

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)07-0065-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.07.013



超高效液相色谱法同时测定伤科跌打片大黄中5种游离蒽醌含量*

唐雪婷^{1,2}, 王兆琦¹, 田金苗¹, 孔令锋¹, 周春玲^{1Δ}

(1. 辽宁省检验检测认证中心, 辽宁 沈阳 110036; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立伤科跌打片大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的超高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB - C₁₈ 柱(100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为甲醇 - 0.1% 磷酸溶液(85:15, V/V), 流速为 1.6 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 254 nm, 进样量为 2 μL。结果 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的质量浓度分别为 0.377 5 ~ 56.628 0 μg/mL、0.468 3 ~ 70.244 8 μg/mL、0.438 1 ~ 65.721 6 μg/mL、0.431 4 ~ 64.709 4 μg/mL、0.164 7 ~ 24.709 2 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.999\ 9, n = 6$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.5% ($n = 6$); 平均加样回收率分别为 97.11%, 102.73%, 105.00%, 96.30%, 105.12%, RSD 分别为 1.28%, 1.69%, 1.87%, 1.81%, 1.16% ($n = 6$)。10 家企业生产的 74 批伤科跌打片的上述 5 种成分的平均总含量为每片 0.59 mg, 高于限度每片 0.24 mg。结论 该方法操作简便快速、结果准确, 可用于伤科跌打片的质量控制。

关键词:超高效液相色谱法; 伤科跌打片; 大黄; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 含量测定

Simultaneous Determination of Five Free Anthraquinones in Rhei Radix et Rhizoma from Shangke Dieda Tablets by UPLC

TANG Xueting^{1,2}, WANG Zhaoqi¹, TIAN Jinmiao¹, KONG Lingfeng¹, ZHOU Chunling¹

(1. Liaoning Inspection, Examination and Certification Centre, Shenyang, Liaoning, China 110036; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, China 110016)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) method for the simultaneous determination of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion in Rhei Radix et Rhizoma from Shangke Dieda Tablets. **Methods** The chromatographic column was Agilent Poroshell 120 SB - C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), the mobile phase was methanol - 0.1% phosphoric acid solution (85:15, V/V), the flow rate was 1.6 mL/min, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 254 nm, and the injection volume was 2 μL. **Results** The linear ranges of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion were 0.377 5 - 56.628 0 μg/mL, 0.468 3 - 70.244 8 μg/mL, 0.438 1 - 65.721 6 μg/mL, 0.431 4 - 64.709 4 μg/mL, and 0.164 7 - 24.709 2 μg/mL ($r = 0.999\ 9, n = 6$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability tests were all lower than 2.5% ($n = 6$). The average recoveries of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion were 97.11%, 102.73%, 105.00%, 96.30%, and 105.12%, with RSDs of 1.28%, 1.69%, 1.87%, 1.81%, and 1.16% ($n = 6$), respectively. The average total content of the five components in 74 batches of Shangke Dieda Tablets from 10 manufacturers was 0.59 mg/tablet, exceeding the specified limit of 0.24 mg/tablet. **Conclusion** The method is simple, rapid, and accurate, which can be used for quality control of Shangke Dieda Tablets.

Key words: UPLC; Shangke Dieda Tablets; Rhei Radix et Rhizoma; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion; content determination

伤科跌打片源于《名医验方大全》^[1], 现收载于《卫生部药品标准: 中药成方制剂(第五册)》^[2]。其由大黄(制)、三七、续断、牡丹皮、当归、三棱(制)、制川乌、延胡索(醋制)、红花、郁金、地黄、五灵脂(制)、莪术(制)、青皮、香附(醋制)、蒲黄、防风、白芍(炒)、木香、乌药、柴胡、枳壳(炒)22味中药组方, 其中大黄、三七、郁金、白芍、青皮、木香、枳壳、延胡索8味药材粉碎成细粉入药, 其余14味药材加水煎煮后入药。伤科跌打片具有活

