

· 研究报告 ·

## HPLC法测定硝矾洗剂中大黄总蒽醌的含量

黄娟<sup>1</sup>, 张庆莲<sup>1</sup>, 皮凤娟<sup>1</sup>, 张世波<sup>1</sup>, 赵领<sup>2</sup>, 刘浩<sup>2</sup> (1. 泸州市中医医院药剂科, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学药学院药剂学教研室, 四川 泸州 646000)

**[摘要]** 目的 建立硝矾洗剂中大黄总蒽醌的含量测定方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Kromasil 100-5C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 0.1% 磷酸-甲醇 (15:85), 柱温: 30 °C, 检测波长: 254 nm。结果 芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚的线性关系良好, 样品平均回收率为 99.45%, RSD 为 1.68%。结论 所建方法简便、快速、准确, 适用于硝矾洗剂的质量控制。

**[关键词]** 硝矾洗剂; 高效液相色谱; 总蒽醌

**[中图分类号]** R284.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2017)05-0441-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.013

## Determination of total anthraquinones in Xiaofan lotion by HPLC method

HUANG Juan<sup>1</sup>, ZHANG Qinglian<sup>1</sup>, PI Fengjuan<sup>1</sup>, ZHANG Shibao<sup>1</sup>, ZHAO Ling<sup>2</sup>, LIU Hao<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Luzhou TCM Hospital, Luzhou 646000, China; 2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a method for the determination of total anthraquinones in Xiaofan lotion by HPLC. **Methods** Rhubarb anthraquinones were simultaneously separated and assayed on a Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of 0.1% phosphoric acid-methanol (15:85) at 30 °C. The detection wavelength was 207 nm. **Results** The linear relationship is good for Aloe-emodin and other five standard ingredients. The average recovery was 99.45%, RSD 1.68%. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate. It is suitable for determination of total anthraquinones in Xiaofan lotion.

**[Key words]** Xiaofan lotion; HPLC; total anthraquinone

硝矾洗剂是在泸州市中医医院名老中医多年临床经验总结出来的组方基础上开发的纯中药制剂, 由大黄、芒硝、白矾等六味中药组成, 具有清热解毒、消肿止痛、收湿止痒的功效, 用于湿热下注引起的内外痔、混合痔、肛裂、肛门湿疹、肛窦炎等, 经过 10 余年的临床应用, 效果良好。方中大黄为君药, 具有泻下攻积、凉血解毒、清热泻火、逐瘀通经的功效, 主要成分为芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚等蒽醌类化合物。为了有效控制该制剂质量, 笔者采用 HPLC 法测定大黄总蒽醌的含量, 以期为该制剂中有效成分的测定及其质量控制提供评价方法。

### 1 材料

#### 1.1 仪器 戴安 UltiMate-3000 自动进样高效液

相色谱仪, 包括四元泵、紫外检测器、自动进样器等; 电子天平 FA2004; AP-01P 真空泵 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司), KQ-100E 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: 110795-201007), 大黄酚 (批号: 110796-201017), 大黄酸 (批号: 110757-200206), 大黄素 (批号: 110756-200110) 及大黄素甲醚 (批号: 110758-201013) 等对照品均购自成都蓉兴医药科技开发有限公司。硝矾洗剂为本院制剂室自制 (批号: 20141001、20141002、20141003); 大黄、黄柏、白矾药材 (泸州天植中药饮片有限公司), 冰片 (四川青神康华制药有限公司), 芒硝 (四川新荷花中药饮片股份有限公司), 以上药材经全检均符合《中华人民共和国药典》(2015 年版, 简称《药典》) 有关规定; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件<sup>[1]</sup> 色谱柱: Kromasil 100-5C<sub>18</sub> 柱

**[作者简介]** 黄娟, 主管中药师, 硕士研究生, 研究方向: 医院制剂研究. Email: huangjuan-2008.ok@163.com

**[通讯作者]** 赵领, 教授, 研究方向: 新型药物递送系统与临床药学. Email: zhaoling-998@163.com

(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 流动相: 0.1% 磷酸-甲醇 (15 : 85); 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 ml/min; 理论塔板数按大黄总蒽醌峰计算, 应不低于 3 000。

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液<sup>[1,2]</sup>** 精密称取芦荟大黄素对照品 (5.01 mg)、大黄素对照品 (5.23 mg)、大黄酸对照品 (5.25 mg)、大黄酚对照品 (5.79 mg)、大黄素甲醚对照品 (5.28 mg), 分别置于 50 ml 的棕色容量瓶中, 加甲醇分别制成每 1 ml 含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 100.2、105.0、104.6、115.8、52.8 μg 的溶液; 精密量取上述对照品溶液各 2 ml, 混匀, 即得 (每 1 ml 中分别含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚 20.04、21.00、20.92、23.16 μg, 含大黄素甲醚 10.56 μg)。

