

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.06.003

高效液相色谱法同时测定复方胆通片中5种蒽醌类成分含量

金贤武¹, 付彩群¹, 黄道明¹, 黄平^{2△}, 周兴卓³

(1. 江西省上饶市食品药品检验所, 江西 上饶 334000; 2. 江西医学高等专科学校, 江西 上饶 334000;
3. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266000)

摘要:目的 建立同时测定复方胆通片中5种蒽醌类成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用 Phenomenex[®] - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液(75:25, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 254 nm。结果 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚质量浓度分别在 2.88~57.6, 1.36~27.2, 3.22~64.3, 16.03~320.6, 3.09~61.8 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好; 加样回收率分别为 97.91%, 101.20%, 100.18%, 102.24%, 97.86%, RSD 分别为 2.31%, 2.51%, 1.83%, 1.61%, 2.33% (n=6)。结论 该方法准确、可靠, 可为复方胆通片的质量控制和质量评价提供依据。

关键词: 高效液相色谱法; 复方胆通片; 蒽醌类; 含量测定

中图分类号: R286.0; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)06-0007-04

Simultaneous Determination of Five Anthraquinones Components in Fufang Dantong Tablets by HPLC

Jin Xianwu¹, Fu Caiqun¹, Huang Daoming¹, Huang Ping², Zhou Xingzhuo³

(1. Food and Drug Inspection of Shangrao, Shangrao, Jiangxi, China 334000; 2. Jiangxi Medical College, Shangrao, Jiangxi, China 334000;
3. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China 266000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of five anthraquinones components in Fufang Dantong Tablets. **Methods** Phenomenex[®] - C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was methanol-0.1%

第一作者: 金贤武, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药质量标准, (电子信箱)jinxianwu2016@163.com。

△通信作者: 黄平, 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为中药质量标准, (电子信箱)huangping2489@163.com。

没食子酸含量具有明显差异。化香树树皮、树干、树叶没食子酸含量也不一致^[11]。而本次采摘自秦巴山地区的单叶化香树没食子酸含量较高, 具有重要的潜在药用价值。

参考文献:

- [1] 刘永新, 林余霖. 本草纲目彩色图鉴[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2006: 321.
- [2] 国家中医药管理局, 《中华本草》编委会. 中华本草(第5卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 867.
- [3] 赵国平, 戴慎, 陈仁寿. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 637.
- [4] 陈奎. 化香树果序化学成分研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2008.
- [5] 贾晓妮, 王军宪, 成昱霖, 等. 化香树果序化学成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(8): 1786-1788.
- [6] 邓毅, 李欣, 邵萌, 等. 化香树果序挥发油的气相色谱-质谱联用分析及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中医药导报, 2013, 19(11): 80-82.
- [7] 王茂义, 王军宪, 贾晓妮, 等. 化香树果序挥发油化学成分分析[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(9): 736-738.
- [8] 高蓉, 林亮, 李稳宏, 等. 大孔吸附树脂纯化化香树果序总黄酮工艺研究[J]. 化学工程, 2010, 38(7): 9-13.
- [9] 高蓉, 刘明霞, 李稳宏, 等. 化香树果序多酚在大孔吸附树脂上吸附特性及热力学研究[J]. 离子交换与吸附, 2010, 26(6): 542-550.

- [10] 李冬, 李稳宏, 廉媛媛, 等. 化香树果序总黄酮提取动力学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 689-692.
- [11] 杨艳, 周健, 陈晓, 等. 圆果化香树中没食子酸的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 107-109.
- [12] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(二十一卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 8-9.
- [13] 刘明霞. 化香树果序中多酚提取纯化工艺及体外抑菌活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [14] 高蓉. 化香树果序活性成分提取、分离、应用及动力学研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [15] 林亮. 化香树果序黄酮类化合物提取、分离及抑菌活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [16] Locatelli C, Filippin - Monteiro FB, Creczynski - Pasa TB. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review[J]. Eur J Med Chem, 2013, 60(22): 233-239.
- [17] Chen H, Gao Y, Wang A, et al. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents[J]. Eur J Med Chem, 2015, 92(15): 648-655.
- [18] Shanmugam MK, Dai X, Kumar AP, et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(11): 1579-1587.
- [19] 王茂义, 刘俊田, 侯宁. RP-HPLC 测定化香树果序中没食子酸的含量[J]. 中国药师, 2010, 13(3): 378-379.

