HPLC-FLD 法测定清火片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚

许苗苗，王舒懿，张 鑫，张 楠*
西安市食品药品检验所，陕西 西安 710054

摘 要：目的 建立高效液相色谱－荧光检测（HPLC-FLD）法测定清火片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。**方法** 采用 Agilent C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－0.1%磷酸溶液（78∶22）；体积流量为 1 mL/min；柱温 30 ℃；进样量为 20 μL。对比 HPLC-FLD 法与 HPLC-UV 法的测定结果。**结果** 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别在 100.6～1 609.6、86.8～1 388.8、359.4～5 750.4、81.2～1 299.2、89.4～1 430.4 ng 线性关系良好；游离蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 93.9%、90.8%、96.2%、92.9%、89.2%，RSD 值分别为 2.2%、2.4%、1.0%、2.4%、0.6%；总蒽醌中各成分平均回收率分别为 100.2%、85.7%、99.2%、104.5%、104.2%，RSD 值分别为 2.5%、2.2%、3.7%、0.5%、0.7%。**结论** 本方法具有重复性好、灵敏度高、专属性强、内源物干扰小等优点，与 HPLC-UV 法测定结果一致性较高，可用于中成药清火片的质量控制。

关键词：清火片；芦荟大黄素；大黄酸；大黄素；大黄酚；大黄素甲醚；高效液相色谱－荧光检测
中图分类号：R286.02 **文献标志码**：A **文章编号**：1674 - 5515(2018)12 - 3107 - 05
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.12.005

Determination of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcione in Qinghuo Tablets by HPLC-FLD

XU Miao-miao, WANG Shu-yi, ZHANG Xin, ZHANG Nan
Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China

Abstract: Objective To establish an method HPLC-FLD for the determination of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcione in Qinghuo Tablets. **Methods** The separation was carried out on Agilent C_{18} chromatography column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol - 0.1% phosphoric acid solution (78:22). The flow rate was 1 mL/min, temperature of column was set at 30 ℃, and volume of injection was 20 μL. The results of HPLC-FLD and HPLC-UV were compared. **Results** The linear ranges of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcione were 100.6 — 1 609.6, 86.8 — 1 388.8, 359.4 — 5 750.4, 81.2 — 1 299.2, and 89.4 — 1 430.4 ng, respectively. The average recovery rates of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcione in free anthraquinone were 93.9%, 90.8%, 96.2%, 92.9%, and 89.2%, respectively, with RSD values of 2.2%, 2.4%, 1.0%, 2.4%, and 0.6%, respectively. The average recovery rates of total anthraquinone were 100.2%, 85.7%, 99.2%, 104.5%, and 104.2%, respectively with RSD values of 2.5%, 2.2%, 3.7%, 0.5%, and 0.7%, respectively. **Conclusion** The method has the advantages of good repeatability, high sensitivity, strong specificity, and little interference from endogenous substances, in good agreement with HPLC-UV method, and can be used for quality control of Qinghuo Tablets.

Key words: Qinghuo Tablets; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcione; HPLC-FLD

清火片是一种常见的清火解毒类的中药复方制剂，收载于《卫生部颁药品标准》成方制剂标准第二册，由大黄、大青叶、石膏、薄荷脑 4 味中药组成，具有清热泻火、通便之功效，用于咽喉肿痛、牙痛、头目眩晕、口鼻生疮、风火目赤、大便不通。制剂中大黄型蒽酮类化合物芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的泻下、抗菌作用最强[1]。清火片现有标准为部标和国标，国标中仅以大黄素和大黄酚为考察指标，而部标则更为简单，无含量测定项目，不能明确地判断清火片的质量。

收稿日期：2018-03-30
作者简介：许苗苗，女，硕士，主要从事药品检验工作。Tel: (029) 85534542 E-mail: 459750487@qq.com
***通信作者** 张 楠，男，副主任药师，硕士，主要从事药品质量标准研究工作。E-mail: 371282926@qq.com

为了更加精确地控制市售清火片的质量，并保证药品使用安全、有效，本研究采用高效液相色谱－荧光检测法实现清火片中 5 种游离蒽醌和总蒽醌的定量分析。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪（1260 紫外检测器，1260 荧光检测器）；BT 124S/25S 型电子天平（北京赛多利斯公司，精密度：十万分之一、百万分之一）；KG-300DE 型数控超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