**2.2.2 供试品溶液<sup>[1,3]</sup>** 参照《药典》一部“大黄”项下含量测定方法, 精密量取成品 (批号: 20141002) 5 ml, 置具塞锥形瓶中, 水浴挥干, 精密加入甲醇 25 ml, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 ml, 置烧瓶中, 置 80 °C 水浴中加热挥去溶剂, 加盐酸溶液 (22→100) 10 ml, 超声处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 ml, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 ml, 合并三氯甲烷液于蒸发皿中, 水浴挥干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.3 阴性对照溶液** 按照硝磺洗剂工艺制备缺大黄的阴性供试品, 按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

**2.2.4 测定方法** 取供试品溶液, 精密量取 5 ml, 置 100 ml 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 即得。

**2.3 系统适用性考察<sup>[3]</sup>** 精密吸取大黄混合对照品溶液 10 μl, 按上述色谱条件进样, 重复 5 次, 测定, 记录色谱图。结果表明, 在该色谱条件下, 各组分分离度良好, 出峰先后顺序为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。各色谱峰中主成分峰分离度均大于 1.5, 对称因子均在 0.95~1.05 之间, 理论塔板数以大黄总蒽醌峰计算不低于 3 000。

**2.4 专属性考察** 精密吸取大黄混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μl, 按上述色谱条

件测定。阴性溶液在 5 种成分峰位处均无干扰 (图 1), 证明该方法具有良好的专属性。

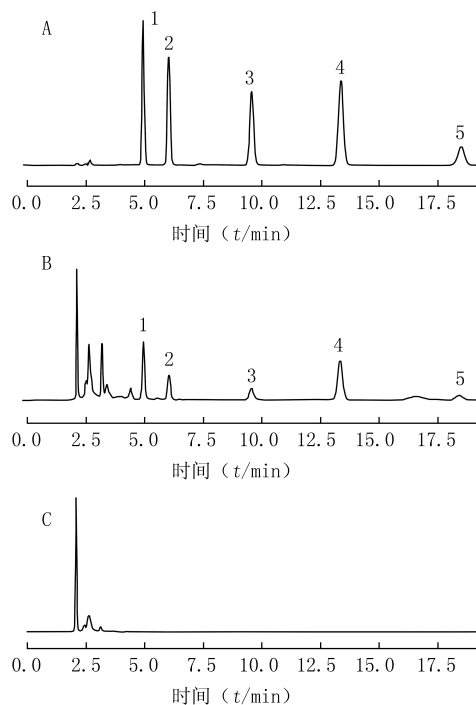


图 1 硝磺洗剂的 HPLC 图

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

**2.5 线性关系考察** 精密吸取对照品溶液 1、2、4、8、10、16、20 μl, 按照上述条件注入, 测定, 以进样量为横坐标 ( $X/\text{mg}$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 进行线性回归, 回归方程见表 1。

表 1 对照品线性关系考察结果

对照品名称	回归方程	相关系数 $r$	线性范围 ( $m/\mu\text{g}$ )
芦荟大黄素	$Y=76.957X-0.0139$	1.000 0	0.020 04~0.400 8
大黄酸	$Y=67.098X-0.0419$	1.000 0	0.021 00~0.420 0
大黄素	$Y=65.599X-0.0836$	1.000 0	0.020 92~0.418 4
大黄酚	$Y=85.901X-0.0792$	1.000 0	0.023 16~0.463 2
大黄素甲醚	$Y=57.417X-0.0443$	1.000 0	0.010 56~0.211 2

**2.6 精密度试验<sup>[4]</sup>** 精密吸取大黄总蒽醌混合对照品溶液 10 μl, 重复进样 6 次, 测定, 计算峰面积, 其 RSD 分别为芦荟大黄素 0.29%、大黄酸 0.30%、大黄素 0.32%、大黄酚 0.33%、大黄素甲醚 0.35%, 表明仪器的精密度良好。

**2.7 重复性试验<sup>[4]</sup>** 取样品 (批号: 20141002) 制备 6 份供试品溶液, 分别进样 10 μl; 同时取大黄总蒽醌混合对照品溶液 (0.095 68 mg/ml) 10 μl 进样, 按

外标法测定含量,计算 RSD 均小于 2%,表明重复性良好。

**2.8 稳定性考察**<sup>[4]</sup> 取供试品溶液(批号:20141002),于室温下放置,在不同时间点(0、2、4、6、8 h)分别精密吸取 10  $\mu$ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,计算 RSD 均小于 2%,结果表明,供试品溶液在室温下放置 8 h 基本稳定。

