

HPLC 法测定夏黄颗粒中芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚

尚海花¹, 肖瑞颖², 王 淼³, 郑雅楠³, 廖茂梁^{1,3*}

1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

2. 天津中医药大学, 天津 300193

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定夏黄颗粒中芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长 254 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样体积 20 μL。结果 芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别在 23.8~238.4、22.8~228.0、25.8~228.0、78.7~787.2、16.7~167.2、16.6~166.4、17.5~175.2 μg 线性关系良好; 平均加样回收率分别为 99.78%、99.36%、99.71%、98.65%、99.37%、99.42%、98.78%, RSD 值分别为 1.88%、2.05%、2.03%、2.01%、2.56%、2.35%、2.17%。结论 本法快速、简便、准确, 可用于夏黄颗粒的质量控制。

关键词: 夏黄颗粒; 芦荟大黄素; 大黄酸; 厚朴酚; 和厚朴酚; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)09-2178-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.09.005

Determination of aloe-emodin, rhein, honokiol, emodin, magnolol, chrysophanol, and physcion in Xiahuang Granule by RP-HPLC

SHANG Hai-hua¹, XIAO Rui-ying², WANG Miao³, ZHENG Ya-nan³, LIAO Mao-liang³

1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of aloe-emodin, rhein, honokiol, emodin, magnolol, chrysophanol, and physcion in Xiahuang Granule. **Methods** The separation was carried out on Diamonsil C₁₈ chromatography column (250 mm × 4.6 μm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol - 0.1% phosphoric acid water with gradient elution. The detection wavelengths were set at 254 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 30 ℃, and volume of injection was 20 μL. **Results** The linear ranges of aloe-emodin, rhein, honokiol, emodin, magnolol, chrysophanol, and physcion were 23.8—238.4, 22.8—228.0, 25.8—228.0, 78.7—787.2, 16.7—167.2, 16.6—166.4, and 17.5—175.2 μg, respectively. The average recoveries were 99.78%, 99.36%, 99.71%, 98.65%, 99.37%, 99.42%, and 98.78%, respectively. The corresponding RSD values were 1.88%, 2.05%, 2.03%, 2.01%, 2.56%, 2.35%, and 2.17%, respectively. **Conclusion** This method is rapid, simple and accurate, and can be used for quality control of Xiahuang Granule.

Key words: Xiahuang Granule; aloe-emodin; rhein; honokiol; emodin; magnolol; chrysophanol; physcion; HPLC

夏黄颗粒来源于天津中医药大学第一附属医院肿瘤科贾英杰主任医师的临床经验方, 由大黄、厚朴、半夏、决明子、枳壳、旋覆花等 10 余味中药组

成, 具有通腑泻浊、理气和胃的功效, 临床上用于癌痛患者服用阿片类药物所致的气滞腑实型便秘、呕吐, 具有良好的临床疗效, 能够显著改善临床症

收稿日期: 2018-06-25

基金项目: 天津市科技支撑计划项目 (15ZCZDSY00470); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (14JCQNJC13800; 15JCYBJC29500)

作者简介: 尚海花, 博士研究生。E-mail: shanghaihua2006@163.com

*通信作者 廖茂梁, 副研究员。Tel: (022)23003392 E-mail: liaomaoliang@163.com

状,提高患者生活质量。本复方药味较多,成分复杂,其质量控制具有一定的难度。当前的中药复方制剂质量控制手段,多从君药中有效成分的测定入手,无法体现中药复方辨证论治的整体理念,难以全面控制中药复方制剂的质量,影响了中药复方制剂的临床应用。本研究拟采用 RP-HPLC 法对夏黄颗粒中君药和臣药的主要成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、厚朴酚以及和厚朴酚进行同时测定,以期通过多指标成分控制的方法全面反映夏黄颗粒的内在质量,为夏黄颗粒的质量控制提供参考。

1 仪器和材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,具有在线脱气机、输液泵、自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器; AB204-N 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); BT-25S 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); SB-3200 DTDN 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

夏黄颗粒(自制,规格为 6 g/袋,批号 201401、201402、201403); 芦荟大黄素(批号 110795-201007,质量分数 98.0%)、大黄酸(批号 110757-200206,质量分数 \geq 99.0%)、大黄素(批号 110756-200110,质量分数 \geq 99.0%)、大黄酚(批号: 110796-201017,质量分数 99.6%)、大黄素甲醚(批号 110758-201013,质量分数 99.8%)、厚朴酚、(批号 110729-200412,质量分数 \geq 99.0%)、和厚朴酚(批号 110730-201313,质量分数 99.1%)对照品均购于中国食品药品检定研究院; 乙腈[HPLC 级,赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 水(屈臣氏蒸馏水,广州屈臣氏食品饮料有限公司); 甲醇(分析纯和色谱纯,天津市康科德科技发展有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~15 min, 60% A; 15~45 min, 60%~80% A; 45~60 min, 80%~88% A; 60~70 min, 88%~60% A; 70~75 min, 60% A); 检测波长 254 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样体积 20 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦荟大黄素

