

高效液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱峰面积,根据标准曲线计算各配伍比例时甘草酸含量的含量( $n=3$ ),以甘草海藻药对不同配伍比例为横坐标,甘草酸含量为纵坐标作图,结果见图2。

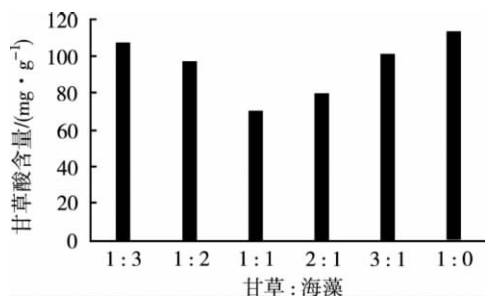


图2 甘草-海藻不同配伍比例时甘草酸含量柱形图

Fig.2 Column diagram of glycyrrhizic acid content in the compatibility of *Glycyrrhiza uralensis* and *Sargassum fusiforme* in different ratio

### 3 讨论

本实验考察了中药传统水煎煮,甲醇、乙醇2种溶剂以及回流、超声2种提取方式,结果甲醇回流提取得最高,最终选择了甲醇回流提取。

由于甘草酸是有机酸,易电离,醋酸铵溶液加入少量醋酸可减少拖尾,改善峰形,且分离效果较好,加入乙腈可以改善基线的平稳。因此选择甲醇-乙腈-0.2 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵溶液-冰醋酸(45:15:40:1)为流动相。

笔者曾以正交实验设计法对甘草酸的提取工艺进行优化,以甘草酸的提取率为指标,考察了醇浓度、料液比、提取时间和提取次数对提取效果的影响,经过直观分析和方差分析,结果显示以12倍量的体积分数为60%的甲醇溶液、提取3次,每次1h,能获得最好的提取效果。

甘草海藻配伍后,会导致甘草酸的明显变化,随着甘草海藻配伍比例由1:3,1:2,1:1变化时,甘草酸含量明显降低,并且当配伍为1:1时含量最低。随着配伍比例为1:1,2:1,3:1时,由于甘草在配伍中比例的提高,甘草酸的含量逐渐提高。这说明甘草海藻配伍时,会影响有效成分甘草酸的变化,可能正是由于成分的变化导致疗效的降低,或许可以揭示甘草海藻配伍禁忌的物质基础。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.04.033

#### [参考文献]

- [1] 王玮莉,王绪前.海藻可与甘草同用[J].长春中医药大学学报,2010,26(1):63-64.
- [2] 颜辉,王国基,陈坚.不同比例海藻与甘草配伍对大鼠的毒性研究[J].中国中药杂志,2007,32(16):1700-1703.
- [3] 黄业斌,张翠珍.浅谈十八反在海藻玉壶汤中的运用[J].辽宁中医杂志,2004,31(7):607-608.
- [4] 陈江飞,徐萍,朱素燕,等.中药甘草的药动学以及药物相互作用研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(10):1174-1182.

## 高效液相色谱法测定牛黄解毒滴丸中大黄素和大黄酚含量

陈敬然<sup>1</sup>,谢飞<sup>2</sup>,尹晓飞<sup>1</sup>,刘晋华<sup>1</sup>,王爱萍<sup>1</sup>

(1.解放军第251医院药剂科,河北张家口 075000;2.河北省张家口市第四医院药剂科,075000)

**[摘要]** 目的 采用高效液相色谱法测定牛黄解毒滴丸中大黄素和大黄酚含量。方法 色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15);流速:1 mL·min<sup>-1</sup>;紫外检测波长:254 nm;柱温:30 ℃。结果 大黄素在2.36~37.72 μg·mL<sup>-1</sup>范围内线性关系良好,平均回收率分别为99.56%,RSD=1.1%( $n=9$ );大黄酚在6.41~102.60 μg·mL<sup>-1</sup>范围内线性关系良好,平均回收率99.89%,RSD=1.8%( $n=9$ )。结论 该方法简便,准确,可作为牛黄解毒滴丸质量控制的方法。

