

# 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 °C; 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 ( $r = 0.9999$ ), 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 °C thermostatic Amethyst C<sub>18</sub>-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** Aloë-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 ( $r = 0.9999$ ), 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; aloë-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, 临幊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

时测定乌金止痛丸中上述5种成分的含量，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。

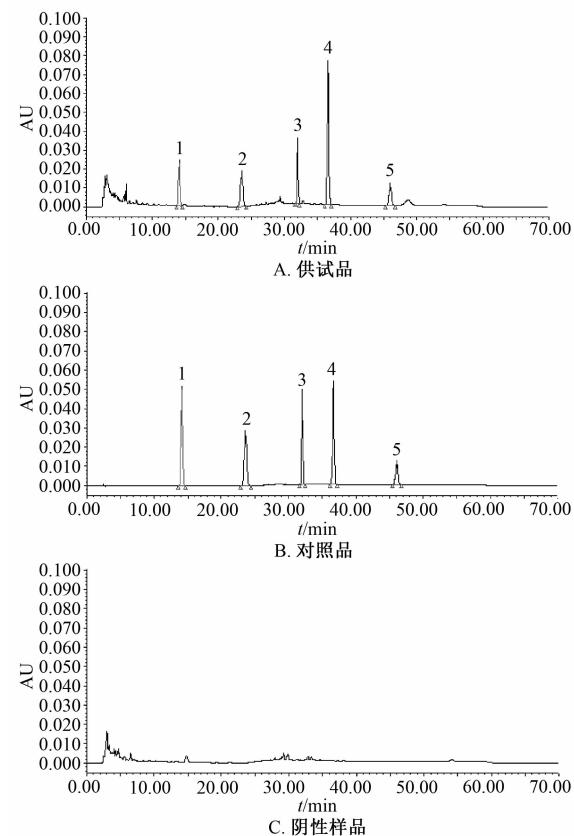
2.2 供试品溶液制备 取丸剂适量，与硅藻土按 3:1 比例混合，粉碎，精密称取 2 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50% 乙醇 50 mL，称定质量，85 ℃ 加热回流 1 h，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密量取续滤液 10 mL 置于锥形瓶中，回收溶剂，加 3 mol/L 盐酸 10 mL，超声 2 min，加入三氯甲烷 30 mL，水浴回流 1 h，放冷，置于分液漏斗中，少量三氯甲烷洗涤容器，并入分液漏斗中，分取三氯甲烷层，酸液再用三氯甲烷洗涤 3 次，每次 20 mL，合并三氯甲烷液，回收溶剂，残渣加甲醇溶解稀释，并转移至 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，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	$Y = 50712.8611X - 8086.4310$	0.8054 ~ 80.5401	0.9999
大黄酸	$Y = 42170.3528X + 2132.2650$	0.8153 ~ 81.5253	0.9999
大黄素	$Y = 37750.9433X - 1648.0591$	0.8222 ~ 82.2171	0.9999
大黄酚	$Y = 52037.0544X - 582.6243$	0.8595 ~ 85.9548	0.9999
大黄素甲醚	$Y = 36018.3676X + 2263.0882$	0.3825 ~ 38.2536	0.9999

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/原有量/加入量/测得量/回收率/率%					(RSD/%)
	g	mg	mg	mg	%	
芦荟大黄素	1.0065	0.1781	0.2014	0.3630	91.81	94.31
	1.0168	0.1799	0.2014	0.3702	94.49	(3.66)
	1.0231	0.1810	0.2014	0.3775	97.57	
	0.9547	0.1689	0.2014	0.3476	88.73	
	1.0407	0.1841	0.2014	0.3773	95.93	
	1.0654	0.1885	0.2014	0.3845	97.32	
大黄酸	1.0065	0.2522	0.2548	0.5027	98.31	96.77
	1.0168	0.2548	0.2548	0.4860	90.74	(3.91)
	1.0231	0.2564	0.2548	0.4989	95.17	
	0.9547	0.2392	0.2548	0.4985	101.77	
	1.0407	0.2608	0.2548	0.5049	95.80	
	1.0654	0.2670	0.2548	0.5188	98.82	
大黄素	1.0065	0.2776	0.2616	0.5412	100.76	101.14
	1.0168	0.2804	0.2616	0.5367	97.97	(1.84)
	1.0231	0.2821	0.2616	0.5515	102.98	
	0.9547	0.2633	0.2616	0.5324	102.87	
	1.0407	0.2870	0.2616	0.5528	101.61	
	1.0654	0.2938	0.2616	0.5571	100.65	
大黄酚	1.0065	0.6065	0.6361	1.2151	95.68	91.64
	1.0168	0.6127	0.6361	1.1780	88.87	(3.99)
	1.0231	0.6165	0.6361	1.1624	85.82	
	0.9547	0.5753	0.6361	1.1723	93.85	
	1.0407	0.6271	0.6361	1.2122	91.98	
	1.0654	0.6420	0.6361	1.2377	93.65	
大黄素甲醚	1.0065	0.1744	0.1674	0.3350	95.94	97.27
	1.0168	0.1762	0.1674	0.3367	95.88	(1.69)
	1.0231	0.1773	0.1674	0.3391	96.65	
	0.9547	0.1654	0.1674	0.3331	100.18	
	1.0407	0.1803	0.1674	0.3424	96.83	
	1.0654	0.1846	0.1674	0.3489	98.15	

表3 各成分含有量测定结果( $\text{mg}/\text{g}$ )Tab. 3 Results of content determination of various constituents ( $\text{mg}/\text{g}$ )

批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
C180101	0.1503	0.1902	0.2355	0.5546	0.1584
C180102	0.1615	0.1974	0.2461	0.5926	0.1650
C180103	0.1530	0.1906	0.2327	0.5688	0.1579
B180101	0.2107	0.2690	0.3253	0.7607	0.2150
B180102	0.2175	0.2808	0.3379	0.7855	0.2217
B180103	0.2103	0.2778	0.3323	0.7738	0.2171

**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大黄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.