

[质 量]

HPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分

赵 迪， 周悌强， 张 蕾， 高宁宁， 李 柯
(河南中医药大学, 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定栀子金花丸(黄芩、大黄、栀子等)中黄芩苷、芦荟大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酸、大黄酚-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酚、大黄素-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素甲醚的含有量。**方法** 该药物甲醇-0.2% Na₂CO₃ 提取液的分析采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相甲醇-0.04% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 260 nm。**结果** 11 种成分在各自范围内线性关系良好($r > 0.999\ 0$), 平均加样回收率 98.13% ~ 99.50%, RSD 0.81% ~ 2.01%。**结论** 该方法简便灵敏, 重复性好, 可为用于栀子金花丸的质量控制。

关键词: 栀子金花丸; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)10-2194-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.015

Simultaneous determination of eleven constituents in Zhizi Jinhua Pills by HPLC

ZHAO Di, ZHOU Ti-qiang, ZHANG Lei, GAO Ning-ning, LI Ke
(Henan Provincial Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development, Henan Provincial Key Laboratory for Management of Respiratory Diseases with Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of baicalin, aloe-emodin-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside, aloe-emodin, rhein-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside, rhein, chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside, chrysophanol, emodin-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside, emodin, physcion-8-*O*- β -*D*-glucopyranoside and physcion in Zhizi Jinhua Pills (*Scutellariae Radix*, *Rhei Radix et Rhizoma*, *Gardeniae Fructus*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol-0.2% Na₂CO₃ extract of this drug was performed on a 25 $^{\circ}$ C thermostatic Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), with the mobile phase comprising of methanol-0.04% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 260 nm. **RESULTS** Eleven constituents showed good linear relationships within their own ranges($r > 0.999\ 0$), whose average recoveries were 98.13% – 99.50% with the RSDs of 0.81% – 2.01%. **CONCLUSION** This simple, sensitive and reproducible method can be used for the quality control of Zhizi Jinhua Pills.

KEY WORDS: Zhizi Jinhua Pills; chemical constituents; HPLC

栀子金花丸是由黄芩、大黄、栀子、黄连、黄柏、金银花、知母、天花粉 8 味药材组成的口服制剂, 临床上常用于口舌生疮、大便秘结等疾病^[1-3]。黄芩、大黄作为栀子金花丸中含有量较高的组分, 具有泻火、解毒、凉血、祛瘀之功效, 在发挥临床疗效中有较显著的作用, 故对其质量进行有效控制是保证该制剂质量的基础^[4-5], 其中黄芩苷为黄芩主要活性成分, 有着抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌、抗肿瘤等广泛的药理作用; 蒽醌类化合物是大黄主要活性成分, 游离蒽醌具有抗菌、抗病

收稿日期: 2018-03-19
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274179)
作者简介: 赵 迪(1986—), 女, 硕士, 实验师, 从事中药质量分析与新药研究。Tel: 15670636880, E-mail: zhaodiabcd@sina.com

毒等药理作用,而结合蒽醌与大黄致泻强度等有关,对用药安全有较大影响^[6-8]。查阅资料发现,关于栀子金花丸仅有针对性少量有效成分含量进行检测的报道^[9-11],故本实验采用 HPLC 法同时测定该制剂中黄芩苷及蒽醌类成分(芦荟大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄酸、大黄酚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄酚、大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄素甲醚)的含有量,以期为保证其质量稳定提供参考。