**[关键词]** 牛黄解毒滴丸;大黄素;大黄酚;色谱法,高效液相

**[中图分类号]** R286;R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2011)04-0500-03

### Content Determination of Emodin and Chrysophanol in Niu Huang Jiedu Dropping Pill by HPLC

CHEN Jing-ran<sup>1</sup>, XIE Fei<sup>2</sup>, YIN Xiao-fei<sup>1</sup>, LIU Jin-hua<sup>1</sup>, WANG Ai-ping<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, the 251<sup>st</sup> Hospital of the PLA, Zhangjiakou 075000, China; 2. Department of Pharmacy, the Fourth Hospital of Zhangjiakou City of Hebei Province, 075000, China)

**ABSTRACT Objective** To establish a HPLC method for determination of emodin and chrysophanol in *niu Huang jiedu* dropping pill. **Methods** Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column was used; the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid (85: 15); the flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup> and column temperature was at 30 °C; the detection wave-length was 254 nm. **Results** There was a good linear relationship of emodin and chrysophanol at range from 2.36-37.72 μg · mL<sup>-1</sup> and 6.41-102.60 μg · mL<sup>-1</sup>, respectively; the average recoveries were 99.56% (RSD = 1.1%, n = 9) and 99.89% (RSD = 1.8%, n = 6), respectively. **Conclusion** This method is convenient, accurate and reproducible for determination of emodin and chrysophanol in *niu Huang jiedu* dropping pill.

**KEY WORDS** *Niu Huang jiedu* dropping pill; Emodin; Chrysophanol; HPLC

牛黄解毒滴丸为我院自制制剂(批准文号:北联制字[2004]FP06014),主要由人工牛黄、大黄、黄芩、冰片等组方而成,具有清热解毒的功效,主要用于治疗火热内盛、咽喉肿痛、牙龈肿痛、口舌生疮、目赤肿痛等症状。临床应用较为广泛。《中华人民共和国药典》2005年版一部中通过控制黄芩中黄芩苷的含量以控制牛黄解毒片的质量。由于本制剂中大黄的含量也较多,而大黄中主要含有大黄素、大黄酚、大黄酸等成分,故笔者采用高效液相色谱(HPLC)法同时对牛黄解毒滴丸中大黄素和大黄酚的含量进行测定,报道如下。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,岛津 SPD-M20A 二极管阵列检测器,CTO-20A 柱温箱,Workstation 多通道工作站;德国赛多利斯 BP211D 电子分析天平;昆山超声仪器有限公司 KQ-400DB 数据超声处理器。

**1.2 试剂** 大黄素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110756-200110),大黄酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号:1100796-200310),甲醇(色谱纯),其余试剂为分析纯,牛黄解毒滴丸(解放军第 251 医院制剂室提供,批号:20070509,20080102,20080722)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15);流速:1 mL · min<sup>-1</sup>;紫外检测波长:254 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL。

**2.2 供试品溶液的制备** 取牛黄解毒滴丸样品 100 粒,研细,精密称取约 1 g 置锥形瓶中,精密加乙醇 50 mL,密塞,称定质量,置水浴上加热回流 1 h,放冷,用乙醇补足缺失的质量,滤过,精取续滤液 25 mL,置烧瓶中,水浴蒸干,加 30% 乙醇-盐酸(10:1)溶液 30 mL,置水浴中加热水解 1 h,立即冷却,用三氯甲烷

强力振摇提取 4 次,每次 15 mL,合并三氯甲烷液,在水浴上蒸干,残渣用无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)溶解,移至 50 mL 量瓶中,稀释至刻度,即得。另取缺大黄的阴性样品同法制得阴性对照液备用。

**2.3 系统适应性实验** 分别取供试品溶液、阴性对照溶液和对照品溶液,按照“2.1”项色谱条件,进样 20 μL 测定。在此条件下大黄素峰的理论塔板数为 4 786,大黄酚峰的理论塔板数为 9 956;大黄素与大黄酚峰的分离度为 7.23;阴性对照无干扰。见图 1。

