

HPLC 法测定柔肝降脂胶囊中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚

陈海鹰¹, 李莉², 薛平², 朱珊梅¹, 左小明^{1*}

1. 常州市第三人民医院 药事科, 江苏 常州 213000

2. 常州市食品药品纤维质量监督检验中心, 江苏 常州 213000

摘要: 目的 建立柔肝降脂胶囊中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 HPLC 测定方法。方法 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长 288 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。结果 橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的线性范围分别为 1.59~51.00、0.87~27.92、1.63~52.17、0.22~7.06 μg/mL。平均回收率分别为 97.55%、100.40%、98.75%、101.30%, RSD 值分别为 1.93%、1.53%、1.77%、2.23%。4 种蒽醌类成分中橙黄决明素和大黄酚的质量分数较高, 大黄素甲醚的质量分数较低, 不同批次柔肝降脂胶囊样品中芦荟大黄素的质量分数差异较明显。结论 所建立的方法可用于柔肝降脂胶囊中 4 种蒽醌类成分的测定, 可为柔肝降脂胶囊的质量控制研究提供参考。

关键词: 柔肝降脂胶囊; 橙黄决明素; 芦荟大黄素; 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(2022)05-0983-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.05.009

Determination of aurantio-obtusin, aloe-emodin, chrysophanol and physcion in Rougan Jiangzhi Capsules by HPLC

CHEN Hai-ying¹, LI Li², XUE Ping², ZHU Shan-mei¹, ZUO Xiao-ming¹

1. Department of Pharmacy, Changzhou Third People's Hospital, Changzhou 213000, China

2. Changzhou Institute for Food, Drug and Fiber Control, Changzhou 213000, China

Abstract: Objective To establish HPLC method for determination of aurantio-obtusin, aloe-emodin, chrysophanol, and physcion in Rougan Jiangzhi Capsules. **Methods** The HPLC analysis was performed on Waters Symmetry C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol - 0.1% phosphoric acid solution by gradient elution. The detection wavelength was set as 288 nm, flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the sample volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of aurantio-obtusin, aloe-emodin, chrysophanol, and physcion were 1.59 — 51.00, 0.87 — 27.92, 1.63 — 52.17, and 0.22 — 7.06 μg/mL. The recoveries were 97.55%, 100.40%, 98.75%, and 101.30% with values of 1.93%, 1.53%, 1.77%, and 2.23%, respectively. Among the four anthraquinones, the contents of aurantio-obtusin and chrysophanol were higher, but the contents of physcion were lower. The contents of aloe-emodin in different batches of Rougan Jiangzhi Capsules samples were significantly different. **Conclusion** The HPLC method established can determinate the contents of four anthraquinones in Rougan Jiangzhi Capsules, which can provide reference for the quality control research of Rougan Jiangzhi Capsules.

Key words: Rougan Jiangzhi Capsules; aurantio-obtusin; aloe-emodin; chrysophanol; physcion; HPLC

柔肝降脂胶囊为常州市第三人民医院的自制中药制剂, 是医院省重点专科肝病科的特色制剂, 已在临床使用多年。处方由山楂、何首乌、决明子、牡蛎、丹参、大黄、赤芍等 10 味中药组成, 具有疏

肝祛湿、活血祛瘀、养血柔肝、软坚散结的功效, 用于脂肪肝、高脂血症, 并可抗肝纤维化, 疗效显著。近年来柔肝降脂胶囊用于非酒精性脂肪性肝病的治疗亦取得了良好的临床疗效^[1-2]。蒽醌类成分是

收稿日期: 2022-03-16

基金项目: 常州市第十四批科技计划 (应用基础研究指导性) 项目 (CJ20219027)

作者简介: 陈海鹰, 女, 主管药师, 硕士, 从事医院药学研究。E-mail: wt8196@163.com

*通信作者: 左小明 (1976—), 男, 副主任药师, 主要从事医院药学研究。E-mail: 644891869@qq.com

柔肝降脂胶囊的何首乌、决明子和大黄中主要活性成分之一,已被证实具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、保肝降脂、抗纤维化等多种药理作用^[3]。随着长期或大剂量服用含蒽醌类中药及其制剂导致结肠黑变病、药物性肝损伤和肾损伤等不良反应报道的日益增多,蒽醌类成分的安全性受到了人们的重视^[4]。虽然柔肝降脂胶囊使用的是炮制后的何首乌和大黄,毒性较低^[5-6],且柔肝降脂胶囊尚无不良反应报道,但仍有必要测定其中蒽醌类成分以保障临床的安全合理使用。基于此,本实验采用 HPLC 法同时测定柔肝降脂胶囊中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚,以期对柔肝降脂胶囊的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪,配有 2998 二极管阵列检测器(沃特斯中国有限公司);ME104 万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);YL-060S 超声波清洗机(深圳语路清洗设备有限公司);RE-52CS 旋转蒸发仪(上海雅荣生化设备仪器有限公司),Milli-Q Advantage 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