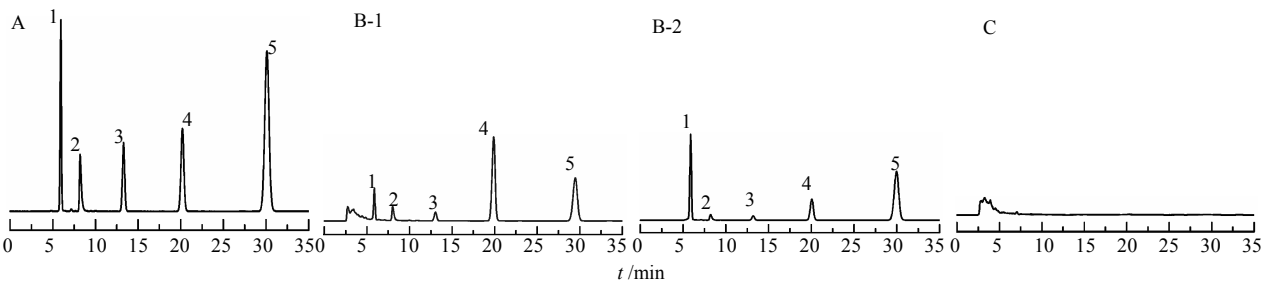
芦荟大黄素（批号 110795-201308，质量分数 97.8%）、大黄酚（批号 110796-201621，质量分数 99.2%）、大黄酸（批号 110757-200206）、大黄素甲醚（批号 110758-201512，质量分数 98.7%）、大黄素（批号 110756-201616，质量分数 99.0%）均购自中国食品药品检定研究院。

清火片样品，A：伊春金北药制药有限公司（瑞塞斯），批号 20160401；B：吉林省康福药业有限公司（恒帝），批号 20151210；C：湖南富兴飞鸽药业有限公司，批号 20160604；D：吉林省康福药业有限公司（平康），批号：20160114；E：伊春金北药制药有限公司（用），批号 20160607；F：伊春金北药制药有限公司（用），批号 20160505；G：吉林省康福药业有限公司（如医），批号 20160124；H：伊春金北药制药有限公司（瑞塞斯），批号 20160109；I：广西维威制药有限公司，批号 20160503；J：青峰医药集团江西山香药业有限公司，批号 20150903。甲醇为色谱纯（Fisher Scientific），其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－0.1%磷酸溶液（78∶22）；体积流量为 1 mL/min；柱温 30 ℃；进样量为 20 μL；紫外检测波长 254 nm；荧光检测激发波长为 435 nm，发射波长为 515 nm。见图 1。



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-aloeemodin 2-rhein 3-emodin 4-chrysophanol 5-physcion

图 1 混合对照品（A）、清火片样品游离蒽醌（B-1）、总蒽醌（B-2）和阴性样品（C）的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), free anthraquinone (B-1) and total anthraquinone in Qinghuo Tablets (B-2), and negative sample (C)

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品各适量，加甲醇制成质量浓度分别为 100.6、86.8、359.4、81.2、89.4 μg/mL 的溶液，摇匀，即得。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 游离蒽醌供试品溶液的制备 取清火片样品适量，研细，精密称取样品 2.0 g，精密加甲醇 25 mL，称定质量，加热回流 1 h，放冷，用甲醇补足减失的质量，滤过，即得，取续滤液备用。

2.3.2 总蒽醌供试品溶液的制备 精密吸取游离蒽醌供试品溶液续滤液各 10 mL，置圆底烧瓶中，挥去溶剂，加 8%盐酸溶液 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，减压回收至干，残渣加甲醇使溶解，转移至 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，即得，备用。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、8、12、14、16 μL 进样测定。以进样质量为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归分析，结果见表 1。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL，重复测定 6

表 1 线性方程、相关系数和线性范围

Table 1 Linear equation, correlation coefficient, and linear range

对照品	线性方程	r	线性范围/ng
芦荟大黄素	Y=0.143 5 X+2.263 1	0.999 5	100.6～1 609.6
大黄酸	Y=0.077 9 X+0.216 9	1.000 0	86.8～1 388.8
大黄素	Y=0.027 1 X+0.069 6	1.000 0	359.4～5 750.4
大黄酚	Y=0.170 3 X−11.387 0	0.999 5	81.2～1 299.2
大黄素甲醚	Y=0.491 5 X−1.264 8	1.000 0	89.4～1 430.4

次，计算得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 值分别为 0.19%、0.12%、0.14%、0.13%、0.16%。

2.6 重复性试验

精密称取批号 20150903 清火片样品 6 份，制备供试品溶液，各吸取 20 μL 进行测定，计算得游离蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数 RSD 值分别为 0.21%、0.30%、0.14%、0.11%、0.22%，总蒽醌中各成分 RSD 值分别为 0.77%、1.01%、0.95%、0.86%、1.23%。

