在此条件下可达到色谱峰基线分离,分离度>1.5,阴性对照无干扰。理论板数以大黄酚峰计算应>3 000。色谱见图2。

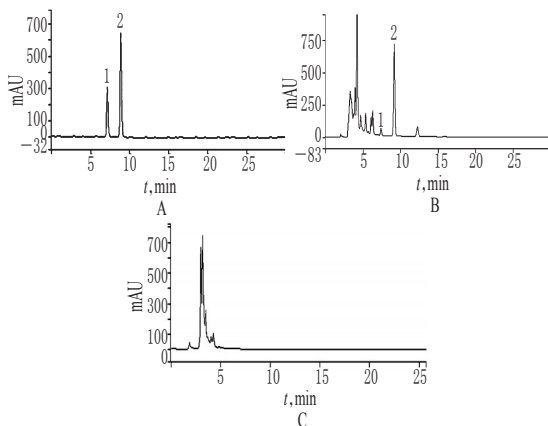


图2 菊明提取物的HPLC图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.大黄素;2.大黄酚

Fig 2 HPLC chromatograms of Juming extract

A.mixed control; B.test sample; C.negative control; 1.emodin; 2.chrysophanol

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取减压、干燥至恒质量的大黄酚对照品3.45 mg,置10 ml量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为0.345 mg/ml的大黄酚对照品溶液。精密称取减压、干燥至恒质量的大黄素对照品6.15 mg,置25 ml量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得

质量浓度为0.246 mg/ml的大黄素对照品溶液。将两种对照品溶液按体积比1:1混合,摇匀,得混合对照品溶液(大黄酚和大黄素的质量浓度分别为172.5 μg/ml和123.0 μg/ml)。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品约2.5 g,精密称定,加甲醇50 ml,加热回流2次,每次1 h,放冷,滤过,合并滤液,蒸干。残留物中加10%盐酸40 ml,水浴加热水解1 h,再用三氯甲烷萃取4次,每次40 ml,合并三氯甲烷液,蒸干,置25 ml量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取决明子的阴性制剂,按照“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 标准曲线的制备 精密吸取混合对照品溶液2、10、20、100、1 000 μl,分别置于1 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。照“2.2.1”项下色谱条件测定。以大黄酚和大黄素的质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得大黄酚回归方程: $y=305\ 932x-76\ 595$  ( $r=0.999\ 9$ ,  $n=5$ ),线性范围为0.345~172.500 μg/ml;大黄素回归方程: $y=192\ 651x-21\ 638$  ( $r=0.999\ 9$ ,  $n=5$ ),线性范围为0.246~123.000 μg/ml。

2.2.6 精密度试验 吸取混合对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积。结果,大黄酚RSD为0.79% ( $n=6$ ),大黄素RSD为0.95% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 吸取同一批号供试品溶液适量,分别于0、1、4、6、12、24 h按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积。结果,大黄酚RSD为2.19% ( $n=6$ ),大黄素RSD为1.51% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 称取同一批号样品6份,每份约2.5 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量。结果,大黄酚平均质量分数为0.157 5%,RSD=1.10% ( $n=6$ );大黄素平均质量分数为0.030 4%,RSD=1.10% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 称取已知质量分数的样品6份,每份约1 g,精密称定,精密加入大黄酚和大黄素对照品分别为1.601 mg和0.314 mg,按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算回收率和RSD,结果分别见表1、表2。

表1 大黄酚回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery test of chrysophanol ( $n=6$ )

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	1.583	1.601	3.201	101.06		
2	1.613	1.601	3.189	98.44		
3	1.603	1.601	3.195	99.44	98.27	2.26
4	1.576	1.601	3.102	95.32		
5	1.621	1.601	3.157	95.94		
6	1.627	1.601	3.219	99.44		

2.2.10 样品含量测定 分别取3批样品,各约2.5 g,按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量。结果,3批样品(20070310、20070311、20070312)中大黄酚质量分数分别为0.160 8%、0.156 4%、0.157 1%,平均0.158 1%;大黄素质量分数分别为0.030 7%、0.030 4%、0.030 5%,平均0.0305%。