血散瘀、理气通滞、消肿止痛、续筋接骨等功效, 广泛用于治疗跌打损伤、伤筋动骨、瘀血肿痛、闪腰岔气等症^[3-5]。但《国家基本药物目录》尚未收载, 已有报道中未见同时对制剂中制大黄药材的游离蒽醌芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚5种成分进行含量测定^[6-9]。为简便、全面地对伤科跌打片进行质量评价, 本研究中建立了同时测定其中5种成分含量的超高效液相色谱(UPLC)法^[10-15]。现报道如下。

* 基金项目: 2023年国家药品评价性抽验项目[67]。

第一作者: 唐雪婷, 女, 大学本科, 药师, 研究方向为中药质量控制, (电话)024-31266308(电子信箱)1361968924@qq.com。

Δ通信作者: 周春玲, 女, 博士, 主任药师, 研究方向为中药药效物质基础和中药质量控制, (电子信箱)zhouchunling@163.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity ARC 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Sartorius CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为十万分之一);auto science 型超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 25 kHz)。

1.2 试药

芦荟大黄素对照品(批号为 110795-202011,纯度为 97.5%),大黄酸对照品(批号为 110757-201607,纯度为 99.3%),大黄素对照品(批号为 110756-201913,纯度为 96.0%),大黄酚对照品(批号为 110796-201922,纯度为 99.4%),大黄素甲醚对照品(批号为 110756-202218,纯度为 98.9%),均购自中国食品药品检定研究院;伤科跌打片样品(74 批,编号为 S1-S74)信息见表 1;甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司);磷酸(色谱纯,北京迪马科技有限公司);水为超纯水。

表 1 伤科跌打片样品信息

Tab. 1 Sample information of Shangke Dieda Tablets

编号	生产企业	批号
S1-S3	安徽永生堂药业有限责任公司	200902, 201105, 210701
S4-S8	大连辉仁制药有限公司	20220301, 20220302, 20220303, 20220304, 20220305
S9-S28	大连天山药业有限公司	210204, 210606, 210901, 211009, 220303, 220403, 220412, 220414, 220802, 220805, 220806, 220807, 220811, 220812, 220901, 220902, 220905, 220906, 221101, 221103
S29-S42	福州闽海药业有限公司	21080261, 21100261, 22020321, 22050161, 22070121, 22070221, 22070321, 22080161, 22090161, 22110231, 22110331, 22110631, 23010231, 23010161
S43-S56	甘肃中天金丹药业有限公司	210401, 210601, 211101, 220106, 220315, 220401, 220502, 220612, 220802, 220907, 221010, 221204, 230302, 230110
S57-S61	湖南安邦制药股份有限公司	220501, 220801, 220101, 220701, 220703
S62-S66	湖南德康制药股份有限公司	220902, 220903, 221003, 221004, 221101
S67	内蒙古蒙药股份有限公司	2105001
S68-S69	内蒙古天奇中蒙制药股份有限公司	22101044, 22210015
S70-S74	山西德元堂药业有限公司	220601, 220602, 220801, 220901, 221001

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈柱(100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15, V/V);流速:1.6 mL/min;柱温:30℃;检测波长:254 nm;进样量:2 μL。

2.2 溶液制备

依次精密称取芦荟大黄素对照品、大黄酸对照品、大黄素对照品、大黄酚对照品 9.68, 11.79, 11.41, 10.85 mg, 分别置 100 mL 容量瓶中,再精密称取大黄素甲醚对照品 10.41 mg, 分别置 250 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为单一对照品贮备液。精密吸取单一对照品贮备液各适量,加甲醇制成每 1 mL 分别含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚各 4 μg、大黄素甲醚 1.5 μg 的混合溶液,摇匀,作为混合对照品溶液。

取样品(编号为 S49)适量,研细,取约 0.25 g,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇 20 mL,超声处理(功率为 300 W,频率为 25 kHz)30 min,放冷,加甲醇稀释并定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