1 材料

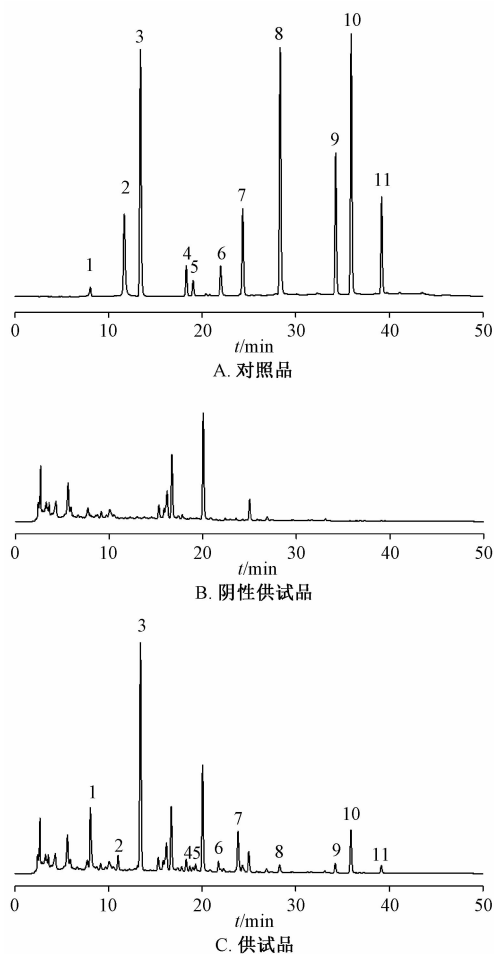
Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,配置 Waters 2695 Separations Module、Waters 2996 Photodiode Array Detector);XS105 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KH2200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。对照品芦荟大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号 13072901)购于上海纯化生物科技有限公司;大黄酸-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号 140315)、大黄酚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号 131212)、大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号 130822)、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号 131012)购于成都克洛玛生物科技有限公司;黄芩苷(批号 110715-200212)、芦荟大黄素(批号 110795-200507)、大黄酸(批号 110757-200206)、大黄酚(批号 110796-200714)、大黄素(批号 110756-200802)、大黄素甲醚(批号 110758-200508)购于中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯(美国 Grace 公司);磷酸为分析纯;水为娃哈哈纯净水。栀子金花丸购于西安天一秦昆制药有限公司(9 g/袋,批号 170107、170401、170708)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相甲醇(A)-0.04% 磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 35%~55% A; 10~30 min, 55%~65% A; 30~40 min, 65%~90% A; 40~50 min, 90% A);检测波长 260 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 25 $^{\circ}$ C。色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,甲醇稀释定容,再分别精密吸取适量置于量瓶中混合,甲醇稀释定容,得到贮备液,质量浓度分别为



1. 芦荟大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 2. 大黄酸-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 3. 黄芩苷 4. 大黄酚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 5. 大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 6. 大黄素甲醚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 7. 芦荟大黄素 8. 大黄酸 9. 大黄素 10. 大黄酚 11. 大黄素甲醚

1. aloe-emodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside 2. rhein-8-*O*- β -D-glucopyranoside 3. baicalin 4. chrysophanol-8-*O*- β -D-glucopyranoside 5. emodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside 6. physcion-8-*O*- β -D-glucopyranoside 7. aloe-emodin 8. rhein 9. chrysophanol 10. emodin 11. physcion

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

黄芩苷 741.96 μ g/mL、芦荟大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 13.02 μ g/mL、芦荟大黄素 55.92 μ g/mL、大黄酸-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 63.60 μ g/mL、大黄酸 198.72 μ g/mL、大黄酚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 25.44 μ g/mL、大黄酚 154.08 μ g/mL、大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 32.10 μ g/mL、大黄素 107.40 μ g/mL、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 88.20 μ g/mL、大黄素甲醚 129.60 μ g/mL,精密吸取适量,甲醇稀释定容,即得。

2.2.2 供试品溶液 称取丸剂适量,研细,混匀

后精密称取 2.00 g，加 50 mL 甲醇-0.2% Na₂CO₃ 溶液（80：20），称定质量，摇匀后浸泡 30 min，超声（200 W、40 kHz）20 min，混合溶剂补足减失的质量，上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性供试品溶液 按丸剂处方及制剂工艺制得缺大黄的阴性供试品，按“2.2.2”项下方法制备相应溶液，即得。

2.3 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴

性供试品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，各成分分离度良好，阴性供试品溶液相应位置无其他色谱峰，表明阴性无干扰，方法专属性良好。

