

HPLC 法测定调中四消丸中咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮

陆冰¹, 何胜利^{2*}, 陆飞³

1. 东北石油大学 化学化工学院, 黑龙江 大庆 163318

2. 遂成药业股份有限公司, 河南 新郑 451150

3. 湖化有限公司 分析中心, 浙江 湖州 313000

摘要: **目的** 建立 HPLC 波长切换联合梯度洗脱法同时测定调中四消丸中咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮、 α -香附酮。**方法** 采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 0~21 min 在 325 nm 波长下检测咖啡酸; 21~37 min 在 254 nm 波长下检测芦荟大黄素、大黄酸和大黄素甲醚, 37~55 min 在 242 nm 波长下检测圆柚酮和 α -香附酮; 体积流量: 0.9 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量为 10 μ L。**结果** 咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮、 α -香附酮分别在 2.48~49.60、17.56~351.20、4.59~91.80、6.76~135.20、1.92~38.40、4.26~85.20 μ g/mL 与峰面积线性关系良好; 平均回收率分别为 98.01%、99.27%、97.61%、99.41%、96.90%、98.58%, RSD 值分别为 0.77%、1.18%、0.96%、1.25%、1.48%、1.17% ($n=6$)。**结论** 本方法简单快速, 可作为调中四消丸的质量控制方法。

关键词: 调中四消丸; 咖啡酸; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素甲醚; 圆柚酮; α -香附酮; 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(2017)07-1188-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.07.005

Determination of caffeic acid, aloe-emodin, rhein, physcion, nootkatone, and α -cyperone in Tiaozhong Sixiao Pills by HPLC

LU Bing¹, HE Sheng-li², LU Fei³

1. College of Chemistry & Chemical Engineering, Northeast Petroleum University, Daqing 163318, China

2. Suicheng Pharmaceutical Co., LTD, Xinzheng 451150, China

3. Analysis Center, Huhua Co. LTD., Huzhou 313000, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC wavelength switching combined gradient elution method for simultaneous determination of six major components, including caffeic acid, aloe-emodin, rhein, physcion, nootkatone and α -cyperone in Tiaozhong Sixiao Pills. **Methods** The determination was carried out on Agilent TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase was consisted of acetonitrile - 0.05% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelengths were 325 nm (for caffeic acid), 254 nm (for aloe-emodin, rhein, and physcion), and 242 nm (for nootkatone and α -cyperone). The column temperature was set at 30 $^{\circ}$ C, and the flow rate was 0.9 mL/min with injection volume of 10 μ L. **Results** There were good linear relationships of caffeic acid, aloe-emodin, rhein, physcion, nootkatone, and α -cyperone in the concentration ranges of 2.48 — 49.60, 17.56 — 351.20, 4.59 — 91.80, 6.76 — 135.20, 1.92 — 38.40, and 4.26 — 85.20 μ g/mL, respectively. The average recoveries were 98.01%, 99.27%, 97.61%, 99.41%, 96.90%, and 98.58% with RSD of 0.77%, 1.18%, 0.96%, 1.25%, 1.48%, and 1.17% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple and rapid, which can be used as quality control methods for Tiaozhong Sixiao Pills. **Key words:** Tiaozhong Sixiao Pills; caffeic acid; aloe-emodin; rhein; physcion; nootkatone; α -cyperone; HPLC

调中四消丸处方源于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第二册, 由牵牛子(炒)、熟大黄、香附

(醋炙)、五灵脂(醋炙)、猪牙皂组成。牵牛子行水利气、导滞逐饮, 为方中君药; 熟大黄苦降通便、

收稿日期: 2017-03-27

作者简介: 陆冰(1995—), 男, 浙江湖州人, 硕士研究生, 从事化学成分检验分析研究。Tel: 15776586819 E-mail: dppilb@21cn.com

*通信作者 何胜利(1981—), 男, 工程师, 从事药品质量技术管理等研究。E-mail: scyy_hcli@yahoo.com

破积导滞，香附疏肝行气开郁，为方中臣药；佐以五灵脂活血化瘀止痛，猪牙皂消凝聚之痰湿，诸药合用，共奏消食化滞、利水止痛之效。调中四消丸现标准仅规定了制法、性状、理化鉴别^[1]及丸剂通则项下的检测项目^[2]。为进一步控制产品质量，提高该制剂的质量标准，本实验采用 HPLC 波长切换联合梯度洗脱法对牵牛子（炒）中的咖啡酸、熟大黄中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚及香附（醋炙）中的圆柚酮、 α -香附酮进行了同时测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列四元梯度泵高效液相色谱仪；Sartorius BP211D 型电子天平；KQ3200DB 型数控超声波清洗器。