(收稿日期: 2017-08-16; 修回日期: 2017-12-07)

phosphoric acid solution(75 : 25, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 254 nm. **Results** The aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion had good linear relationships in the ranges of 2.88–57.6, 1.36–27.2, 3.22–64.3, 16.03–320.6, 3.09–61.8 µg/mL, the average recovery rates were 97.91%, 101.20%, 100.18%, 102.24% and 97.86%, respectively, and the RSDs were 2.31%, 2.51%, 1.83%, 1.61%, 2.23% (n=6). **Conclusion** The method is accurate and reliable, which can provide basis for the quality control and quality evaluation of Fufang Dantong Tablets.

Key words: HPLC; Fufang Dantong Tablets; anthraquinones; content determination

复方胆通片是由茵陈、胆通、穿心莲、溪黄草和大黄5味中药加工制成,具有清热利胆、解痉止痛的功效,临床主要用于治疗胆囊炎、胆管炎、急慢性胆囊炎、肝硬化等^[1]。现行质量标准含量测定项下以胆通为指标成分进行含量测定^[2]。目前,有研究在原标准基础上增加了溪黄草、胆通、大黄的薄层色谱鉴别,建立了测定羟甲基香豆素和齐墩果酸的高效液相色谱(HPLC)法^[3]。也有研究以绿原酸、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯、羟甲基香豆素等成分为指标性成分^[4–6]建立测定方法。鉴于处方中大黄的主要有效成分为蒽醌类化合物^[7],其具有较强的泻下、抗炎、镇痛、抗病毒等生物活性^[8–11],常作为药材或制剂质量控制及评价的指标性成分,故本研究中以大黄的5种主要成分——蒽醌类成分为目标成分,建立同时测定复方胆通片中该5种成分含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),包括 Waters e2489 检测器,Empower 工作站;CPA225D 型十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司);KQ-500DE 型超声机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

芦荟大黄素对照品(批号为 110796-201409,纯度 98.4%),大黄酸对照品(批号为 110757-201302,纯度 98.1%),大黄素对照品(批号为 110756-201211,纯度 99.2%),大黄酚对照品(批号为 110796-201410,纯度 98.7%),大黄素甲醚对照品(批号为 110766-201205,纯度 98.9%),均购自中国食品药品检定研究院;复方胆通片购自利群大药房;色谱甲醇(德国 Merck 公司);磷酸、分析甲醇(北京化工产品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex®-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 µm);流动相:甲醇-0.1% 磷酸水溶液(75:25, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 °C;进样量:10 µL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量,精密称定,加甲醇制成

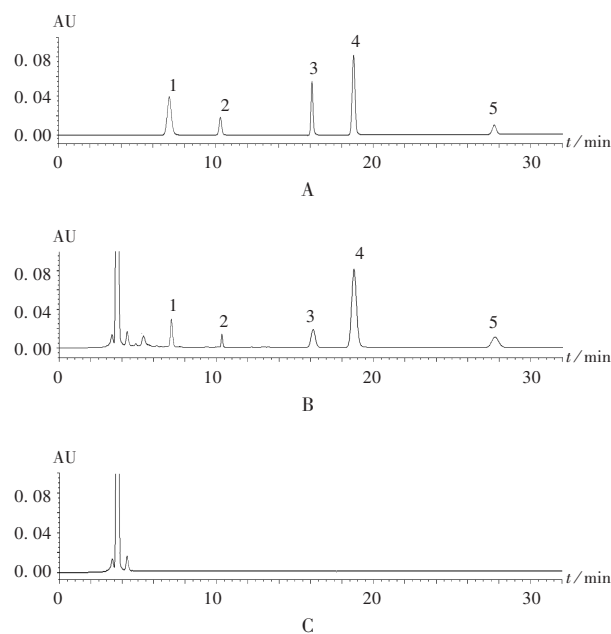
质量浓度分别为 57.6, 27.2, 64.3, 320.6, 61.8 µg/mL 的混合对照品溶液,摇匀,即得。

供试品溶液:取复方胆通片 10 片,去包衣,磨细,取约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,加入 25 mL 甲醇,回流提取 30 min,放冷,过滤,用甲醇洗涤滤纸和药渣,至无色,合并滤液,蒸干,残渣加 2.5 mol/L 硫酸溶液 10 mL,超声 5 min 后加三氯甲烷 10 mL,回流提取 1.0 h,冷却,转移至分液漏斗中,用 CHCl₃ 洗涤容器数次,合并洗液,取 CHCl₃ 酸液再用 10 mL CHCl₃ 萃取 3 次,合并 CHCl₃ 液,挥去,残渣加甲醇使其溶解,定容至 10 mL,摇匀,即得。