橙黄决明素(批号 111900-202006,质量分数 99.0%)、芦荟大黄素(批号 110795-202011,质量分数 97.5%)、大黄酚(批号 110796-201922,质量分数 99.4%)、大黄素甲醚(批号 110758-201817,质量分数 99.2%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇(批号 I1077207008)购自默克股份两合公司;磷酸(批号 20181101)购自上海申迪化工有限公司;醋酸乙酯(批号 20160321)购自国药集团化学试剂有限公司;二氯甲烷(批号 20210324)购自上海凌峰化学试剂有限公司;盐酸(批号 20180401)购自江苏永丰化学试剂有限公司。除甲醇为色谱纯外,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

柔肝降脂胶囊由常州市第三人民医院制剂室提供,批号分别为 21031911、21031912、21030511、21030611、21030711、21053011、21053012、21080511、21080611、21080711。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取柔肝降脂胶囊内容物约 1.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入

甲醇 30 mL,称定质量,水浴加热回流 1 h,取出,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,精密量取续滤液 20 mL,置圆底烧瓶中,回收溶剂至干,加入数粒沸石,精密加入 8%盐酸溶液 20 mL,水浴加热水解 1 h,取出,放冷,置分液漏斗中,用二氯甲烷洗振摇提取 3 次,每次 15 mL,分取二氯甲烷层,合并所有二氯甲烷液,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品 16.1、17.9、16.4、17.8 mg,加入甲醇-醋酸乙酯(2:1)溶液溶解,分别制成质量浓度分别为 644、716、656、178 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。分别精密量取 4 种对照品储备液适量,用甲醇制成含橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 6.44、3.58、6.56、0.89 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 空白溶液的制备 取甲醇-醋酸乙酯(2:1)溶液 1 mL,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.2 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~40 min, 55% A; 40~50 min, 55%→85% A; 50~70 min, 85% A; 70~72 min, 85%→55% A);检测波长 288 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。

2.3 专属性试验

分别取供试品溶液、空白溶液、混合对照品溶液,进样,色谱图见图 1。可以看出,4 种蒽醌类成分分离度良好。

2.4 线性关系、范围、检测限和定量限

精密量取橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品储备液 2、1、2、1 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得含橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 51.52、28.64、52.48、7.12 $\mu\text{g/mL}$ 的标准曲线 1 混合对照品溶液,随后二倍稀释,得 6 份标准曲线混合对照品溶液,进样测定,记录峰面积。分别以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制各成分的标准曲线,并计算线性回归方程。按照信噪比 $S/N=3$ 测定各成分的检测限,按照信噪比 $S/N=10$ 测定定量限,结果见表 1。

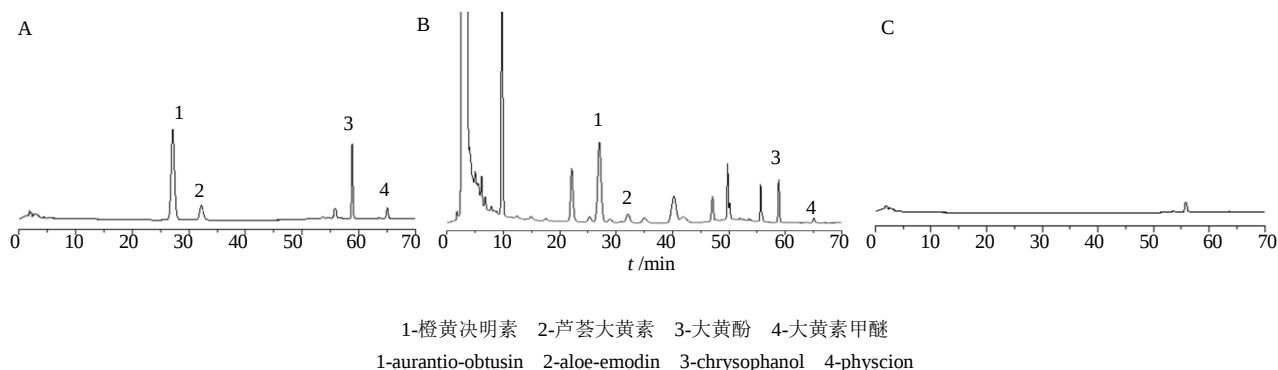


图 1 混合对照品 (A)、柔肝降脂胶囊 (B) 和空白溶液 (C) 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A), Rougan Jiangzhi Capsules (B), and blank solution (C)