**2.9 加样回收率试验** 精密量取硝矾洗剂(批号:20141002)5 ml,共 6 份,分别置于具塞锥形瓶中,依次精密加入浓度为 0.100 2 mg/ml 芦荟大黄素对照品储备液 9 ml,浓度为 0.105 0 mg/ml 大黄酸对照品储备液 8 ml,浓度为 0.104 6 mg/ml 大黄素对照品储备液 3.5 ml,浓度为 0.115 8 mg/ml 大黄酚对照品储备液 7 ml,浓度为 0.052 8 mg/ml 大黄素甲醚对照品储备液 6 ml。按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,取样注入液相色谱仪,测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 硝矾洗剂回收率试验结果

供试品含量(mg/ml)	加入对照品量(mg/ml)	测得量(mg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
3.493 5	3.235 3	6.619 2	96.61	99.45	1.68
3.493 5	3.235 3	6.749 0	100.62		
3.493 5	3.235 3	6.681 4	98.53		
3.493 5	3.235 3	6.742 1	100.41		
3.493 5	3.235 3	6.764 2	101.09		
3.493 5	3.235 3	6.710 4	99.43		

**2.10 耐用性试验** 精密吸取供试品溶液 5 ml,分别改变温度( $\pm 5$   $^{\circ}$ C)、波长( $\pm 5$  nm)、流动相比比例( $\pm 5\%$ ),注入色谱仪,进行耐用性试验,结果其 RSD 均小于 1%,表明该方法耐用性良好。

**2.11 样品含量测定** 精密吸取供试品溶液 10  $\mu$ l,按照上述建立的含量测定方法,测定 3 个批次的样品含量,结果见表 3。

表 3 硝矾洗剂的含量测定结果(mg/ml)

批号	含量
20141001	0.69
20141002	0.73
20141003	0.77

### 3 讨论

**3.1 方剂的理论基础** 硝矾洗剂方是在传统中医

药理论基础上,根据痔疮“湿热与淤滞相搏,气血结滞”的病机,采用清热燥湿、消肿止痛为治则筛选药物而制成的。临床主要用于痔疮熏洗坐浴和痔疮术后恢复,已有 10 余年历史,成功治疗数以万计的痔疮患者,且疗效显著,没有明显的过敏反应和其他毒副作用。

**3.2 含测成分的选择** 硝矾洗剂为中药复方制剂,成分复杂、干扰多,故含量测定指标成分的选择是质量控制的关键。大黄作为硝矾洗剂的君药,主要具有止血、抗菌、利尿、泻下等作用,蒽醌类成分为其主要有效成分<sup>[5]</sup>。参考文献[6-8],多数研究在进行大黄含量测定时,仅选择其部分蒽醌成分进行测定。本研究为了更好地控制制剂质量,参照《药典》“大黄”项下含量测定方法,采用 HPLC 法同时测定大黄的 5 种蒽醌成分,以总蒽醌含量作为含量测定指标。因其样品处理方法步骤多、较复杂,为避免因操作导致结果的偏倚,研究的同时制订了详细的标准操作规程(SOP),对实验人员进行了多次培训,确保含量测定结果的准确性。

**3.3 流动相的选择** 预实验结果显示,在甲醇-0.1% 磷酸溶液体系下各成分有较好的分离。为更优化该色谱条件,研究小组对该体系下不同比例进行了考察,最终确定在甲醇-0.1% 磷酸(85:15)时,各峰分离度最好,峰响应值达到要求,故而确定此流动相比比例。

### 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2015 年版(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 李奇娟,胡慧玲,王战国,等.四川栽培和野生型大黄五种蒽醌类成分的含量对比研究[J].中药与临床,2016,7(1):4-7.
- [3] 夏从龙,周浓,种佳.HPLC 测定不同厂家牛黄消炎片中 5 种蒽醌类衍生物的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):83-86.
- [4] 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.
- [5] 黄娟,张庆莲,皮凤娟,等.大黄的药理作用研究进展[J].中国医院用药评价与分析,2014,14(3):282-284.
- [6] 李嘉华,冯小映,林静吟,等.复方桑忍外洗颗粒质量标准研究[J].中药材,2015,38(4):844-846.
- [7] 陈勇.八正胶囊的质量标准研究[J].中国生化药物杂志,2015,36(3):179-182.
- [8] 秦黎明,李启彬.HPLC 法同时测定利胆排石片中 4 种蒽醌类成分的含量探索[J].中国实用医药,2015,10(31):285-286.

[收稿日期] 2017-02-06 [修回日期] 2017-05-31

[本文编辑] 李睿曼