

# HPLC 法同时测定乌金止痛丸中 5 种成分

李 燕<sup>1</sup>， 邓昭君<sup>2</sup>， 焦宝元<sup>3</sup>

(1. 上海金皮宝制药有限公司, 上海 200080; 2. 广州博济医药生物技术股份有限公司, 广东 广州 510000; 3. 广东太安堂药业股份有限公司, 广东 汕头 515064)

**摘要:** **目的** 建立 HPLC 法同时测定乌金止痛丸(大黄、当归、香附等)中 5 种成分的含有量。**方法** 该药物 50% 乙醇提取液的分析采用 Amethyst C<sub>18</sub>-H 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.05% 三氟乙酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm。**结果** 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别在 0.805 4~80.540 1、0.815 3~81.525 3、0.822 2~82.217 1、0.859 5~85.954 8、0.382 5~38.253 6 μg/mL 范围内线性关系良好( $r=0.999\ 9$ ), 平均加样回收率分别为 94.31%、96.77%、101.14%、91.64%、97.27%, RSD 分别为 3.66%、3.91%、1.84%、3.99%、1.69%。**结论** 该方法准确, 重复性好, 可用于乌金止痛丸的质量控制。

**关键词:** 乌金止痛丸; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; HPLC

**中图分类号:** R927.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2018)12-2681-04

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.014

# Simultaneous determination of five constituents in Wujin Zhitong Pills by HPLC

LI Yan<sup>1</sup>, DENG Zhao-jun<sup>2</sup>, JIAO Bao-yuan<sup>3</sup>

(1. Shanghai Jinpibao Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200080, China; 2. Guangzhou Boji Medical Biotechnological Co., Ltd., Guangzhou 510000, China; 3. Guangdong Taiantang Pharmaceutical Co., Ltd., Shantou 515064, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of five constituents in Wujin Zhitong Pills (*Rhei Radix et Rhizoma*, *Angelicae sinensis Radix*, *Cyperi Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% ethanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Amethyst C18-H column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.05% trifluoroacetic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 254 nm. **RESULTS** Aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion showed good linear relationships within the ranges of 0.805 4–80.540 1, 0.815 3–81.525 3, 0.822 2–82.217 1, 0.859 5–85.954 8, 0.382 5–38.253 6 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), whose average recoveries were 94.31%, 96.77%, 101.14%, 91.64%, 97.27% with the RSDs of 3.66%, 3.91%, 1.84%, 3.99%, 1.69%, respectively. **CONCLUSION** This accurate and reproducible method can be used for the quality control of Wujin Zhitong Pills.

**KEY WORDS:** Wujin Zhitong Pills; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion; HPLC

乌金止痛丸由大黄、当归、香附、苏木、益母草、僵蚕、黑豆、乌药、五灵脂、延胡索、莪术、桃仁、红花、木香、乳香、肉桂、没药 17 味药材组成, 能活血化瘀, 行气止痛, 临床上用于产后瘀血不清、腹痛腰痛、胸胁刺痛<sup>[1]</sup>, 但目前其质量标准中无含有量测定项。方中大黄为君药, 具有清热解毒、消积化瘀止血的功效, 其主要活性成分为

蒽醌, 其中芦荟大黄素具有抑菌和抗病毒作用<sup>[2-6]</sup>; 大黄素和大黄酸具有抑菌抗炎作用<sup>[2-6]</sup>; 大黄酚在体内氧化为大黄素和大黄酸, 可增强两者作用<sup>[2-3]</sup>; 大黄酚和大黄素甲醚均具有止血作用<sup>[3,5]</sup>。因此, 本实验以大黄中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为指标, 在前期报道和查阅文献基础上<sup>[7-13]</sup>, 建立 HPLC 方法同

收稿日期: 2018-04-19  
作者简介: 李 燕 (1977—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药研究与开发工作。Tel: 13661572917, E-mail: 13661572917@163.com

时测定乌金止痛丸中上述 5 种成分的含有量，为其质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；KQ-500DE 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；

1.2 试药 芦荟大黄素（批号 110795-201609，含有量 98.1%）、大黄酸（批号 110757-201607，含有量 99.3%）、大黄素（批号 110756-201512，含有量 98.7%）、大黄酚（批号 110796-201319，含有量 99.6%）、大黄素甲醚（批号 110758-201616，含有量 99.0%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、三氟乙酸为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为纯净水。乌金止痛丸（6.3 g/丸，广东宏兴集团股份有限公司宏兴制药厂，批号 B20170501）