2.98 mg、大黄酸 2.85 mg、大黄素 2.09 mg、大黄酚 2.08 mg、大黄素甲醚 2.19 mg、厚朴酚 9.84 mg、和厚朴酚 3.23 mg 置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。再精密量取 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,即得混合对照品溶液,其中含芦荟大黄素 11.92 μ g/mL、大黄酸 11.40 μ g/mL、大黄素 8.36 μ g/mL、大黄酚 8.32 μ g/mL、大黄素甲醚 8.76 μ g/mL、厚朴酚 39.36 μ g/mL、和厚朴酚 12.92 μ g/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备^[1] 取夏黄颗粒适量,研细成粉,称取 1.0 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入甲醇 25 mL,超声提取 30 min,不足减失的质量,滤过,精密移取续滤液 5 mL 于茄形瓶中,减压回收甲醇,加 8%盐酸溶液 15 mL,超声处理使溶解,再加 15 mL 三氯甲烷,水浴加热水解 1 h,放置至室温,倒入分液漏斗中,用三氯甲烷多次少量洗涤茄形瓶,并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,减压回收,水液再用三氯甲烷萃取 3 次,每次 15 mL,分别减压回收三氯甲烷,残渣加 1 mL 三氯甲烷溶解,转移至 25 mL 量瓶中,继续用甲醇溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方量称取除大黄、决明子、厚朴外的其余药味,按夏黄颗粒的制备工艺制备成阴性样品,备用;称取阴性样品粉末 1.0 g,按供试品溶液的制备项下方法处理,即得。

2.3 线性范围考察

精密吸取混合对照品溶液 2、4、6、8、10、20 μ L,进样测定,记录色谱图。以进样量为横坐标,响应值峰面积为纵坐标进行线性回归,计算回归方程,见表 1。

2.4 专属性试验

参照夏黄颗粒供试品溶液的制备方法制备缺少芦荟、大黄、决明子的阴性样品,进行测定,结果见图 1,结果表明阴性样品对夏黄颗粒中各成分的测定结果无干扰。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,记录色谱图和目标成分的色谱峰峰面积值,计算各目标成分峰面积 RSD 值,结果显示芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 2.10%、2.60%、1.90%、1.83%、2.64%、1.82%、2.00%。

表1 各成分的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficients, and liner ranges of components

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ng
芦荟大黄素	$Y=6\,993.5X+15.12$	1.000 0	23.8~238.4
大黄酸	$Y=4\,756.4X+10.84$	1.000 0	22.8~228.0
厚朴酚	$Y=2\,480.8X+7.68$	0.999 8	25.8~228.0
和厚朴酚	$Y=1\,208.2X+12.14$	0.999 9	78.7~787.2
大黄素	$Y=5\,320.3X+6.33$	0.999 8	16.7~167.2
大黄酚	$Y=4\,784.8X+9.16$	1.000 0	16.6~166.4
大黄素甲醚	$Y=1\,800.1X+1.81$	0.999 7	17.5~175.2

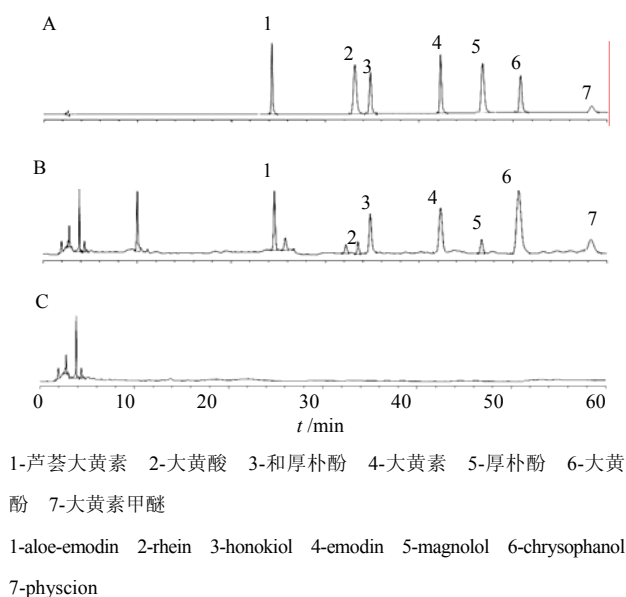


图1 混合对照品(A)、夏黄颗粒(B)和阴性对照样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Xiahuang Granule (B), and negative samples (C)