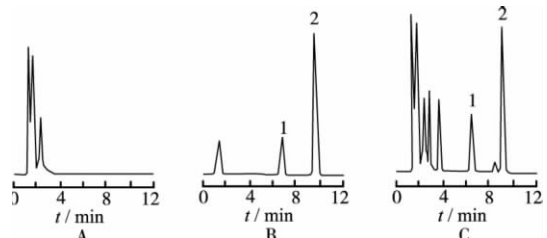


图 1 阴性对照品、对照品和供试品的 HPLC 色谱图

1. 阴性对照品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 大黄素; 2. 大黄酚

**Fig. 1 HPLC chromatogram of negative reference substance, reference substance and niu Huang jiedu dropping pill sample**

A. negative reference substance; B. reference substance; C. sample; 1. emodin; 2. chrysophanol

**2.4 标准曲线的绘制** 分别精密称取大黄素和大黄酚对照品适量,加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)适量溶解,并定量稀释成含大黄素 94.3 μg · mL<sup>-1</sup> 和大黄酚 256.5 μg · mL<sup>-1</sup> 的储备液。分别精密量取此储备液 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mL, 用无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)定量稀释至 10 mL, 在上述色谱条件下进样分析,测定峰面积值(A),并以 A 对进样浓度(C)进行回归,绘制标准曲线。结果大黄素回归方程:  $A = 3.5713 \times 10^4 C + 3.3186 \times 10^3$ ,  $r = 0.9998$ , 线性范围 2.36 ~ 37.72 μg · mL<sup>-1</sup>。大黄酚回归方程:  $A = 4.7794 \times 10^4 C - 2.6250 \times 10^4$ ,  $r = 0.9999$ , 线性范围: 6.41 ~ 102.60 μg · mL<sup>-1</sup>。

**2.5 稳定性实验** 取对照品溶液(含大黄素 9.43 μg · mL<sup>-1</sup> 和大黄酚 25.65 μg · mL<sup>-1</sup>), 分别于 0, 4, 8, 24 h 在上述色谱条件下测定,峰面积基本不变。大黄素的相对标准偏差(RSD)为 0.56%, 大黄酚的

[收稿日期] 2010-06-14 [修回日期] 2010-07-16

[作者简介] 陈敬然(1970-),女,河北博野人,副主任医师,学士,研究方向:医院制剂与临床药学研究。电话:(0)13582980919, E-mail: yxf790724@163.com。

RSD 为 0.81%。

**2.6 精密度实验** 取对照品溶液(含大黄素 9.43 μg · mL<sup>-1</sup> 和大黄酚 25.65 μg · mL<sup>-1</sup>)，在上述色谱条件下连续测定 5 次，大黄素的 RSD 为 0.47%，大黄酚的 RSD 为 0.60%。

**2.7 重复性实验** 按照拟订的含量测定方法，取同批号样品 5 份，分别制备样品供试液，在上述色谱条件下测定 5 次，大黄素的 RSD 为 1.10%，大黄酚的 RSD 为 0.94%。

**2.8 回收率实验** 取已知含量的样品(批号: 20080722)，分别加入大黄素和大黄酚对照品储备液 4, 5, 6 mL，取牛黄解毒滴丸样品 100 粒，研细，精密称取约 1 g 置锥形瓶中，分别精密加乙醇 46, 45, 44 mL，再按“2.2”项中所述方法操作，在上述色谱条件下测定，结果见表 1, 2。经低、中、高 3 种浓度各 3 次实验，大黄素和大黄酚的加样回收率结果均在 95% ~ 105% 之间。大黄素的平均回收率 99.56%，RSD = 1.1% (n = 9)；大黄酚的平均回收率 99.89%，RSD = 1.8% (n = 9)。