取除大黄外的样品处方药味,按制备工艺制备不含大黄的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

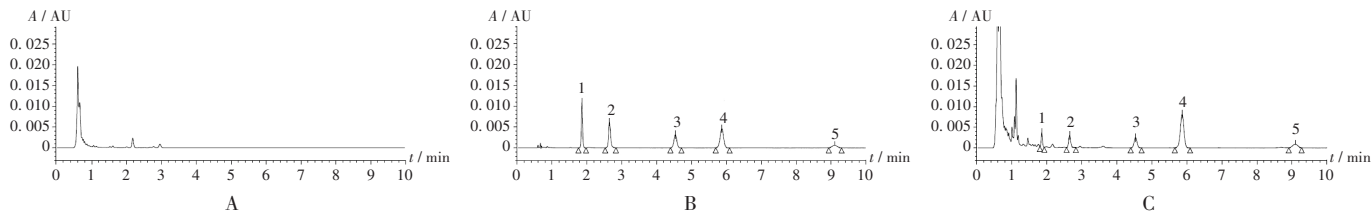
专属性试验:精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图 1。

线性关系考察:分别精密吸取 2.2 项下各单一对照品贮备液 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0 mL, 置 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释并定容,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以进样质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 2,表明各成分在各自的线性范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取 2.2 项下供试品溶液适量,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 0.23%, 0.49%, 0.75%, 0.37%, 0.29%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,分别于配制后 0, 3, 5, 19, 24, 30 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 0.37%, 0.85%, 0.87%, 0.70%, 0.42%(n=6),表明供试品溶液常温下放置 30 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一批样品(编号为 S49)约 0.25 g,精密称定,平行 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,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 0.124 0, 0.206 0, 0.292 4,



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. 阴性对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 超高效液相色谱图

1. Aloe - emodin 2. Rhein 3. Emodin 4. Chrysophanol 5. Physcion

A. Negative reference solution B. Mixed reference solution C. Test solution

Fig. 1 UPLC chromatogram

表2 线性关系考察结果(n = 6)

Tab. 2 Results of the linear relation test (n = 6)

成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)
芦荟大黄素	$Y = 3\,695.6009X + 94.5065$	0.9999	0.3775~56.6280
大黄酸	$Y = 2\,716.2844X - 411.1511$	0.9999	0.4683~70.2448
大黄素	$Y = 2\,154.6464X - 120.6810$	0.9999	0.4381~65.7216
大黄酚	$Y = 3\,808.2647X - 28.8445$	0.9999	0.4314~64.7094
大黄素甲醚	$Y = 2\,004.1460X - 184.2109$	0.9999	0.1647~24.7092

0.8096, 0.2030 mg/g, RSD 分别为 1.74%, 1.50%, 2.03%, 1.73%, 2.33% (n = 6), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(编号为S49) 0.13 g,精密称定,平行6份,置25 mL容量瓶中,分别精密加入芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品溶液(质量浓度分别为0.01888, 0.02810, 0.03724, 0.10010, 0.0267 mg/mL)各1 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算各成分的加样回收率。结果见表3,表明方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

取10个生产企业的74批样品(编号为S1 - S74)各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以外标法计算样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的总含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

本研究中考察了不同品牌高效液相色谱仪(Shimadzu 2010, Waters),不同品牌色谱柱(Agilent、Capcell PAK、迪科马),不同流速(1.0, 1.3, 1.6 mL/min),不同流动相比例甲醇-0.1%磷酸(85:15, 80:20, V/V),不同柱温(30, 35℃)等色谱条件的分离效果,最终确定2.1项下色谱条件。

3.2 提取方法选择

本研究中考察了伤科跌打片的超声提取与回流提

表3 加样回收试验结果(n = 6)

