

品生物制品检定所提供。

样品: 牙敏宁喷雾剂(杭州西泠医药保健品厂), 方法学研究使用的批号为 2000722。

## 2 实验方法与结果

2.1 紫外吸收波长的研究: 黄芩苷对照品溶液在 277 nm 处有最大吸收, 故本含量测定项选择 277 nm 作为检测波长。

2.2 色谱条件: 色谱柱: Suntek Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5% 磷酸水溶液 (53 : 47); 检测波长: 277 nm; 流速: 1.0 mL/min。样品中黄芩苷含量测定的流动相选择 甲醇-0.5% 磷酸水溶液 (53 : 47) 为流动相。黄芩苷峰的  $t_R$  约为 13 min。

2.3 线性关系考察: 精密吸取黄芩苷对照溶液 0.051 5, 0.103 0, 0.206 0, 0.412, 0.618 μg, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件进行测定, 以黄芩苷吸收峰面积的积分值为纵坐标  $Y$ , 进样量  $X$  (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 线性回归方程:  $Y = 52\ 138.9 + 1\ 727\ 153X$ ,  $r = 0.999\ 9$ , 在 0.051 5 ~ 0.618 μg 范围内呈线性关系。

2.4 对照品溶液与供试品溶液的制备: 对照品溶液的制备: 精密称取黄芩苷对照品适量, 加 50% 甲醇水溶液, 制成每 1 mL 含黄芩苷 20.6 μg 的溶液。

供试品溶液的制备: 取牙敏宁喷雾剂 1.0 mL,

置 10 mL 容量瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.5 精密度试验: 精密吸取对照品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定 6 次, 得样品中黄芩苷的平均含量为 0.184 mg/mL,  $RSD = 1.90\%$ 。

2.6 稳定性试验: 精密吸取供试品溶液 10 μL, 每隔 60 min 进样 1 次, 测定 5 次后, 再过 24 h 测定 1 次, 结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定,  $RSD = 2.39\%$  ( $n = 6$ )。

2.7 重现性试验: 取同批号牙敏宁喷雾剂 6 份, 依法测定, 结果平均含量为 0.178 mg/mL,  $RSD$  为 2.09%。

2.8 回收率试验: 精密吸取供试品 0.5 mL 加入到 10 mL 的容量瓶, 精密加入黄芩苷对照品适量, 加 50% 甲醇水溶液稀释至刻度, 按供试品溶液制备法制备, 依法测定, 平均回收率为 101.87%,  $RSD$  为 1.49% ( $n = 6$ )。

2.9 样品测定: 精密吸取供试品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定黄芩苷含量, 结果 10 批平均含量为 0.17 mg/mL,  $RSD = 0.98\%$ 。

2.10 限量的制定: 根据 10 批样品测定结果: 每 1 mL 牙敏宁喷雾剂含黄芩以黄芩苷 ( $C_{21}H_{18}O_{11}$ ) 计, 不得少于 0.12 mg。

# 测定大黄蒽醌类成分样品制备方法的研究

魏俊峰<sup>1</sup>, 王乃婕<sup>2</sup>, 伍孝先<sup>1</sup>, 王洪志<sup>1</sup>

(1. 天津市中西医结合急腹症研究所, 天津 300100; 2. 天津乐仁堂制药厂, 天津 300122)

中图分类号: TQ461, R927.2

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2001)11-0993-03

大黄中含有多种化学成分, 其中以蒽醌衍生物最能代表大黄的泻下、抑菌、止血等作用。此类成分测定方法, 本文参考文献<sup>[1,2]</sup>, 对用氯仿回流提取游离型蒽醌和用硫酸水解蒽苷氯仿抽提的方法进行了研究。

## 1 仪器和材料

仪器: Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪。

对照品: 芦荟大黄素 (aloe-emodin), 大黄酸 (rhein), 大黄素 (emodin), 大黄酚 (chrysophanol),

大黄素甲醚 (physcion) 购自中国药品生物制品检定所。

试剂: 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

样品: 本实验所用大黄药材样品由作者购自不同产地, 经北京大学医学部药学院郑俊华教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根及根茎。

## 2 方法和结果

选择大黄药材中所含的游离型蒽醌和总蒽醌作为测定的指标,分别对其样品制备方法进行了考查。

2.1 色谱条件<sup>[3]</sup>:流动相:甲醇-1%高氯酸水溶液(85:15);检测波长:254 nm;柱温:25℃;流速:1.0 mL/min。

2.2 游离型蒽醌样品制备方法筛选:采用氯仿回流提取的方法,分别对回流时间、溶剂的用量等条件进行筛选。

2.2.1 回流时间的筛选:设计了3个水平的回流时间,水平1:30,20,20,20 min;水平2:60,30,30,30 min;水平3:90,30,30,30 min。结果见表1。选用水平1的回流时间。

2.2.2 溶剂用量筛选:设计了3个水平溶剂用量,水平1:30,20,20,20 mL;水平2:40,20,20,20 mL;水平3:50,25,25,25 mL。结果见表1。