调中四消丸购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂，100 粒质量为 6 g；咖啡酸（批号 110885-200102）、芦荟大黄素（批号 110795-201609）、大黄酸（批号 110757-201607）、大黄素甲醚（批号 110758-201616）、 α -香附酮（批号 110748-201312）对照品均购自中国食品药品检定研究院；圆柚酮对照品（批号 4674-50-4，质量分数 95.0%）购自上海抚生实业有限公司；乙腈为色谱纯，水为重蒸馏水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮对照品各适量，用甲醇分别制成咖啡酸 0.496 mg/mL、芦荟大黄素 3.512 mg/mL、大黄酸 0.918 mg/mL、大黄素甲醚 1.352 mg/mL、圆柚酮 0.384 mg/mL、 α -香附酮 0.852 mg/mL 单成分对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液 5.0、5.0、5.0、5.0、2.5、5.0 mL，用甲醇稀释制成 100 mL，得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取调中四消丸适量，研成细粉，取约 6 g，精密

称定，精密加入甲醇 50 mL，称定质量，超声波超声提取 30 min，放冷后再次称定质量，用甲醇补足减失质量，振摇均匀，滤过，即得。

2.3 阴性样品溶液的制备

按调中四消丸处方工艺，分别制备缺牵牛子（炒）、熟大黄、香附（醋炙）的阴性样品，并按供试品溶液的制备项下方法制成不含牵牛子、熟大黄、香附的阴性样品溶液。

2.4 色谱条件

采用 Agilent TC- C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μ m）；流动相：乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B），梯度洗脱：0~15 min，46.0% A；15~21 min，46.0%→58.0% A；21~37 min，58.0%→72.0% A；37~48 min，72.0%→78.0% A；48~55 min，78.0%→46.0% A；0~21 min 在 325 nm^[3-4]波长下检测咖啡酸；21~37 min 在 254 nm^[5-7]波长下检测芦荟大黄素、大黄酸和大黄素甲醚，37~55 min 在 242 nm^[8-10]波长下检测圆柚酮和 α -香附酮；体积流量：0.9 mL/min；柱温：30 $^{\circ}$ C；进样量为 10 μ L。理论塔板数按所测各成分咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮计均不低于 3 500，各峰的分离度均大于 1.5。

2.5 线性关系考察

精密量取咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮对照品储备液各 5.0 mL，置 50 mL 量瓶中，摇匀，得混合对照品溶液 I（咖啡酸 49.60 μ g/mL、芦荟大黄素 351.20 μ g/mL、大黄酸 91.80 μ g/mL、大黄素甲醚 135.20 μ g/mL、圆柚酮 38.40 μ g/mL、 α -香附酮 85.20 μ g/mL），再用甲醇分别稀释至 75%、50%、25%、10%、5%，依法进行测定咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮的峰面积值，采用质量浓度作为横坐标，测得的各成分峰面积作为纵坐标，进行线性回归，结果见表 1。