2.4 线性关系考察 取“2.2.1”项下贮备液，稀释成不同质量浓度，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
黄芩苷	<i>Y</i> = 0.615 1 <i>X</i> + 0.966 7	0.999 9	6.183 ~ 741.9
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	<i>Y</i> = 14.309 <i>X</i> + 3.634 3	0.999 7	0.108 5 ~ 13.02
芦荟大黄素	<i>Y</i> = 26.18 <i>X</i> + 26.277	0.999 8	0.466 0 ~ 55.92
大黄酸-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	<i>Y</i> = 22.896 <i>X</i> + 43.083	0.999 2	0.530 0 ~ 63.60
大黄酸	<i>Y</i> = 21.439 <i>X</i> + 106.69	0.999 3	1.656 ~ 198.7
大黄酚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	<i>Y</i> = 19.132 <i>X</i> + 10.776	0.999 4	0.212 0 ~ 25.44
大黄酚	<i>Y</i> = 27.571 <i>X</i> + 93.372	0.999 4	1.284 ~ 154.1
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	<i>Y</i> = 7.724 <i>X</i> + 6.303 4	0.999 2	0.267 5 ~ 32.10
大黄素	<i>Y</i> = 21.99 <i>X</i> + 51.284	0.999 4	0.895 0 ~ 107.4
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	<i>Y</i> = 6.019 5 <i>X</i> + 11.634	0.999 4	0.735 0 ~ 88.20
大黄素甲醚	<i>Y</i> = 11.463 <i>X</i> + 36.264	0.999 1	1.080 ~ 129.6

2.5 稳定性试验 取供试品溶液（批号 170107）适量，于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得黄芩苷、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酸、大黄酚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酚、大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素甲醚含有量 RSD 分别为 2.97%、1.81%、1.10%、2.77%、0.88%、2.78%、1.86%、2.01%、0.97%、1.58%、1.13%，表明该方法稳定性良好。

2.6 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 6 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得黄芩苷、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酸、大黄酚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酚、大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 1.94%、1.68%、1.07%、0.99%、1.51%、2.01%、1.74%、1.97%、0.95%、1.76%，表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密称取丸剂（批号 170107）适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6

份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得黄芩苷、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酸、大黄酚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酚、大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素甲醚含有量 RSD 分别为 1.38%、1.18%、1.66%、0.88%、1.89%、1.73%、1.96%、2.34%、1.71%、2.03%、1.42%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的丸剂（批号 170107）6 份，每份约 1 g，精密加入对照品溶液 2 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，黄芩苷、芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酚、大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素甲醚平均回收率分别为 98.13%、99.48%、99.03%、98.69%、99.50%、99.26%、98.88%、98.78%、98.76%、98.80%、98.65%，RSD 分别为 2.01%、1.06%、1.05%、1.43%、0.94%、0.81%、1.06%、1.08%、0.99%、1.31%、1.30%。

2.9 样品含有量测定 取 3 批丸剂(批号 170107、170401、170708), 每批 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算含有量, 结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果 (μg/g, n=3)
Tab. 2 Results of content determination of various constituents (μg/g, n=3)

成分	批号		
	170107	170401	170708
黄芩苷	8 033. 57	8 326. 47	7 894. 33
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	20. 82	21. 62	19. 97
芦荟大黄素	126. 46	128. 87	122. 41
大黄酸-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	126. 49	129. 89	128. 32
大黄酸	325. 42	319. 27	331. 54
大黄酚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	48. 78	47. 31	49. 06
大黄酚	262. 54	269. 14	255. 24
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	77. 19	74. 25	78. 39
大黄素	254. 98	261. 88	268. 25
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	145. 33	152. 13	148. 64
大黄素甲醚	194. 31	188. 41	176. 38

3 讨论

梔子金花丸收载于 2015 年版《中国药典》一部, 但仅对其中梔子苷进行含有量控制。查阅文献发现, 针对大黄仅测定芦荟大黄素、大黄酸等游离蒽醌含有量, 而尚未涉及结合蒽醌, 难以全面反映该药材质量, 相关报道也较少, 研究表明其含有量与 大 黄 致 泻 作 用 相 关, 对 临 床 疗 效 有 较 大 影 响^[12-15]。本实验采用 HPLC 法同时测定梔子金花丸中 11 种成分的含有量, 包括黄芩苷、5 个游离蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚)、5 个结合蒽醌(芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷), 该方法简便快速, 灵敏度高, 重复性好, 可对大黄质量进行有效控制, 也能为该制剂质量标准建立提供参考依据。