2.7 稳定性试验

取批号 20150903 清火片样品总蒽醌供试品溶液，分别于配制后 0、2、4、8、14、18、24 h 吸取 20 μL 进行测定，计算得游离蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数 RSD 值分别为 0.55%、0.66%、0.89%、0.48%、0.97%，总蒽醌中各成分质量分数 RSD 值分别为 0.61%、0.70%、0.58%、0.27%、0.33%，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

精密称取批号 20150903 清火片样品约 1.0 g，共 6 份，游离蒽醌、总蒽醌分别加入芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品各均为 0.402 4、0.520 8、1.119 8、1.624 0、2.980 0 mg，分别制备供试品溶液，进样测定，计算各成分的回收率。计算得游离蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 93.9%、90.8%、96.2%、92.9%、89.2%，RSD 值分别为 2.2%、2.4%、1.0%、2.4%、0.6%；总蒽醌中总芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 100.2%、85.7%、99.2%、104.5%、104.2%，RSD 值分别为 2.5%、2.2%、3.7%、0.5%、0.7%。

2.9 样品测定

精密称取 10 个不同批次清火片 2.0 g（每批 3 份），制备供试品溶液，按 HPLC-UV 法[2-3]和 HPLC-FLD 法测定，按照标准曲线法计算，结果见表 2～4。

表 2 不同批次清火片中蒽醌测定结果（n=3）

Table 2 Determination of anthraquinones in different batches (n = 3)

样品	游离蒽醌总量/(μg·g^{-1})				总蒽醌总量/(μg·g^{-1})			
	HPLC-FLD	RSD/%	HPLC-UV	RSD/%	HPLC-FLD	RSD/%	HPLC-UV	RSD/%
A	370.22	1.5	384.04	1.9	803.94	1.1	806.94	0.9
B	2 489.90	0.9	2 519.87	1.1	2 666.42	0.9	2 636.72	1.2
C	4 229.15	1.2	4 315.26	1.8	5 915.61	1.8	6 105.22	2.0
D	2 681.16	0.1	2 677.48	0.9	2 681.33	0.8	2 650.79	1.1
E	328.95	1.7	348.74	1.9	762.76	1.1	778.30	0.5
F	457.04	1.8	475.32	0.8	859.11	0.4	912.19	0.6
G	2 211.45	0.3	2 202.31	0.7	2 331.32	0.6	2 306.78	1.0
H	523.41	1.6	536.31	1.7	754.80	1.5	770.99	1.8
I	2 138.31	1.7	2 237.04	1.8	3 752.04	1.0	3 818.74	1.6
J	4 136.24	0.8	3 893.82	1.0	4 634.44	0.5	4 609.74	0.8

表 3 不同批次清火片中游离蒽醌测定结果（n=3）

Table 3 Determination of free anthraquinones in Qinghuo Tablets of different batches (n = 3)

检测方法	样品	质量分数/(μg·g^{-1})				
		芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
HPLC-FLD	A	34.49	62.98	75.68	156.07	41.00
	B	228.06	276.30	596.29	1 094.32	294.93
	C	613.00	180.31	396.80	2 493.99	545.05
	D	232.08	289.04	643.53	1 196.40	320.10
	E	30.23	37.82	72.82	147.40	40.68
	F	54.77	81.71	93.78	181.27	45.51
	G	205.24	280.39	493.27	962.49	270.07
	H	50.71	75.60	103.61	238.25	55.24
	I	180.20	202.81	392.10	1 114.23	248.98
	J	367.36	392.85	651.98	2 211.90	512.15
HPLC-UV	A	36.86	79.42	73.71	153.82	40.23
	B	242.87	308.48	600.98	1 072.30	295.24
	C	675.09	251.50	393.01	2 448.99	546.68
	D	243.50	315.00	639.03	1 162.93	317.03
	E	39.53	51.73	71.56	145.98	39.94
	F	60.90	100.00	89.13	180.51	44.79
	G	214.10	301.20	480.05	941.35	265.62
	H	55.71	94.37	95.52	236.83	53.89
	I	197.47	327.00	383.56	1083.77	245.23
	J	377.45	272.39	598.05	2140.83	505.10

表 4 不同批次清火片中总蒽醌测定结果（n=3）

Table 4 Determination of total anthraquinones in Qinghuo Tablets of different batches (n = 3)