阴性对照品溶液:参照处方,取茵陈、胆通、穿心莲、溪黄草 4 味中药,按配方比例及供试品溶液制备方法制成缺大黄的阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取 2.2 项下 3 种溶液各 10 µL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样分析。结果见图 1。可见,5 种被测成分能达到完全分离,阴性对照无干扰。



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

图1 高效液相色谱图

线性关系考察:分别精密吸取对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度。分别精密吸取 10 μ L 注入高效液相色谱仪分析, 以峰面积 (Y) 对进样质量浓度 (X) 进行线性回归, 结果见表 1。

精密度试验:精密吸取混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 RSD 分别

为 1.62%, 2.01%, 1.31%, 0.75%, 1.59% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(批号为 140902), 按 2.1 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时进样分析, 记录峰面积。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 RSD 分别为 2.41%, 1.17%, 2.47%, 0.85%, 1.72% ($n=7$), 表明 5 种成分在甲醇溶液中 24 h 内稳定。

表 1 5 种成分线性回归方程和线性范围 ($n=6$)

成分	线性回归方程	r	质量浓度线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)
芦荟大黄素	$Y = 27\,217X - 16\,632$	0.999 8	2.88 ~ 57.6
大黄酸	$Y = 28\,943X - 5\,163.1$	0.999 9	1.36 ~ 27.2
大黄素	$Y = 27\,504X + 10\,403$	0.999 7	3.22 ~ 64.3
大黄酚	$Y = 28\,315X - 19\,415$	0.999 6	16.03 ~ 320.6
大黄素甲醚	$Y = 27\,536X + 5\,433.5$	0.999 8	3.09 ~ 61.8

表 2 加样回收试验 ($n=6$)

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(%)
芦荟大黄素	0.502 7	0.144 6	0.152 0	0.289 7	95.46	97.91	2.31
	0.541 6	0.155 7	0.152 0	0.310 4	101.78		
	0.504 3	0.144 9	0.152 0	0.292 5	97.11		
	0.512 2	0.147 3	0.152 0	0.297 3	98.68		
	0.501 3	0.144 1	0.152 0	0.290 2	96.12		
	0.510 2	0.146 7	0.152 0	0.296 1	98.29		
大黄酸	0.502 7	0.068 3	0.072 4	0.142 4	102.35	101.20	2.51
	0.541 6	0.073 6	0.072 4	0.143 8	96.96		
	0.504 3	0.068 5	0.072 4	0.142 1	101.66		
	0.512 2	0.069 6	0.072 4	0.144 7	103.73		
	0.501 3	0.068 1	0.072 4	0.140 1	99.45		
	0.510 2	0.069 3	0.072 4	0.143 9	103.04		
大黄素	0.502 7	0.161 7	0.165 0	0.323 7	98.18	100.18	1.83
	0.541 6	0.174 2	0.165 0	0.340 9	101.03		
	0.504 3	0.162 2	0.165 0	0.332 5	103.21		
	0.512 2	0.164 7	0.165 0	0.328 8	99.45		
	0.501 3	0.161 2	0.165 0	0.329 1	101.76		
	0.510 2	0.164 1	0.165 0	0.332 6	102.12		
大黄酚	0.502 7	0.805 7	0.825 0	1.663 1	103.93	102.24	1.61
	0.541 6	0.868 1	0.825 0	1.687 2	99.28		
	0.504 3	0.808 3	0.825 0	1.653 8	102.48		
	0.512 2	0.820 9	0.825 0	1.660 7	101.79		
	0.501 3	0.803 5	0.825 0	1.648 5	102.42		
	0.510 2	0.817 7	0.825 0	1.671 6	103.50		
大黄素甲醚	0.502 7	0.154 6	0.158 0	0.305 9	95.76	97.86	2.23
	0.541 6	0.166 5	0.158 0	0.319 5	96.84		
	0.504 3	0.155 1	0.158 0	0.314 7	101.01		
	0.512 2	0.157 5	0.158 0	0.309 7	96.33		
	0.501 3	0.154 1	0.158 0	0.307 4	97.03		
	0.510 2	0.156 9	0.158 0	0.315 2	100.19		

表3 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	总量
140902	0.287 5	0.135 9	0.321 6	1.602 8	0.307 5	2.655 3
150913	0.314 9	0.118 3	0.379 1	1.397 3	0.259 1	2.468 7
150324	0.291 8	0.126 5	0.285 3	2.041 8	0.321 7	3.067 1
150917	0.300 8	0.109 4	0.335 2	1.893 2	0.284 5	2.923 1
151208	0.262 7	0.158 2	0.324 8	2.621 7	0.358 6	3.726 0