由于蒽醌类成分含有酚羟基, 呈酸性, 故本实验选择 甲 醇-0. 2% Na₂CO₃ (80 : 20) 作为溶剂, 并通过超声法对待测成分进行提取, 发现回收率均高于 95%, 符合分析要求^[16-17]。黄芩苷在 280 nm 波长处有最大吸收, 而蒽醌类成分在 254 nm 处吸收较强, 故选择 260 nm 作为检测波长, 此时各成分峰形良好, 杂质峰较少。然后, 对 甲 醇-水、乙 腈-水、甲 醇-磷 酸 3 种 流 动 相 系 统 进 行 比 较, 发 现 以 甲 醇-0. 04% 磷 酸 梯 度 洗 脱 时, 基 线 平 稳, 各 成 分 分 离 度 较 好 (>1. 5), 阴 性 无 干 扰。

参考文献:

[1] 肖 娅, 刘喜纲. 梔子金花丸有效成分含量测定的研究进展[J]. 天津药学, 2016, 28(6): 53-56.

[2] 肖 娅, 刘喜纲, 魏翠娟. 不同厂家梔子金花丸中三种成分含量的比较和聚类分析[J]. 天津药学, 2017, 29(2): 10-13.

[3] 陈 威, 尹长江, 刘翠哲, 等. 测定梔子金花丸中三种成分的含量及梔子苷的溶出度[J]. 天津药学, 2015, 27(3): 4-6.

[4] 张慧林, 赵 妍. 大黄的药理作用及临床应用分析[J]. 光明中医, 2015, 30(5): 1119-1121.

[5] 苏增华. 大黄药理作用研究及思考[J]. 养生保健指南, 2016(24): 299.

[6] 冯素香, 王蒙蒙, 吴兆宇, 等. 大黄 5 种蒽醌类成分在大鼠肝微粒体中的代谢及酶促反应动力学[J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2015, 36(5): 383-391.

[7] 戴作波, 张建霞. HPLC 法测定自制降脂胶囊中大黄蒽醌衍生物的含量[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(4): 95-96.

[8] 曲 毅, 王伽伯, 李会芳, 等. 蒽醌类中药的致泻强度与化学含量相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 806-808.

[9] 陈晓虎, 苏 晶, 王 慧, 等. UPLC 法同时测定梔子金花丸中 11 种成分[J]. 中草药, 2014, 45(7): 955-959.

[10] 高旭东, 师永清, 陈士恩, 等. 双波长 HPLC 测定梔子金花丸中梔子苷、黄芩苷、盐酸小檗碱和大黄素的含量[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(3): 409-412.

[11] 肖 娅, 常金花, 薛禾菲, 等. 梔子金花丸中 3 种成分溶出度的比较[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2076-2080.

[12] 陈 帅, 王慧竹, 薛健飞, 等. 梔子金花丸 HPLC 指纹图谱及其与体外抗氧化活性的相关性分析[J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3077-3080.

[13] 邵 欣, 黄 雄, 温素素, 等. 大黄和梔子配伍研究[J]. 北方药学, 2016, 13(12): 115-116.

[14] 吴 育, 彭晓清, 姜晓燕, 等. 酒制对大黄中游离蒽醌在大鼠体内组织分布的影响[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1603-1608.

[15] 陈宇婷, 郭 彧, 苏润萍, 等. HPLC 法同时测定杞明片中五种蒽醌的含量[J]. 特产研究, 2017, 39(2): 59-62.

[16] 刘 佳, 李 莉, 胡会娟, 等. 不同道地产区大黄功效组分含量的差异分析[J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 662-669.

[17] 魏江存, 陈 勇, 谢 臻, 等. 中药大黄炮制品的化学成分及药效研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3569-3574.

[18] 王有森, 王智亮. HPLC 法同时测定大黄-黄连药材中 5 种蒽醌类成分的含量及最优配伍研究[J]. 中国药房, 2017, 28(34): 4818-4821.

[19] 冯素香, 王 哲, 郝 蕊, 等. HPLC 法同时测定不同产地掌叶大黄中 10 个蒽醌类化合物[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(5): 783-788.