根据表1结果,选用水平3溶剂用量。

试验基本确定游离型蒽醌样品制备方法,即取大黄药材粉末(通过4号筛)0.1 g,精密称定,于100 mL圆底烧瓶中,第一次加入氯仿50 mL,水浴回流

表2 水解用硫酸浓度及用量实验结果(相当于大黄药材 mg/g)

水平	酸浓度			酸用量			
	1	2	3	1	2	3	4
aloe-emodin	3.391	3.611	3.615	3.441	3.756	3.654	3.749
rhein	4.002	4.869	4.759	4.040	4.531	4.534	4.932
emodin	5.182	5.233	5.023	4.417	4.700	4.637	4.919
chrysophanol	8.781	9.147	8.725	7.320	7.584	7.385	7.494
physcion	2.619	2.754	2.570	2.759	2.758	2.804	2.851
totals	23.975	25.614	24.692	21.977	23.329	23.014	23.944

2.3.2 水解硫酸用量筛选:设计了4个水平的硫酸用量,水平1:1.5 mL;水平2:2.5 mL;水平3:3.5 mL;水平4:5.0 mL。结果见表2。根据以上结果,决定选用水平4硫酸用量。

2.3.3 水解温度筛选:设计了3个水平的水解温度,水平1:70℃;水平2:80℃;水平3:90℃。结果见表3。选用水平2水解温度。

表3 水解温度及时间实验结果(相当于大黄药材 mg/g)

水平	水解温度			水解时间		
	1	2	3	1	2	3
aloe-emodin	3.795	4.013	3.790	3.813	3.794	3.706
rhein	4.543	5.181	4.730	4.953	4.701	5.018
emodin	4.997	5.207	4.860	5.102	5.207	5.049
chrysophanol	7.772	8.038	8.002	8.285	8.478	8.398
physcion	2.902	3.003	2.881	2.835	2.907	2.803
totals	24.009	25.442	24.263	24.988	25.087	24.974

2.3.4 水解时间筛选:设计了3个水平的水解时间,水平1:1 h;水平2:2 h;水平3:3 h。结果见表3。选用水平2水解时间。

30 min,分取上清液,第二次加入氯仿25 mL,水浴回流20 min,分取上清液,反复提取至上清液无色,合并,滤过,回收溶剂至干,用甲醇溶解残渣,定容于5 mL量瓶中,过膜,取续滤液即得。

表1 回流时间及溶媒用量筛选结果

(相当于大黄药材 mg/g)

水平	回流时间			溶媒用量		
	1	2	3	1	2	3
aloe-emodin	0.131	0.124	0.125	0.131	0.134	0.134
rhein	0.172	0.157	0.163	0.172	0.175	0.171
emodin	0.403	0.395	0.403	0.403	0.398	0.404
chrysophanol	1.196	1.196	1.211	1.196	1.263	1.286
physcion	0.356	0.355	0.362	0.356	0.309	1.279
totals	2.258	2.227	2.264	2.258	2.279	2.299

2.3 总蒽醌样品制备方法筛选:采用将结合型蒽醌用硫酸水解成游离型蒽醌的方法进行测定,分别对水解用硫酸的浓度、用量、水解温度、水解时间等条件进行了筛选试验。

2.3.1 水解用硫酸浓度筛选:设计了3个水平的硫酸浓度,水平1:10%;水平2:20%;水平3:30%。结果见表2。选用水平2硫酸浓度。

实验基本确定总蒽醌样品制备方法,即取大黄药材粉末(通过4号筛)0.06 g,称定,于100 mL圆底烧瓶中,加入20%硫酸5.0 mL,室温振摇5 min,加入氯仿50 mL,水浴加热(80℃)回流水解2 h,放至室温,分取氯仿层,第二次加入氯仿20 mL振摇,分取氯仿层,反复抽得至氯仿层无色,合并,加入适量无水硫酸钠脱水,滤过,用少量氯仿洗涤残渣,回收溶剂至干,用甲醇溶解残渣,定容于25 mL量瓶中,过膜,取续滤液即得。

2.4 重复性试验:按照2.2和2.3项下确定的样品制备方法分别制备6份样品,结果见表4。

2.5 回收率试验:采用加样回收法,取已知含量的大黄药材粉末,分别加入一定量的对照品混合溶液依法测定回收率,结果见表4。

以上重复性试验数据说明除大黄酸RSD值偏高外,其余4种成分均符合要求,表明本法重复性良好。加样回收率试验数据说明除大黄酸偏高外,其余

4 种成分均小于 2%, 表明本方法可行。

2.6 样品测定: 通过上述试验决定大黄药材中游离型蒽醌和总蒽醌的含量均以芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量之和计, 我们收集了 9 批大黄药材, 根据上述实验方法, 分别测定其游离型蒽醌和总蒽醌的含量, 以此确定大黄药材的含量限度。含量

测定结果见表 5。

根据上述 9 批大黄药材的测定结果, 个子货 (1~5) 中游离型蒽醌含量在 0.528~5.365 mg/g 之间, 总蒽醌含量在 15.850~26.822 mg/g 之间, 饮片 (6~9) 中游离型蒽醌含量在 4.804~7.723 mg/g 之间, 总蒽醌含量在 15.923~18.403 mg/g 之间。