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚各 16 μg，大黄素甲醚 8 μg 的溶液，即得。

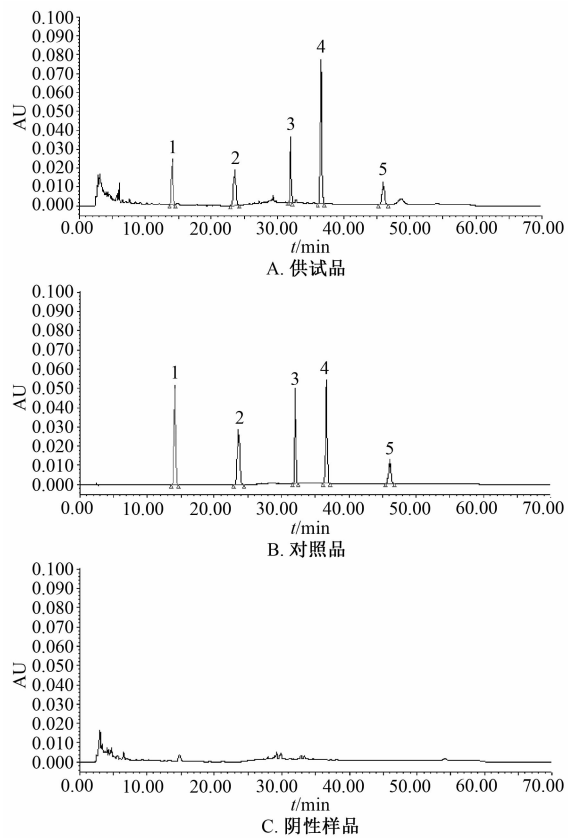
2.2 供试品溶液制备 取丸剂适量，与硅藻土按 3：1 比例混合，粉碎，精密称取 2 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50% 乙醇 50 mL，称定质量，85 ℃ 加热回流 1 h，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 10 mL 置于锥形瓶中，回收溶剂，加 3 mol/L 盐酸 10 mL，超声 2 min，加入三氯甲烷 30 mL，水浴回流 1 h，放冷，置于分液漏斗中，少量三氯甲烷洗涤容器，并入分液漏斗中，分取三氯甲烷层，酸液再用三氯甲烷洗涤 3 次，每次 20 mL，合并三氯甲烷液，回收溶剂，残渣加甲醇溶解稀释，并转移至 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.3 阴性样品溶液制备 按处方比例及工艺制备缺大黄阴性样品，按“2.2”项下方法制备，即得。

2.4 色谱条件与系统适用性试验 Amethyst C<sub>18</sub>-H 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲醇（A）-0.05% 三氟乙酸（B），梯度洗脱（0～20 min，63% A；20～25 min，63%→79% A；25～55 min，79% A；55～60 min，79%→63% A；60～70 min，63% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 254 nm；进样量 10 μL。理论塔

板数均大于 3 000，各成分色谱峰与相邻峰的分离度均大于 1.5。

2.5 专属性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL，在“2.4”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，供试品、对照品在相同保留时间处均有色谱峰，待测成分与其他成分分离度良好，阴性无干扰。



1. 芦荟大黄素 2. 大黄酸 3. 大黄素 4. 大黄酚 5. 大黄素甲醚

1. aloe-emodin 2. rhein 3. emodin 4. chrysophanol 5. physcion

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.6 线性关系考察 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品，加甲醇制成质量浓度分别为 80.540 1、81.525 3、82.217 1、85.954 8、38.235 6 μg/mL 的贮备液，精密吸取 20、10、5、2、1 mL 至 100 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，即得系列质量浓度对照品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标（Y），溶液质量浓度为横坐标（X）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	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$r$
芦荟大黄素	$Y = 50\,712.861\,1X - 8\,086.431\,0$	0.805 4 ~ 80.540 1	0.999 9
大黄酸	$Y = 42\,170.352\,8X + 2\,132.265\,0$	0.815 3 ~ 81.525 3	0.999 9
大黄素	$Y = 37\,750.943\,3X - 1\,648.059\,1$	0.822 2 ~ 82.217 1	0.999 9
大黄酚	$Y = 52\,037.054\,4X - 582.624\,3$	0.859 5 ~ 85.954 8	0.999 9
大黄素甲醚	$Y = 36\,018.367\,6X + 2\,263.088\,2$	0.382 5 ~ 38.253 6	0.999 9