表 1 各成分的线性回归方程、检测限和定量限

Table 1 Linear equation, linear range, quantitation limit, and detection limit of components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
橙黄决明素	$Y=74\ 105\ X+4\ 384$	1.000	1.59~51.00	403.80	458.70
芦荟大黄素	$Y=22\ 953\ X-152$	1.000	0.87~27.92	135.40	153.70
大黄酚	$Y=22\ 633\ X+2\ 431$	0.999	1.63~52.17	875.20	942.40
大黄素甲醚	$Y=35\ 008\ X-99.2$	1.000	0.22~7.06	260.20	322.20

2.5 精密度试验

取含橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 6.44、3.58、6.56、0.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合对照品溶液，连续进样 6 次，分别记录各成分的峰面积，计算得橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 0.31%、0.45%、0.26%、1.29%。

2.6 重复性试验

取批号 21031911 柔肝降脂胶囊样品 6 份，每份 1.2 g，精密称定，制备供试品溶液，进样测定，记录各成分的峰面积，代入回归方程中计算各成分的质量分数，结果橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数分别为 222.3、73.29、168.7、13.53 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，RSD 值分别为 1.84%、1.96%、1.39%、1.96%。

2.7 稳定性试验

取批号 21031911 柔肝降脂胶囊制备供试品溶液，室温放置 0、4、8、12、24、48 h，进样测定，记录峰面积，计算得橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积 RSD 值分别为 1.13%、0.86%、1.29%、1.55%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.8 回收率试验

取批号 21031911 柔肝降脂胶囊 6 份，每份约 0.6 g，精密称定，精密加入含橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 132.60、44.68、101.70、8.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液 1 mL，制备供试品溶液，进样测定，记录峰面积，代入回归方程中计算回收率，结果橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 97.55%、100.40%、98.75%、101.30%，RSD 值分别为 1.93%、1.53%、1.77%、2.23%。

2.9 样品测定

取 10 批柔肝降脂胶囊，制备供试品溶液，进样测定，记录峰面积，代入回归方程中计算 4 种蒽醌类成分的质量分数。每批样品重复试验 3 次，取平均值，结果见表 2。

可以看出，橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数范围分别为 206.6~245.0、7.5~86.5、71.0~196.1、7.8~23.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。柔肝降脂胶囊 4 种蒽醌类成分中橙黄决明素和大黄酚的质量分数较高，大黄素甲醚的质量分数较低，可见不同批次柔肝降脂胶囊样品中芦荟大黄素的质量分数差异较明显。

表 2 柔肝降脂胶囊中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of aurantio-obtusin, aloe-emodin, chrysophanol, and physcion in Rougan Jiangzhi Capsules ($n=3$)

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	橙黄决明素	芦荟大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
21031911	222.3	73.3	168.7	13.5
21031912	231.0	76.8	167.1	14.7
21030511	231.9	65.1	152.4	13.4
21030611	209.2	86.5	196.1	17.5
21030711	206.6	81.7	193.4	16.5
21053011	316.5	20.5	177.7	23.3
21053012	319.1	22.0	181.3	23.3
21080511	245.0	8.2	107.6	12.1
21080611	244.5	7.7	90.0	10.3
21080711	232.3	7.5	71.0	7.8

3 讨论

3.1 检测成分的选择

《中国药典》2020 年版一部将橙黄决明素和大黄酚作为决明子的指标性成分，大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚作为大黄和何首乌中指标性成分。课题组前期拟建立柔肝降脂胶囊中 6 种蒽醌类成分的测定方法，但实验过程中发现使用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱时大黄酸与周围峰不能分离完全，且空白溶剂峰对大黄素的测定有干扰，而使用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱时大黄酸可与周围峰分离完全，但橙黄决明素、芦荟大黄素与周围峰难以分开，故本实验采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱建立了柔肝降脂胶囊中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的测定方法。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

课题组曾测定柔肝降脂胶囊中游离的橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚，结果发现，游离的蒽醌类成分质量分数较低，故本实验测定了总蒽醌中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。《中国药典》2020 年版一部决明子“含量测定”项下采用三氯甲烷作为萃取溶剂，本实验比较了三氯甲烷和二氯甲烷萃取得到的 4 种蒽醌类成分的质量分数，发现没有显著差异，考虑到三氯甲烷的毒性，故选用二氯甲烷作为萃取溶剂。