2.6 重复性试验

取夏黄颗粒(批号201401)适量,研细成粉,称取1.0 g,共6份,精密称定,制备供试品溶液,分别进行测定,记录芦荟大黄素、大黄酸、和厚朴酚、厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积,计算各目标成分平均质量分数。结果显示,芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数的RSD值分别为2.93%、3.90%、2.61%、2.79%、3.37%、1.76%、3.06%。

2.7 稳定性试验

取夏黄颗粒(批号201401)适量,研细成粉,制备供试品溶液,室温放置,分别在0、2、4、6、8、10、12、24 h取样测定,结果芦荟大黄素、大黄

酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数的RSD值分别为2.49%、2.93%、3.90%、2.61%、2.79%、3.37%、3.06%。结果表明,供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 回收率试验

取夏黄颗粒(批号201401)粉末0.5 g,精密称定,分别精密加入含芦荟大黄素517.7 μg/mL、大黄酸98.3 μg/mL、厚朴酚684.6 μg/mL、和厚朴酚1.397 3 μg/mL、大黄素117.5 μg/mL、大黄酚510.8 μg/mL、大黄素甲醚230.4 μg/mL混合对照品溶液1 mL,制备供试品溶液,进样测定,记录色谱图,计算回收率,结果芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均加样回收率分别为99.78%、99.36%、99.71%、98.65%、99.37%、99.42%、98.78%,RSD值分别为1.88%、2.05%、2.03%、2.01%、2.56%、2.35%、2.17%。

2.9 样品测定

取夏黄颗粒样品1.0 g,各3份,精密称定,制备供试品溶液,进样测定,记录色谱图,按外标一点法计算芦荟大黄素、大黄酸、和厚朴酚、厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数,见表2。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

3.1.1 流动相选择 参考文献和《中国药典》2015年版^[2-9],分别比较了流动相甲醇-0.1%磷酸水(85:15)、甲醇-0.1%磷酸水(75:25)、甲醇-0.1%磷酸水(70:30)、乙腈-甲醇-0.1%磷酸水(65:10:25)、乙腈-甲醇-0.1%磷酸水(60:8:32)。由于以上条件色谱峰分开后阴性有干扰,所以不采用等度条件,改用梯度洗脱。最后选定流动相甲醇-0.1%磷酸水为本实验的流动相,在此条件下各目标成分分离较佳,阴性样品无干扰。

表2 夏黄颗粒中芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的测定结果 ($n=3$)
Table 2 Results of aloe-emodin, rhein, honokiol, emodin, magnolol, chrysophanol, and physcion in Xiahuang Granule by RP-HPLC ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	芦荟大黄素	大黄酸	厚朴酚	和厚朴酚	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
201401	5.18	0.98	6.85	13.97	1.18	5.11	2.30
201402	5.16	0.97	6.86	13.89	1.15	5.08	2.26
201403	5.20	0.95	6.83	13.92	1.23	5.12	2.29

3.1.2 最大吸收波长的选择 对混合对照品溶液进行紫外扫描,结果表明,在252.5、257.5、254.5、255.5 nm处有最大吸收,参照《中国药典》2015年版中大黄的HPLC测定波长254 nm,与本实验测得的波长相差不大。分别选择252、254、256 nm下进行检测,根据图谱分析和相关文献报道,最终选择254 nm为最佳检测波长。在此波长下,图谱色谱峰吸收较大,基线平稳。

3.1.3 体流量的选择 分别选择体流量0.8、1.0、1.2 mL/min进行考察,分析结果显示0.8 mL/min时图谱出峰时间最慢,色谱峰未完全分离;1.2 mL/min时图谱出峰时间最快,色谱峰也达基线分离,故选择1.0 mL/min作为本实验的体流量。

3.1.4 柱温的选择 实验考察了不同柱温(25、30、35℃)对色谱图分离效果的影响,结果发现随着温度的升高,各色谱峰出峰时间缩短,25℃时色谱峰出峰时间较长,而35℃下色谱峰未达到基线分离,故选择30℃作为本实验的柱温条件。

3.2 供试品溶液制备方法优化

3.2.1 提取方式的选择 以甲醇为提取溶剂,比较了回流提取、超声提取对目标成分的影响,结果表明,超声提取的成分含量较高,提取效率最佳,且操作简便、易行,故本实验选择超声提取方式进行样品处理。

3.2.2 提取溶剂的选择 考察了50%甲醇、80%甲醇、纯甲醇、70%乙醇、95%乙醇等提取溶剂对各成分的影响,采用超声提取工艺,结果表明,甲醇提取的成分含量最高,故选甲醇为提取溶剂。

3.2.3 提取时间的选择 考察了甲醇超声提取20、30、50 min对各成分的影响,结果表明,超声时间为30 min时各成分的总含量最高,故确定提取时间为30 min。