Tab. 3 Results of the recovery test (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	0.1361	0.0169	0.01888	0.0353	97.46	97.11	1.28
	0.1318	0.0163	0.01888	0.0349	98.52		
	0.1302	0.0161	0.01888	0.0346	97.99		
	0.1382	0.0171	0.01888	0.0352	95.87		
	0.1326	0.0164	0.01888	0.0344	95.34		
大黄酸	0.1364	0.0169	0.01888	0.0353	97.46	102.73	1.69
	0.1361	0.0280	0.02810	0.0573	104.27		
	0.1318	0.0272	0.02810	0.0560	102.49		
	0.1302	0.0268	0.02810	0.0555	102.14		
	0.1382	0.0285	0.02810	0.0569	101.07		
大黄素	0.1326	0.0273	0.02810	0.0557	101.07	105.00	1.87
	0.1364	0.0281	0.02810	0.0577	105.34		
	0.1361	0.0398	0.03724	0.0800	107.95		
	0.1318	0.0385	0.03724	0.0774	104.46		
	0.1302	0.0381	0.03724	0.0770	104.46		
大黄酚	0.1382	0.0404	0.03724	0.0795	104.99	96.30	1.81
	0.1326	0.0388	0.03724	0.0768	102.04		
	0.1364	0.0399	0.03724	0.0794	106.07		
	0.1361	0.1102	0.10010	0.2047	94.41		
	0.1318	0.1067	0.10010	0.2044	97.60		
大黄素 甲醚	0.1302	0.1054	0.10010	0.2040	98.50	105.12	1.16
	0.1382	0.1119	0.10010	0.2061	94.11		
	0.1326	0.1074	0.10010	0.2040	96.50		
	0.1364	0.1104	0.10010	0.2072	96.70		
	0.1361	0.0276	0.0267	0.0552	103.37		

取效果,结果回流提取和超声提取的提取率差异不大。然后考察了不同超声时间(15, 30, 45, 60 min)的提取效

表 4 样品中 5 种成分含量测定结果(mg / 片)
Tab. 4 Results of the content determination of five components
in samples (mg / tablet)

编号	生产企业	批号	5 种成分 总含量	编号	生产企业	批号	5 种成分 总含量
S1	安徽永生堂药业	200902	0.450 1	S39		22110331	0.745 6
S2	有限责任公司	201105	0.381 2	S40		22110631	0.759 4
S3		210701	0.686 8	S41		23010231	0.901 9
S4	大连辉仁制药	20220301	0.382 3	S42		23010161	0.776 6
S5	有限公司	20220302	0.390 1	S43	甘肃中天金丹药业	210401	0.319 7
S6		20220303	0.422 1	S44	有限公司	210601	0.319 0
S7		20220304	0.388 0	S45		211101	0.388 5
S8		20220305	0.368 1	S46		220106	0.423 3
S9	大连天山药业	210204	0.561 4	S47		220315	0.435 7
S10	有限公司	210606	0.537 7	S48		220401	0.457 1
S11		210901	0.785 2	S49		220502	0.433 7
S12		211009	0.715 9	S50		220612	0.394 9
S13		220303	0.894 7	S51		220802	0.436 2
S14		220403	0.854 8	S52		220907	0.478 1
S15		220412	0.708 8	S53		221010	0.504 5
S16		220414	0.734 2	S54		221204	0.506 8
S17		220802	0.532 0	S55		230302	0.611 0
S18		220805	0.533 7	S56		230110	0.611 0
S19		220806	0.516 2	S57	湖南安邦制药股份	220501	0.820 2
S20		220807	0.499 3	S58	有限公司	220801	0.623 7
S21		220811	0.615 5	S59		220101	0.824 8
S22		220812	0.511 8	S60		220701	0.343 2
S23		220901	0.552 9	S61		220703	0.385 9
S24		220902	0.538 4	S62	湖南德康制药股份	220902	0.414 7
S25		220905	0.708 9	S63	有限公司	220903	0.454 0
S26		220906	0.540 9	S64		221003	0.875 1
S27		221101	0.733 2	S65		221004	0.351 5
S28		221103	0.571 2	S66		221101	0.346 2
S29	福州闽海药业	21080261	0.322 9	S67	内蒙古蒙药股份有限公司	2105001	0.463 1
S30	有限公司	21100261	0.713 5	S68	内蒙古天奇中蒙制药	22101044	0.399 0
S31		22020321	0.807 2	S69	股份有限公司	22210015	0.412 5
S32		22050161	0.779 3	S70	山西德元堂药业	220601	0.910 1
S33		22070121	0.790 0	S71	有限公司	220602	0.905 6
S34		22070221	0.760 8	S72		220801	0.894 2
S35		22070321	0.785 2	S73		220901	0.708 6
S36		22080161	0.773 6	S74		221001	0.683 6
S37		22090161	0.739 1	$\bar{x}$			0.590 2
S38		22110231	0.771 4				