重复性试验:取同一批(批号为140902)样品,依法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算RSD。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的RSD分别为0.97%,1.49%,2.35%,1.56%,1.04% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量(批号为140902)的样品6份,每份约0.5g,按1:1的比例加入对照品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样分析,计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取不同批次样品约1.0g,每个批次平行取3份,制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样分析,以外标法计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 提取方法选择

参照单因素考察法,试验中比较了2种提取方法(超声、回流),提取时间(30,45,60 min),提取溶剂(甲醇、乙醇),料液比(1:10,1:25,1:50),结果显示,以25倍量的甲醇回流提取30 min后再水解提取5种蒽醌类成分所得含量最高。

3.2 水解条件选择

蒽醌类成分易与糖结合,大部分以苷的形式存在。在测定时需先水解成苷元,结果显示,采用2.5 mol/L硫酸的水解效果优于8%的盐酸^[12],故选用2.5 mol/L的硫酸水解后氯仿萃取的提取方法。

3.3 流动相选择

试验中比较了甲醇-水^[13],甲醇-0.1%磷酸水^[14]和乙腈-0.1%磷酸水溶液^[15]3种流动相。结果显示,当以甲醇-0.1%磷酸水溶液(75:25, V/V)为流动相及洗脱程序时,5种蒽醌类成分均能与相邻色谱峰完全分离,且峰形较好,可能是蒽醌类化合物大都具有酚羟基,显弱酸性,在流动相中加入一定的酸可抑制其电离,从而改善峰形。

3.4 研究价值

复方胆通片现行标准中含量测定项以羟甲基香豆素为指标成分,并未收入蒽醌类成分含量测定。有文献

以大黄素为指标成分,建立了复方胆通片中大黄素的含量测定方法,但单一成分并不能完整地反映和保证药物的疗效和质量,故本试验中建立了复方中成药大黄的5种蒽醌类成分含量测定方法,为以5种蒽醌类成分的总含量为含量测定要求的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王南方,李泽武,蒋兰辉,等. 复方胆通片对肝硬化患者血清球蛋白的影响[J]. 中国医药导报,2010,7(25):15-17.
- [2] 国家药典委员会. 卫生部药品标准·中药成方制剂(第五册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:111.
- [3] 李学涛,田景振. 复方胆通片质量标准的研究[J]. 食品与药品,2010,12(11):407-411.
- [4] 姚五湖. HPLC法测定复方胆通片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. 今日药学,2010,20(6):39-41.
- [5] 靳国印,张世敏,白雪梅,等. HPLC法测定复方胆通片中绿原酸的含量[J]. 河北北方学院学报,2007,24(1):48-49.
- [6] 倪晨,冯彪,熊艺花,等. HPLC法测定羟甲基香豆素的含量[J]. 中国新药与临床药理,2004,15(6):420-421.
- [7] 曾芳,李媛. 大黄有效化学成分及其药理作用[J]. 当代医学,2014,19(12):149.
- [8] 赵盼盼,佟继铭,田沂凡,等. 蒽醌类化合物药理作用研究进展[J]. 承德医学院学报,2016,33(2):152-155.
- [9] 陈毅,王海丽,薛露,等. 茜草的研究进展[J]. 中草药,2017,48(13):2771-2779.
- [10] 陶明宝,张乐,刘飞,等. 含蒽醌类成分中药的安全性研究进展[J]. 中药药理与临床,2016,32(6):2771-2779.
- [11] 李牧,杜智敏. 芦荟大黄素的药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(9):765-768.
- [12] 吴迪,袁海铭,曾宪仪,等. HPLC法测定大黄总蒽醌胶囊5种蒽醌苷元及5种游离蒽醌含量[J]. 江西中医药大学学报,2016,28(1):68-70.
- [13] 杨娟艳,王珍珍,茅向军,等. HPLC法比较3种土大黄中游离蒽醌和总蒽醌的含量[J]. 药物分析杂志,2017,37(4):615-623.
- [14] 刘远平,陈粟. 不同产地药用大黄中5种游离蒽醌的含量测定[J]. 亚太传统医药,2016,12(15):42-44.
- [15] 庞婷,谢臻,陈勇,等. HPLC同时测定大黄配伍药对中7个蒽醌类化合物的含量[J]. 中国新药杂志,2017,26(9):1079-1088.

(收稿日期:2017-08-16;修回日期:2017-09-24)