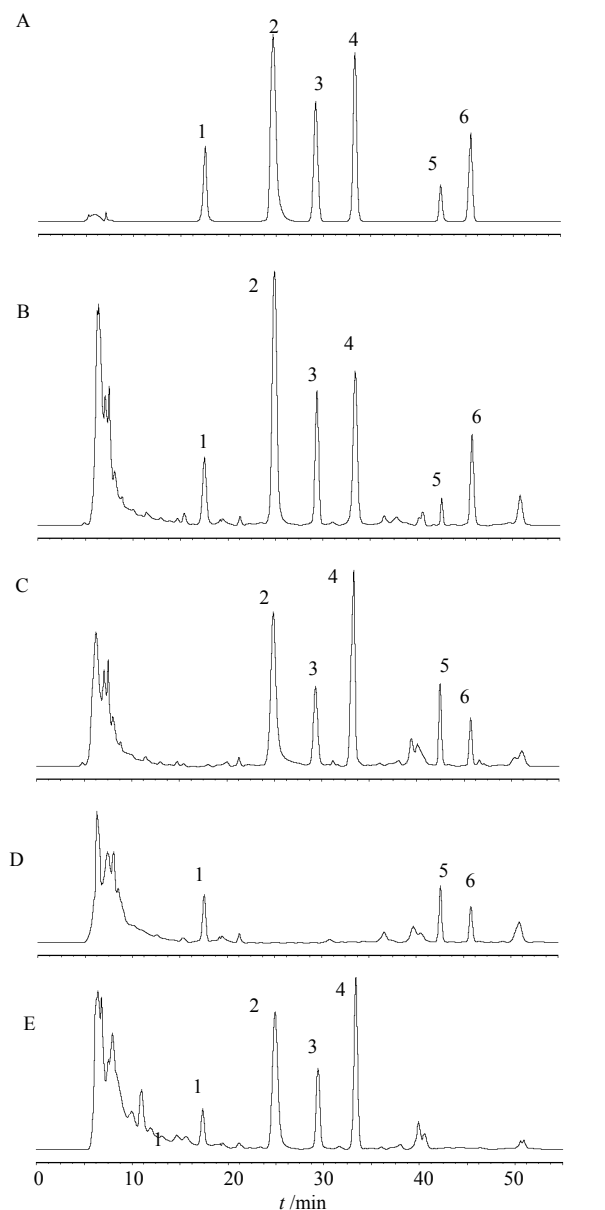
表 1 线性关系考察

Table 1 Linear relationship test

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
咖啡酸	$Y=8.153\ 6\times 10^5 X+429.5$	0.999 9	2.48~49.60
芦荟大黄素	$Y=8.015\ 7\times 10^5 X-336.2$	0.999 3	17.56~351.20
大黄酸	$Y=1.259\ 2\times 10^6 X+471.0$	0.999 7	4.59~91.80
大黄素甲醚	$Y=1.153\ 4\times 10^6 X+189.6$	0.999 5	6.76~135.20
圆柚酮	$Y=6.861\ 5\times 10^5 X+300.8$	0.999 9	1.92~38.40
α -香附酮	$Y=7.340\ 8\times 10^5 X-252.7$	0.999 6	4.26~85.20

2.6 系统适用性和专属性试验

取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液进样测定,结果样品中其他成分对6个成分的测定无干扰,色谱图见图1。



1-咖啡酸 2-芦荟大黄素 3-大黄酸 4-大黄素甲醚 5-圆柚酮 6-α-香附酮
1-caffeic acid 2-aloe-emodin 3-rhein 4-phycion 5-nootkatone 6-α-cyperone

图1 混合对照品(A)、调中四消丸(B)、缺牵牛子阴性(C)、缺熟大黄阴性(D)、缺香附阴性(E)的色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of mixed reference substances (A), Tiaozhong Sixiao Pills (B), negative sample without *Pharbitidis Semen* (C), negative sample without *Rhei Radix et Rhizoma Praeparata* (D) and negative sample without *Cyperis Rhizoma* (E)

2.7 精密度试验

取同一混合对照品溶液(咖啡酸 0.024 8 mg/mL、芦荟大黄素 0.175 6 mg/mL、大黄酸 0.045 9 mg/mL、大黄素甲醚 0.067 6 mg/mL、圆柚酮 0.009 6 mg/mL、α-香附酮 0.042 6 mg/mL),连续进样6次,测定峰面积,结果咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和α-香附酮峰面积的RSD值分别为1.13%、0.82%、1.25%、0.94%、1.27%、1.59%($n=6$)。

2.8 重复性试验

取批号为15083202调中四消丸样品6份,制备供试品溶液,进样测定,分别计算咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和α-香附酮的质量分数,结果所测6个组分质量分数的RSD值分别为1.42%、0.67%、0.81%、1.30%、0.59%、1.44%。

2.9 稳定性试验

取批号为15083202调中四消丸同一供试品溶液,在室温下放置0、2、4、8、12、18 h,依法进样测定咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和α-香附酮的峰面积值,结果调中四消丸供试品溶液在室温下18 h内稳定,所测各成分峰面积的RSD值分别为1.16%、0.78%、1.23%、0.38%、0.96%、1.21%。