检测方法	样品	质量分数/(μg·g^{-1})				
		芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
HPLC-FLD	A	94.33	109.28	214.03	299.80	86.50
	B	256.24	297.41	638.28	1 166.18	308.31
	C	994.34	233.83	671.59	3 239.88	775.97
	D	246.18	298.78	641.06	1 179.71	315.60
	E	90.78	75.76	149.73	355.02	91.47
	F	110.26	134.84	227.10	332.75	54.17
	G	224.12	293.69	527.67	1 003.82	282.02
	H	75.56	101.51	181.15	311.63	84.96
	I	382.96	299.26	854.26	1 768.41	447.14
	J	437.60	448.69	772.13	2 396.90	579.11
HPLC-UV	A	97.11	111.13	211.74	299.56	85.41
	B	265.49	284.55	637.72	1 141.73	307.22
	C	1101.38	205.51	681.78	3 302.71	813.84
	D	254.18	255.48	654.30	1 168.46	318.37
	E	97.26	68.62	155.28	363.14	94.00
	F	116.68	120.52	235.56	340.28	99.15
	G	233.19	256.14	534.84	999.29	283.32
	H	89.37	94.52	183.10	318.73	85.28
	I	447.37	283.96	873.97	1 748.40	465.04
	J	453.60	410.48	774.53	2 383.07	588.07

分析表 2 结果可知，B、D、G 批次（同一厂家不同规格、批号）中结合蒽醌的含量最低。从表 3、4 样品测定结果可知，不同批次清火片样品之间游离蒽醌、总蒽醌的含量差异较大，大致可分为 3 类，以 C、J 批次最高；B、G、D、I 批次次之；A、E、F、H 批次（同一厂家不同规格、批号）含量最低。

3 讨论

对于蒽醌类化合物的检测，文献报道和《中国药典》2015 年版一部中多采用紫外检测法[4-6]，而对于蒽醌类化合物的抗菌活性、药动力学则采用荧光检测法[7-8]；根据文献报道[9]再结合本研究结果，可知两种方法测定蒽醌类成分其线性范围、平均回收率均符合要求。从表 3 显示亦可知，两种方法测得结果 RSD 值均小于 2%，表明两种方法测定结果无明显差异。然而 HPLC-UV 法中 5 种蒽醌类成分虽能分离，但易受相邻杂质峰的干扰，尤其对于药味较多的中成药干扰更甚，影响精准的定量分析。而相对于紫外检测器，荧光检测器具有较高灵敏度、较宽线性范围，又具有良好的选择性，加之待测物均有荧光吸收，且在特定的激发、发射波长下内源物干扰少，图谱峰对称因子高，既能实现有效分离又可准确定量。故本研究参考文献综合考虑 5 种成分峰形、吸收值，采用优化的流动相甲醇－0.1%磷酸溶液（78∶22），以激发波长为 435 nm，发射波长为 515 nm 测定清火片中蒽醌类成分的含量。

从文献报道[10-11]及本研究的测定结果可知，不同厂家大黄的指标成分含量差异大，反映出其大黄的质量及其投入量等相关问题；从结合蒽醌的含量差异亦可知，处方加工工艺对成分的破坏，尤其湿热灭菌对大黄成分的影响，皆因清火片的标准简单，致使市售的清火片质量参差不齐，继而不能有效地治疗疾病。为了用药的有效性、安全性，需要对清火片进行多成分监测以更加全面地控制其质量。

参考文献

[1] 邓丽红, 谢 臻, 麦蓝尹, 等. 蒽醌类化合物抗菌活性及其机制研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(21): 2450-2455.

[2] 国家药典委员会. 中国药典 2015 年版 [S]. 一部. 北京: 中国科技出版社, 2015: 1472-1474.

[3] 冯素香, 李晓玉, 周悌强, 等. HPLC-UV 与 HPLC-FLED 对比分析大黄药材中蒽醌类成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 70-74.

[4] 薛小平, 鹿燕敏, 王 倩, 等. HPLC 法测定清热解毒方芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 6-8.

[5] 贺凡珍, 蔡学莹, 彭 维, 等. HPLC 法同时测定酒大黄中 5 种蒽醌的含量 [J]. 中药材, 2011, 34(9): 1384-1385.

[6] 冯素香, 吴 加, 李建生, 等. 大黄 5 个蒽醌类成分与大鼠血浆蛋白结合率的测定 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(1): 1-5.

[7] 韩媛媛, 王利勇, 杜光玲, 等. HPLC-荧光检测法测定东乐膏中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1016-1018.

[8] 刘春辉, 江振洲, 黄 鑫, 等. 大黄蒽醌类药物影响大黄素在 Caco-2 细胞中的摄取吸收行为(英文) [J]. 中国天然药物, 2008, 6(4): 298-301.

[9] 杜闻杉, 潘伟东, 刘一鑫, 等. 不同厂家清火片中蒽醌含量的比较及聚类分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(3): 579-582.

[10] 姚 亮. HPLC 法测定清火片中大黄素和大黄酚的含量及含量均匀度 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(21): 39-40.

[11] 杜闻杉, 潘伟东, 刘一鑫, 等. 不同厂家清火片中蒽醌含量的比较及聚类分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(3): 579-582.