

# HPLC 测定温肾降浊散中大黄酸、大黄素及 大黄酚的含量

方衡<sup>1</sup>, 邹韬博<sup>1</sup>, 刘海洋<sup>1</sup>, 刘斌<sup>1\*</sup>, 王发善<sup>2</sup>, 张宁<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007;

2. 多多药业有限公司, 黑龙江 佳木斯 154007)

**[摘要]** 目的:建立温肾降浊散中大黄酸、大黄素及大黄酚的含量测定方法。方法:采用高效色谱法, ANGLA Promosil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 224 nm, 进样量 10 μL。结果:在上述色谱条件下, 大黄酸、大黄素及大黄酚之间有良好的分离度, 大黄酸线性范围 0.757 2~3.786 0 μg ( $r=0.999\ 4$ ), 大黄素线性范围 0.347 6~1.738 0 μg ( $r=0.999\ 3$ ), 大黄酚线性范围 1.731~8.656 μg ( $r=0.999\ 2$ ), 平均回收率分别为 101.7%, 102.6%, 101.1%, RSD 分别为 2.9%, 2.3%, 1.9%。结论:该方法简便、准确, 重复性好, 可为温肾降浊散的质量控制提供可借鉴的分析方法。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 温肾降浊散; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0091-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020091

## Simultaneous Determination of Rhein, Emodin and Chrysophanol in Wenshen Jiangzhuo Powder by HPLC

FANG Heng<sup>1</sup>, ZOU Tao-bo<sup>1</sup>, LIU Hai-yang<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>1\*</sup>, WANG Fa-shan<sup>2</sup>, ZHANG Ning<sup>1\*</sup> (1. Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China; 2. Duoduo Pharmaceutical Co. LTD, Jiamusi 154007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To simultaneously determine the contents of rhein, emodin and chrysophanol in Wenshen Jiangzhuo powder by HPLC. **Method:** An external standard method by HPLC with ANGLA Promosil C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the column temperature was 30 ℃; the detection wavelength was 224 nm, and the injection volume was 10 μL. The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and gradient elution with acetonitrile and H<sub>2</sub>O (included 0.1% phosphoric acid). **Result:** Rhein, emodin and chrysophanol were well separated by this method. Linearities of rhein, emodin and chrysophanol were good in the ranges of 0.757 2-3.786 0 μg ( $r=0.999\ 4$ ), 0.347 6-1.738 0 μg ( $r=0.999\ 3$ ), and 1.731-8.656 μg ( $r=0.999\ 2$ ), respectively. The average recoveries of rhein, emodin and chrysophanol were 101.7%, 102.6% and 101.1%, RSD were 3.0%, 2.3%, 1.9%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for quality control of Wenshen Jiangzhuo powder.

**[Key words]** HPLC; Wenshen Jiangzhuo powder; rhein; emodin; chrysophanol

中药温肾降浊散是以大黄为君药。用于治疗急慢性肾盂肾炎、急慢性肾小球肾炎、肾病综合征、慢

性肾功能不全等疾病引起的尿路感染、水肿、血尿、蛋白尿等。大黄酸、大黄素及大黄酚均为大黄中主

**[收稿日期]** 20140314(018)

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金面上项目(H201328);黑龙江省教育厅基金项目(12541758);黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划

**[第一作者]** 方衡, 硕士, 从事中药药效物质基础及体内代谢研究, Tel:13845406430, E-mail:934910969@qq.com

**[通讯作者]** \*张宁, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及体内代谢研究, Tel:0454-6050350, E-mail:zhangning0454@163.com; \*刘斌, 副教授, Tel:0454-6050350, E-mail:2214540333@qq.com

要活性成分,其中蒽醌类物质大黄酸具有较强的生理活性,也是国家药品标准大黄质控指标之一<sup>[1-4]</sup>。本实验利用高效液相色谱法<sup>[5-8]</sup>对温肾降浊散中大黄酸、大黄素、大黄酚进行含量测定,来控制温肾降浊散的质量,并为温肾降浊散的开发利用奠定基础。