**2.9 含量测定** 对 3 批样品的含量测定结果见表 3。

表 1 大黄素的加样回收率测定结果

Tab.1 Recovery of emodin

样品量/ g	已知含量	加入量	测得量	回收率/ %
0.502 3	0.412	0.377	0.786	99.20
0.510 2	0.418	0.377	0.800	101.33
0.500 6	0.410	0.377	0.788	100.27
0.500 9	0.411	0.472	0.873	97.88
0.498 2	0.409	0.472	0.883	100.42
0.496 3	0.407	0.472	0.872	98.52
0.497 6	0.408	0.566	0.967	98.76
0.517 2	0.424	0.566	0.991	100.18
0.501 4	0.411	0.566	0.974	99.47

表 2 大黄酚的回收率测定结果

Tab.2 Recovery of chrysophanol

样品量/ g	已知含量	加入量	测得量	回收率/ %
0.502 3	1.145	1.026	2.158	98.73
0.510 2	1.163	1.026	2.194	100.49
0.500 6	1.136	1.026	2.141	97.95
0.500 9	1.142	1.283	2.442	101.33
0.498 2	1.131	1.283	2.415	100.08
0.496 3	1.128	1.283	2.403	98.38
0.497 6	1.135	1.539	2.640	97.79
0.517 2	1.179	1.539	2.749	102.01
0.501 4	1.152	1.539	2.726	102.27

3 讨论

笔者在本实验对多种流动相条件及检测波长进行

比较<sup>[1-8]</sup>，结果发现大黄素与大黄酚在 254 nm 波长处有较好的吸光度，以甲醇-0.1% 磷酸(85 : 15) 作为流动相时所得色谱图中主峰分离较好，柱效较高，理论塔板数、拖尾因子等参数均符合要求，样品测定无干扰，是比较理想的色谱条件。

表 3 3 批样品的含量测定结果

Tab.3 Results of content determination of 3 groups of samples

批号	大黄素含量	大黄酚含量
20070509	0.82	2.28
20080102	0.83	2.28
20080722	0.82	2.27

在制备供试品溶液时，笔者参考《中华人民共和国药典》2005 年版一部中大黄、三黄片的样品处理方法<sup>[1]</sup>。还曾分别采用甲醇超声提取 30 min<sup>[2]</sup>、60 min，甲醇超声 1 h 后酸化提取<sup>[3]</sup>，加热回流 1 h<sup>[7]</sup>、3 h，加热回流后酸化提取<sup>[8-9]</sup>等方法处理样品，结果所测含量与本实验结果相比，含量偏低。

实验结果表明，采用 HPLC 法测定牛黄解毒滴丸中大黄素和大黄酚的含量，操作方法简便、灵敏度高、结果准确、重复性好，可以作为牛黄解毒滴丸生产中质量控制的标准。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.04.034

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 17, 328.

[2] 华小东, 王智华, 王菊美, 等. HPLC 同时测定黄疽茵陈颗粒中大黄素、大黄酸、大黄酚的含量 [J]. 中成药, 2002, 24 (5): 340 - 341.

[3] 孟茜, 蒋爱波, 刘焱文. HPLC 法测定病毒清片中大黄素与大黄酚的含量 [J]. 湖北中医学院学报, 2002, 4 (1): 29 - 30.

[4] 黄燕萍, 玉永富. 高效液相色谱法测定清火片中大黄素与大黄酚的含量 [J]. 医药导报, 2007, 26 (12): 1501 - 1502.

[5] 郭怡飏, 宋旭峰. 测定陆氏润元丸中大黄素与大黄酚的含量 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (1): 68 - 69.

[6] 马慧萍, 贾正平, 费改顺, 等. 慢肾康片质量标准研究 [J]. 医药导报, 2010, 29 (11): 1488 - 1491.

[7] 简晖, 魏惠珍, 杜艳龙, 等. RP-HPLC 法测定清脂六通丸中大黄素和大黄酚的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20 (1): 49 - 52.

[8] 鲍恩泉, 管水英, 蒋咏梅. HPLC 法测定黄连上清片中大黄素与大黄酚的含量 [J]. 安徽医药, 2002, 6 (4): 60 - 61.

[9] 高敬伟, 郭泽明. 高效液相色谱法测定大黄中的大黄素、大黄酚的含量 [J]. 数理医药学杂志, 2006, 19 (2): 168 - 169.