3.2.4 溶剂用量考察 考察甲醇不同用量超声提取对各成分的影响,结果表明,当甲醇用量为50 mL

已可以提取完全,故确定50 mL为溶剂用量。

中医认为,阿片类药物性辛香燥热,易耗气伤津,肠腑燥热,若机体腑气不通,肠道失养,均易发生燥热津亏,通降失调、传导失常而致气滞便秘^[10-11]。夏黄颗粒针对阿片类药物所致的气滞腑实型便秘发病特点进行组方,方中大黄通腑泻浊、荡涤积滞,枳壳行气宽中,厚朴宽肠下气除满,通畅三焦,宣畅气机。本课题组药理学研究证实,夏黄颗粒能够显著改善燥结便秘模型小鼠的排便功能,对吗啡诱导的小鼠慢传输性便秘具有显著的改善作用,可显著增加排便量,改善小肠推进率^[12]。中药复方是一个多组分复杂体系,质量控制中如何体现其化学成分的多样性与生物活性的关联性是质量控制的难点。现代研究表明,大黄泻下物质基础主要为结合型蒽醌和游离型蒽醌^[13-16],厚朴提取物具有促进大鼠胃排空和胃肠蠕动的作用^[17-18],其主要活性物质为厚朴酚、和厚朴酚。本实验基于中医药理论,对方中的主要活性成分蒽醌类物质进行控制同时,测定了臣药厚朴中木脂素类成分。

本实验通过甲醇提取-盐酸水解-三氯甲烷萃取的方法,同时测定了夏黄颗粒中蒽醌类、木脂素类活性成分。本实验所建立的多成分的测定方法经过方法学验证,可以同时测定出夏黄颗粒中芦荟大黄素、大黄酸、厚朴酚、和厚朴酚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚7种目标成分,可以更加全面地评价夏黄颗粒的质量,为夏黄颗粒的质量控制提供有效的途径和试验依据。

参考文献

- [1] 胡乔,肖瑞颖,廖茂梁,等.多指标成分测定结合全息谱法优化夏黄颗粒的提取工艺[J].现代药物与临床,2014,29(3):236-241.
- [2] 中国药典[S].一部.2015:23.
- [3] 王钰莹,冯伟红,杨菲,等.“一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分[J].中国中药杂志,2012,

- 37(2): 212-217.
- [4] 伍庆, 乙引, 杨建华, 等. HPLC 法同时测定痔痛安搽剂中三种蒽醌类成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(10): 813-815.
- [5] 王荣, 贾正平, 张强, 等. 甘肃道地药材大黄不同部位的指纹图谱研究 [J]. 中国药房, 2005, 16 (18): 1435-1437.
- [6] 张丹, 蒋心惠. 反相高效液相色谱法测定大黄药材中游离及结合型蒽醌类衍生物的含量 [J]. 分析化学, 2003, 31(4): 459-462.
- [7] 黄晓燕, 卫莹芳, 张盈娇, 等. 高效液相色谱法测定厚朴叶不同采收期中厚朴酚、和厚朴酚的含量 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 717-718.
- [8] 李燕敏, 高旭年, 张桂荣. HPLC 法测定厚朴制剂中厚朴酚与和厚朴酚的含量 [J]. 中医药学报, 2001, 29(2): 61.
- [9] 郭建华, 刘佳乐, 黄亮, 等. 高效液相色谱法同时测定厚朴提取物中厚朴酚与和厚朴酚 [J]. 广东化工, 2014, 41(17): 181-182.
- [10] 张雅月, 侯丽, 刘洋, 等. 吗啡类药物引发便秘病机探讨与通腑消胀方解析 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(12): 1016-1017.
- [11] 尹艳芬, 周晋华. 阿片类药物所致便秘的中西医治疗研究进展 [J]. 光明中医, 2014(10): 2248-2251.
- [12] 姜溪, 陈芙蓉, 只德广, 等. 夏黄颗粒治疗慢传输型便秘的实验研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(9): 1589-1596.
- [13] 李远, 王伽伯, 陈玮娜, 等. 小鼠对大黄泻下作用产生耐受性与肠道蒽醌变化关系的量-时-效关系研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2010(12): 2444-2447.
- [14] 魏凤玲, 常明, 原国强. 大黄中结合蒽醌的致泻作用及药动学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1999(6): 53-55.
- [15] 李傲. 正品大黄泻下效价强度比较研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [16] 谭鹏, 张海珠, 张青, 等. UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 928-934.
- [17] 吴经耀, 吕圭源. 川、浙厚朴缓解小鼠便秘作用的药效比较 [J]. 安徽医药, 2012, 16(6): 732-734.
- [18] 王立青, 江荣高, 陈蕙芳. 厚朴酚与和厚朴酚药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1591-1594.