3.3 色谱条件的选择

参考相关文献报道^[7-8]对流动相进行了考察，结果发现，乙腈 - 0.1% 磷酸溶液作为流动相时对照品色谱峰峰型较差，且对照品与周围峰不能分离完

全，而甲醇 - 0.1% 磷酸溶液作为流动相时，4 种对照品峰型较好，与周围峰能分离完全，故选用甲醇为有机相。利用二极管阵列检测器检测了橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品的最大吸收波长，结果发现，橙黄决明素的最大吸收波长为 288 nm，芦荟大黄素的最大吸收波长为 225.1、255.9、288 nm，大黄酚的最大吸收波长为 254.7、288 nm，大黄素甲醚的最大吸收波长为 288 nm。为了保证各检测成分具有较好的响应值，选用 288 nm 作为检测波长。

3.4 蒽醌类成分的测定结果

张萍等^[9]发现不同批次大黄配方颗粒中蒽醌类成分的含量具有明显差异。本实验也发现不同批次柔肝降脂胶囊中蒽醌类成分含量差异较大，批间差异最大的是芦荟大黄素，推测与不同批次的中药材质量或生产工艺参数波动有关。10 批柔肝降脂胶囊中 4 种蒽醌类成分的总量较低，为 318.5~545.6 $\mu\text{g/g}$ ，其中橙黄决明素和大黄酚的含量相对较高，橙黄决明素在一定程度上可调节高脂血症的脂肪代谢^[10]，大黄酚具有抗氧化、抗肿瘤、促进脂肪代谢作用^[11]，建议将橙黄决明素和大黄酚作为柔肝降脂胶囊质量控制的指标性成分，通过测定更多批次柔肝降脂胶囊中橙黄决明素和大黄酚的量确定其最低检测限。王呈谕等^[12]研究发现，何首乌、虎杖、大黄水提物中游离蒽醌的含量与其体外肝细胞毒性作用呈正相关。本实验测得的 10 批柔肝降脂胶囊中游离蒽醌橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量较低，这可能是柔肝降脂胶囊尚

无不良反应报道的原因。

柔肝降脂胶囊的现行质量标准较低, 缺乏对其主要有效成分的含量测定, 因此本实验建立的高效液相色谱法用于柔肝降脂胶囊中橙黄决明素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的测定, 可为柔肝降脂胶囊的质量控制研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 许小莉, 严桐. 柔肝降脂胶囊联合行为干预治疗非酒精性脂肪性肝炎的临床观察 [J]. 中国基层医药, 2016, 23(1): 102-105.
- [2] 严桐, 易婷, 许晓莉, 等. 柔肝降脂胶囊治疗非酒精性脂肪性肝炎及对患者血脂的影响分析 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(3): 174-177.
- [3] 赵盼盼, 佟继铭, 田沂凡, 等. 蒽醌类化合物药理作用研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2016, 33(2): 152-155.
- [4] 陶明宝, 张乐, 刘飞, 等. 含蒽醌类成分中药的安全性研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 238-243.
- [5] 韩紫欣, 涂灿, 葛斐林, 等. 基于生熟异用的何首乌及其制剂相关肝损伤不良反应报告分析 [J]. 药物流行

病学杂志, 2019, 28(4): 227-232.

- [6] 胡樱凡, 向丽, 王平, 等. 大黄肝肾毒性及其减毒方法现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 34-41.
- [7] 刁飞燕, 吴晓云, 刘春霖, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器同时测定减肥通便茶中 6 种蒽醌类成分的含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4357-4362.
- [8] 薛佩芸, 陈萍, 郭冬. 决明子水煎提取工艺优化及其颗粒剂中指标成分量值转化研究 [J]. 中国药业, 2019, 28(16): 5-8.
- [9] 张萍, 牛明, 谭鹏, 等. 中药效应近红外谱的构建及应用—以大黄配方颗粒为例 [J]. 药科学报, 2019, 54(12): 2162-2168.
- [10] 伍洋科, 李莎, 蒋菲娅, 等. 代谢组学方法研究橙黄决明素对高脂血症大鼠血浆游离脂肪酸的影响 [J]. 分析科学学报, 2020, 36(2): 205-211.
- [11] 袁鑫茹, 张丹参. 大黄酚药理作用的研究进展 [J]. 神经药理学报, 2020, 10(6): 34-40.
- [12] 王呈谕, 刘晓璇, 李轶群, 等. 何首乌、虎杖、大黄水提取物中游离蒽醌含量的测定及对正常肝细胞的毒性作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(3): 215-220.

[责任编辑 解学星]