果,结果超声提取 30 min 时能基本提取完全,故最终选择超声提取 30 min。

3.3 含量限度确定

由于伤科跌打片处方中制大黄为酒大黄,参照

2020 年版《中国药典(一部)》大黄含量测定^[6]项下酒大黄的游离蒽醌限度为 0.5%,根据理论值及实测平均值,按 80% 转移率计算限度,暂定伤科跌打片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的总含量不得低于每片 0.24 mg。由表 4 可见,74 批样品中 5 种游离蒽醌总含量为每片 0.32 ~ 0.91 mg,平均为 0.59 mg,表明伤科跌打片质量整体良好。

3.4 方法评价

该方法操作简便快速、结果准确,可用于伤科跌打片的质量控制。

参考文献

[1] 王 梅. 名医验方大全[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2009:192.

[2] WS₃-B-3019-98, 卫生部药品标准: 中药成方制剂(第五册)[S].

[3] 姜春霞, 单淑敏, 张丽萍. HPLC 法测定伤科跌打片中大黄素大黄酚的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(11):1194.

[4] 卢 敏, 刘向前, 姚晓勃, 等. 伤科跌打片治疗创伤性软组织肿痛 385 例疗效观察[J]. 当代医师杂志, 1998, 3(4):48.

[5] 文秀云. 伤科跌打片薄层色谱鉴别研究[J]. 医学信息: 中旬刊, 2011, 24(8):3775-3776.

[6] 王 影, 秦玉华, 朱莉莉, 等. 伤科跌打片提取工艺实验研究[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(11):30-31.

[7] 樊省安, 马 越, 李妍怡. 伤科跌打片治疗感冒 1 例[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(30):128.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:257-258.

[9] 陈学艳, 魏文芝, 张敏娟, 等. UPLC 法同时测定复方龙胆碳酸氢钠片中 10 种大黄蒽醌类成分及土大黄苷的含量[J]. 中国药房, 2023, 34(21):2595-2600.

[10] 邵允欣, 尚 强, 郑文林. 基于 UPLC-UV-Q-TOF MS 的僵蚕嘌呤(核苷)类成分多指标定量指纹图谱研究[J]. 分析测试学报, 2023, 42(8):992-999.

[11] 李国强, 王运来, 周 敏, 等. 当归芍药散含药血浆 UPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2017, 48(19):4017-4023.

[12] 南俊伶, 王超众, 闫广利, 等. 山豆根药材 UPLC-UV 指纹图谱及 3 种成分含量测定研究[J]. 中南药学, 2022, 20(4):910-915.

[13] 唐 嵩, 赵琦琦, 孙 辉, 等. 三棱 UPLC-UV 特征图谱研究[J]. 中国现代中药, 2022, 24(6):1009-1017.

[14] 王伯昊, 李洪英, 李德坤, 等. UPLC-UV 法测定注射用益气复脉(冻干)中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁[J]. 药物评价研究, 2020, 43(8):1587-1591.

[15] 咎丹娅. 超高效液相色谱法在药物分析中的应用进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(30):189-190.

(收稿日期: 2024-02-19; 修回日期: 2024-11-20)