## 3 讨论

# 柑柏止痒浴液的质量标准研究

余晓霞<sup>1\*</sup>, 伍俊妍<sup>1</sup>, 刘春霞<sup>1#</sup>, 温预关<sup>2</sup>(1.中山大学孙逸仙纪念医院药学部, 广州 510120; 2.广州市脑科医院药剂科/国家药品临床研究基地, 广州 510370)

中图分类号 R283.61;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2939-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.22

**摘要** 目的:建立柑柏止痒浴液的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对方中薄荷脑和黄柏进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定黄柏中盐酸小檗碱的含量;色谱柱为Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub>(100 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.03 mol/ml 乙酸铵溶液(45:55, V/V),检测波长为346 nm。结果:TLC图专属性强,阴性对照无干扰。盐酸小檗碱的质量浓度在1~200 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 8$ );精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为100.28%, RSD=1.58%( $n=6$ )。结论:所建标准可用于柑柏止痒浴液的质量控制。

**关键词** 柑柏止痒浴液;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;盐酸小檗碱

## Study on Quality Standard of Ganbai Zhiyang Lotion

YU Xiao-xia<sup>1</sup>, WU Jun-yan<sup>1</sup>, LIU Chun-xia<sup>1</sup>, WEN Yu-guan<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2.Dept. of Pharmacy, Guangzhou Brain Hospital/State Clinical Drug Research Base, Guangzhou 510370, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard of Ganbai zhiyang lotion. METHODS: Menthol and *Phellodendron chinense* were identified by TLC. The content of berberine hydrochloride in *P. chinense* was determined by HPLC. The determination was performed on Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (100 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.03 mol/ml ammonium acetate(45:55, V/V). The detection wavelength was set at 346 nm. RESULTS: TLC identification method exhibited good specificities without interference from negative samples. The linear range berberine hydrochloride were 1-200 μg/ml( $r=0.999\ 8$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; average recovery was 100.28% (RSD=1.58%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Ganbai zhiyang lotion.

**KEYWORDS** Ganbai zhiyang lotion; Quality standard; TLC; HPLC; Berberine hydrochloride

表2 大黄素回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery test of emodin( $n=6$ )

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.306	0.314	0.628	102.55		
2	0.312	0.314	0.614	96.18		
3	0.310	0.314	0.622	99.36	99.04	2.71
4	0.305	0.314	0.625	101.91		
5	0.314	0.314	0.619	97.13		
6	0.315	0.314	0.620	97.13		

决明子中蒽醌类成分有游离型和结合型两种形式,前期试验对供试品溶液的制备方法进行了探索,当样品直接用甲醇提取时,在相应位置处色谱峰不明显;而采用甲醇提取后再经盐酸水解的方法制备供试品溶液,在相应位置处色谱峰明显,故采用后种方法。在相应的色谱条件下,大黄酚和大黄素可同时出峰,分离度较好,因此选择同时测定样品中大黄素和大黄酚的含量,方法简便,结果可靠。

本试验针对菊明提取物中的决明子,建立了对降压有效

\* 主管药师,硕士。研究方向:医院制剂、药物分析。电话:020-81332427。E-mail:xiaoxiao1979@21cn.com

# 通信作者:副主任药师。研究方向:医院制剂、药物分析。电话:020-81332427。E-mail:lcxgz@163.com

成分蒽醌类的TLC鉴别和含量测定方法。在前期已对方君药野菊花中的黄酮类成分建立质量控制方法的基础上,本研究从定性到定量、从总含量到多个有效成分含量进行全面控制,对于菊明降压丸的二次开发及提高传统中药复方的质量标准水平具有较重要的意义。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第三册[S].1991:64.
- [2] 李续娥,郭宝江,曾志,等.决明子蛋白质、低聚糖及蒽醌苷降压作用的实验研究[J].中草药,2003,34(9):842.
- [3] 郝延军,桑育黎,赵余庆.决明子蒽醌类化学成分研究[J].中草药,2003,34(1):18.
- [4] 陈建真,叶磊,陈建明.大孔吸附树脂分离纯化菊明降压有效部位总黄酮[J].中国医院药学杂志,2010,31(8):660.
- [5] 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,2010:135、附录34.
- [6] 雷宁,张颖,马萍.复方决明子胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2011,22(3):255.

(收稿日期:2013-08-05 修回日期:2013-09-13)