2.7 中间精密度试验 同一实验室不同人员采用不同品牌仪器,取丸剂(批号 B20170501),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.4”项色谱条件下进样测定,测得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含有量中间精密度 RSD 分别为 3.99%、3.80%、1.55%、3.99%、2.08%,说明该方法中间精密度良好。

2.8 稳定性试验 取丸剂(批号 B20170501),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,于 0、6、12、20、27 h 在“2.4”项色谱条件下进样测定,测得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 0.82%、0.34%、0.48%、0.28%、0.57%,表明溶液在 27 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一丸剂(批号 B20170501),按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在“2.4”项色谱条件下进样测定,测得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 3.82%、3.63%、1.24%、2.63%、2.03%,表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取含有量已知的丸剂(批号 B20170501)与硅藻土按 3:1 比例混合粉碎的粉末 1 g,共 6 份,置于具塞锥形瓶中,精密加入含有芦荟大黄素 8.056  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄酸 10.192  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄素 10.464  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄酚 25.444  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、大黄素甲醚 6.696  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品溶液 25 mL,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.4”项色谱条件下进样测定,结果见表 2。

2.11 样品含有量测定 取丸剂 6 批,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.4”项色谱条件下进样测定,外标法计算含有量,结果见表 3。

3 讨论

3.1 流动相筛选 本实验考察了甲醇-磷酸、乙腈-磷酸、甲醇-三氟乙酸、乙腈-三氟乙酸流动相,发现甲醇-0.05% 三氟乙酸洗脱时色谱峰峰型和分离效果均比较理想,故选择其作为流动相。

表 2 各成分加样回收率试验结果 ( $n=6$ )

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents ( $n=6$ )						
组分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率% (RSD/%)
芦荟大黄素	1.006 5	0.178 1	0.201 4	0.363 0	91.81	94.31
	1.016 8	0.179 9	0.201 4	0.370 2	94.49	(3.66)
	1.023 1	0.181 0	0.201 4	0.377 5	97.57	
	0.954 7	0.168 9	0.201 4	0.347 6	88.73	
	1.040 7	0.184 1	0.201 4	0.377 3	95.93	
大黄酸	1.065 4	0.188 5	0.201 4	0.384 5	97.32	
	1.006 5	0.252 2	0.254 8	0.502 7	98.31	96.77
	1.016 8	0.254 8	0.254 8	0.486 0	90.74	(3.91)
	1.023 1	0.256 4	0.254 8	0.498 9	95.17	
	0.954 7	0.239 2	0.254 8	0.498 5	101.77	
大黄素	1.040 7	0.260 8	0.254 8	0.504 9	95.80	
	1.065 4	0.267 0	0.254 8	0.518 8	98.82	
	1.006 5	0.277 6	0.261 6	0.541 2	100.76	101.14
	1.016 8	0.280 4	0.261 6	0.536 7	97.97	(1.84)
	1.023 1	0.282 1	0.261 6	0.551 5	102.98	
大黄酚	0.954 7	0.263 3	0.261 6	0.532 4	102.87	
	1.040 7	0.287 0	0.261 6	0.552 8	101.61	
	1.065 4	0.293 8	0.261 6	0.557 1	100.65	
	1.006 5	0.606 5	0.636 1	1.215 1	95.68	91.64
	1.016 8	0.612 7	0.636 1	1.178 0	88.87	(3.99)
大黄素甲醚	1.023 1	0.616 5	0.636 1	1.162 4	85.82	
	0.954 7	0.575 3	0.636 1	1.172 3	93.85	
	1.040 7	0.627 1	0.636 1	1.212 2	91.98	
	1.065 4	0.642 0	0.636 1	1.237 7	93.65	
	1.006 5	0.174 4	0.167 4	0.335 0	95.94	97.27
	1.016 8	0.176 2	0.167 4	0.336 7	95.88	(1.69)
	1.023 1	0.177 3	0.167 4	0.339 1	96.65	
	0.954 7	0.165 4	0.167 4	0.333 1	100.18	
	1.040 7	0.180 3	0.167 4	0.342 4	96.83	
	1.065 4	0.184 6	0.167 4	0.348 9	98.15	