表 4 重复性试验和加样回收率试验结果

试验项目		RSD (%)					
		aloe-emodin	rhein	emodin	chryso- phanol	physcion	totals
重复性试验	游离型蒽醌	1.38	2.68	0.93	0.68	0.65	0.56
	总蒽醌	1.58	3.14	0.23	0.27	0.85	0.76
加样回收率试验	游离型蒽醌	1.83	12.01	1.32	0.98	0.76	0.76
	总蒽醌	1.92	4.41	0.60	1.04	1.96	1.00

表 5 9 批药材含量测定结果

(mg/g)

批次	游离蒽醌					总蒽醌				
	aloe-emodin	emodin	chryso- phanol	phys- cion	totals	aloe-emodin	emodin	chryso- phanol	phys- cion	totals
1	0.132	0.492	1.123	0.355	2.102	4.003	4.730	8.383	3.169	20.285
2	0.132	0.499	1.139	0.360	2.130	2.762	4.942	7.349	2.773	17.826
3	0.343	0.929	3.194	0.898	5.364	3.756	5.980	12.492	4.594	26.822
4	0.049	0.172	0.277	0.076	0.574	3.560	8.461	8.664	2.224	22.909
5	0.038	0.099	0.279	0.112	0.528	2.684	3.480	7.006	2.680	15.850
6	0.420	1.031	3.035	0.887	5.373	2.398	3.606	7.700	2.219	15.923
7	0.324	0.976	2.676	0.828	4.804	2.453	4.424	7.862	2.434	17.173
8	0.565	1.303	4.540	1.315	7.723	2.694	3.883	9.213	2.613	18.403
9	0.462	1.178	3.819	1.127	6.586	2.540	3.829	9.056	2.488	17.913

### 3 结论

3.1 在总蒽醌样品制备方法的试验中, 用水浴加热, 受热均匀且温度容易控制, 效果较好。

3.2 在文献<sup>[3-5]</sup>中大多采用同一份样品分别测定游离型和结合型蒽醌的方法, 但通过试验发现在制备游离型蒽醌样品的过程中, 需离心、滤过等操作, 影响结合型蒽醌测定的准确性, 本研究采用分别取样测定游离型和总蒽醌含量的方法, 避免了上述缺点, 使操作更简单、易行。

3.3 通过回收率实验发现, 大黄酸的回收率不合格, 游离型蒽醌样品较低 (68.54%), 总蒽醌样品较高 (106.66%), 有待进一步研究。

3.4 在《中国药典》2000 年版一部大黄项下含量测定项仅测定其总蒽醌的含量, 而且仅以大黄素和大黄酚的含量之和计算, 并不能全面评价大黄的品质, 本研究分别测定其游离型和总蒽醌的含量, 并以 4 种主要成分的含量作为标准, 对评价大黄药材的质

量起到一定的作用。

3.5 通过对 9 批药材样品的测定发现大黄个子货和饮片之间游离型蒽醌的含量差别较大, 说明在大黄炮制过程中有结合型蒽苷水解成为游离型蒽醌, 使具有泻下作用的结合型蒽苷的含量降低, 建议在大黄饮片切制应减少浸泡时间, 以保证药效。

参考文献:

- [1] Pairs R, Moyses H. Dosage colorimetric des derives anthraceniques - application a des rhubarbes cultivees en France [J]. Ann Pharm Franc, 1958, 16: 561-573.
- [2] 王慕邹, 梁 彬, 沙世炎, 等. 植物药中一些主要成分测定方法的研究. 蒽醌的测定方法[J]. 药学学报, 1963, 10(12): 720-723.
- [3] 富 戈, 徐秉玖, 陆 艳, 等. 唐古特大黄中五种游离和结合蒽醌各自含量的测定[J]. 北京医科大学学报, 1998, 30(6) 增刊: 20-21.
- [4] 宗玉英, 余满堂, 朱志强, 等. 胶束电动毛细管色谱法分离和测定几种大黄含量[J]. 药学学报, 1995, 30(8): 594-597.
- [5] 苏学良, 陈琼华. 中药大黄的综合性研究. 蒽醌衍生物的纸上层析[J]. 药学学报, 1963, 10(12): 725-730.

· 欢迎订阅《中国医院药学杂志》·

中国药学会主办, 中国科协主管的国内外公开发行的专业性学术期刊。旨在交流和推广医院药学成果和实践经验, 反映医院药学工作者的学术水平。本刊为中文核心期刊、国家统计局源期刊、全国性期刊, 并加盟中国期刊网, 列入国家知识基础工程。本刊为月刊, 每月 18 日出版。每期定价 8.5 元。国外代号 M 38, 邮发代号: 38-50。

编辑部地址: 武汉市胜利街 177 号, 邮政编码: 430014, 广告经营许可证武工商广字: 01-7 号, 网址: <http://www.chinainfo.gov.cn/periodical/zggyyx/index.htm> E-mail: [pharmacy@public.wh.hb.cn](mailto:pharmacy@public.wh.hb.cn)