2.10 回收率试验

取批号15083202调中四消丸研细后细粉6份,每份3.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,依次精密加入0.579 mg/mL咖啡酸、0.219 mg/mL圆柚酮、0.975 mg/mL α-香附酮对照品混合溶液1.0 mL,0.857 mg/mL大黄酸对照品溶液6.0 mL,0.581 mg/mL大黄素、0.727 mg/mL大黄素甲醚对照品混合溶液2.0 mL,制备供试品溶液,进样测定,计算咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和α-香附酮的回收率,结果平均回收率分别为98.01%、99.27%、97.61%、99.41%、96.90%、98.58%,RSD值分别为0.77%、1.18%、0.96%、1.25%、1.48%、1.17%。

2.11 样品测定

取3批调中四消丸,每批3份样品,制备供试品溶液,依法进样,测定咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和α-香附酮的峰面积,采用外标法计算所测各成分的质量分数,结果见表2。

表 2 调中四消丸中咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮的测定结果 ($n=3$)Table 2 Determination of caffeic acid, aloe-emodin, rhein, physcion, nootkatone and α -cyperone in Tiaozhong Sixiao Pills ($n=3$)

批号	质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	咖啡酸	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素甲醚	圆柚酮	α -香附酮
15083202	0.192	1.716	0.389	0.483	0.074	0.326
15080854	0.183	1.888	0.422	0.504	0.068	0.297
16080671	0.210	1.547	0.359	0.446	0.083	0.363

3 讨论

3.1 波长的确定

采用对照品溶液在 200~400 nm 波长扫描,同时参考文献报道方法^[3-10],最终在 325 nm 波长下检测咖啡酸,在 254 nm 波长下检测芦荟大黄素、大黄酸和大黄素甲醚,在 242 nm 波长下检测圆柚酮和 α -香附酮。

3.2 色谱条件的考察

在流动相选择时,分别考察了甲醇-水^[8-10]、乙腈-水、乙腈-0.2%冰醋酸溶液^[11]、乙腈-0.04%磷酸溶液^[3-4]和乙腈-0.1%磷酸溶液^[5]等流动相体系,结果显示以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相系统时峰对称度较好,基线平稳,分离效果理想,出峰时间短,能够保证在 55 min 内完成对咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮 6 个成分的同时测定。

3.3 供试品制备方法的确定

在供试品溶液的制备时,分别考察了提取方法(回流、超声、索氏)及提取溶剂(70%甲醇、甲醇、乙醇),结果显示,以甲醇超声提取效果为佳,在此基础上对提取时间(15、30、45 min)进行了考察,结果显示超声提取 30 min 和超声提取 45 min 所测各成分咖啡酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮质量分数差异不大,但明显高于超声提取 15 min。故供试品的制备方法选择甲醇超声提取 30 min。

本研究采用高效液相波长切换联合梯度洗脱法测定调中四消丸中 6 个成分咖啡酸、芦荟大黄素、

大黄酸、大黄素甲醚、圆柚酮和 α -香附酮,方法简单快速,可作为调中四消丸的质量控制方法。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第二册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 223.
- [2] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 11-13.
- [3] 冯鑫,袁杰,金传山,等. 不同产地牵牛子生品及炒制品咖啡酸含量测定 [J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(2): 91-93.
- [4] 田连起,郑玉丽,白吉星,等. 牵牛子炮制前后咖啡酸的含量比较研究 [J]. 中医学报, 2011, 26(5): 595-597.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 23-24, 253-254, 258.
- [6] 刘远平,陈粟. 不同产地药用大黄中 5 种游离蒽醌的含量测定 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(15): 42-44.
- [7] 许舜军,李鸿燕,曾元儿,等. 反相高效液相色谱法测定大黄药材五种蒽醌类成分的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1201-1202.
- [8] 季宁平,卢君蓉,李文兵,等. 不同醋制方法对香附中指标成分含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 5-7.
- [9] 卢君蓉,李文兵,王世宇,等. 香附醋制前后香附烯酮,圆柚酮和 α -香附酮的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 24-27.
- [10] 卢君蓉,李文兵,傅超美,等. 香附药材的质量控制方法的探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(5): 389-392.
- [11] 颜永刚,尹立敏,王红艳,等. HPLC 法同时测定大黄叶中 9 种成分 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2360-2364.