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g)					
批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
C180101	0.150 3	0.190 2	0.235 5	0.554 6	0.158 4
C180102	0.161 5	0.197 4	0.246 1	0.592 6	0.165 0
C180103	0.153 0	0.190 6	0.232 7	0.568 8	0.157 9
B180101	0.210 7	0.269 0	0.325 3	0.760 7	0.215 0
B180102	0.217 5	0.280 8	0.337 9	0.785 5	0.221 7
B180103	0.210 3	0.277 8	0.332 3	0.773 8	0.217 1

3.2 柱温筛选 本实验考察了柱温 25、30、35 ℃ 对分离效果的影响,发现 25 ℃ 时芦荟大黄素色谱峰中包裹杂质峰,35 ℃ 时芦荟大黄素、大黄素色谱峰峰形较差,30 ℃ 时各成分色谱峰和分离度均较好,故选择 30 ℃ 作为柱温。

3.3 提取方法筛选 本实验考察了回流提取、超声提取对提取率的影响,发现前者效率更高,故选择该方法提取;考察了提取溶剂甲醇、乙醇对提取率的影响,发现前者提取效率更高,故选择其作为提取溶剂;考察了提取时间 30、60、120 min 对提取率的影响,发现 60、90 min 时提取率相近,均高于 30 min 时,故选择 60 min 作为提取时间;考察了提取溶剂体积对提取率的影响,发现 25、50 mL 时芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚提取率无显著差异,但 50 mL 时大黄酸提取率更高,故选择其作为提取溶剂体积。

3.4 水解及萃取方法筛选 本实验考察了 1、2、3 mol/L 盐酸对提取率的影响,发现 2、3 mol/L 时总蒽醌提取率高于 1 mol/L,3 mol/L 时大黄酚、大黄素甲醚提取率高于 2 mol/L,故选择 3 mol/L 盐酸溶液作为水解溶剂;考察了萃取溶剂二氯甲烷、三氯甲烷、乙醚对提取率的影响,发现三氯甲烷提取率较高,故选择其作为萃取溶剂;考察了萃取次数对提取率的影响,发现萃取 2、3、4 次提取率无显著差异,考虑到萃取的充分性,选择萃取 3 次。

3.5 耐用性试验 本实验考察了体积流量 0.8、1.0、1.2 mL/min 时的色谱峰情况,发现在各体积流量下各成分色谱峰分离度均较好,其含有量 RSD 均小于 4%。再应用 Amethyst C<sub>18</sub>-H(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、GL InertSustain C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱测定同一供试品溶液,发

现各成分分离度均大于 1.5,其含有量 RSD 均小于 4%,表明该方法耐用性良好。

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 (中药成方制剂第二十册) [S]. 1998.

[ 2 ] 张向红,程黎晖. 大黄的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(21): 76-78.

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

[ 4 ] 李 敏,李丽霞,刘 渝,等. 大黄研究进展[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2006, 8(4): 34-39.

[ 5 ] 李 娟,李 坚. 大黄药理作用研究及临床应用概况[J]. 实用医药杂志, 2006, 23(9): 1132-1134.

[ 6 ] 庄江能. 大黄的主要成分及其临床药理研究进展[J]. 西南军医, 2009, 11(5): 931-933.

[ 7 ] 卢爱莲. 乌金止痛丸中大黄的质量标准[J]. 海峡药学, 2013, 25(1): 69-71.

[ 8 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 23-24.

[ 9 ] 颜永刚,尹立敏,王红艳,等. HPLC 法同时测定大黄炮制品中 10 种化学成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(27): 3839-3842.

[10] 李 莉,宋俊骊,王志梅,等. 高效液相色谱法同时测定九制大黄丸中 5 组分含量[J]. 中国药业, 2015, 24(5): 34-36.

[11] 余积聪,李俊健,吴永成,等. RP-HPLC 法测定小儿清热片中 5 种蒽醌类成分含量[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(5): 510-513.

[12] 张 琳,张宝琦,王志轩,等. HPLC 法同时测定大鼠体内 5 种大黄蒽醌类化合物[J]. 中成药, 2016, 38(3): 594-599.

[13] 王 婷,童荣生,邹 静,等. 高效液相色谱法测定理气复胃口服液中大黄成分的含量[J]. 实用医院临床杂志, 2016, 13(4): 111-113.