### 1 仪器与试剂

Dionex P680 型液相色谱仪(美国戴安公司), BT224S 型 1/10 万电子天平(赛多利斯公司)。乙腈、甲醇(色谱纯,美国迪马公司),纯净水(杭州娃哈哈有限公司),其他试剂均为分析纯。温肾降浊散(多多药业有限公司提供)。大黄酚(批号 110796-201113),大黄素(批号 110783-201113),大黄酸(批号 110776-201113)均购自中国食品药品检定研究院。

### 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 取温肾降浊散粉末(50 目)约 0.6 g,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,用甲醇 50 mL 超声 60 min,滤过,减压浓缩后用甲醇定容至 10 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液为供试品溶液。

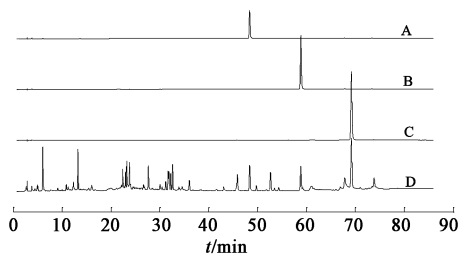
**2.2 对照品溶液的制备** 精密称定大黄酚、大黄素、大黄酸对照品 43.28, 8.69, 18.93 mg, 分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得。

**2.3 色谱条件** AGELA Promosil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B),梯度洗脱,见表 1。检测波长 224 nm,进样量 10 μL,柱温 30 °C。在此条件下,温肾降浊散样品的 HPLC 色谱图中大黄酚、大黄素、大黄酸吸收峰可与其他成分的吸收峰达到基线分离。见图 1。

表 1 温肾降浊散流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient of mobile phase

t/min	A/%	B/%	流速/mL·min <sup>-1</sup>
0	5	95	1
10	15	85	1
14	15	85	1
16	23	77	1
18	23	77	0.6
21	26	74	0.6
22	26	74	1
30	34	66	1
36	37	63	1
69	70	30	1
73	74	26	1
86	100	0	1



A. 大黄酸对照品; B. 大黄素对照品; C. 大黄酚对照品; D. 温肾降浊散样品

图 1 对照品与温肾降浊散样品 HPLC

Fig. 1 Comparison chromatogram of standard and Wenshen Jiangzhuo powder

**2.4 线性关系考察** 分别精密吸取大黄酚、大黄素、大黄酸对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配成不同浓度的对照品溶液。吸取各对照品溶液 10 μL 注入高效液相测谱仪,以峰面积(mAU \* min)积分为纵坐标,对照品溶液浓度(g·L<sup>-1</sup>)为横坐标绘制标准曲线,得大黄酚、大黄素、大黄酸回归方程分别为  $Y = 50.183X - 61.227 (r = 0.9992)$ ,  $Y = 57.707X - 10.701 (r = 0.9993)$ ,  $Y = 23.64X - 3.165 (r = 0.9994)$ , 线性范围分别为 1.731 ~ 8.656, 0.3476 ~ 1.7380, 0.7572 ~ 3.7860 μg, 表明大黄酚、大黄素、大黄酸在范围内线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 取同一浓度的大黄酚、大黄素、大黄酸对照品溶液,在上述色谱条件下分别连续测定 6 次,记录大黄酚、大黄素、大黄酸的峰面积值,3 种成分色谱峰峰面积 RSD 分别为 1.6%, 1.9%, 2.4%, 表明该仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 重复制备 6 份同一批次的温肾降浊散供试品溶液,在上述色谱条件下分别测定,记录大黄酚、大黄素、大黄酸色谱峰峰面积,其 RSD 分别为 2.3%, 2.3%, 2.4%, 表明该方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 分别取同一批次的温肾降浊散供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定,记录大黄酚、大黄素、大黄酸色谱峰峰面积,其 RSD 分别为 2.4%, 2.2%, 2.9%, 表明各样品在 24 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取 6 份已知含量的温肾降浊散约 0.3 g,分别精密吸取大黄酚对照品溶液 2.5 mL(相当于大黄酚 2.164 mg)、大黄素对照品溶液 3 mL(相当于大黄素 0.5214 mg)、大黄酸对照品 3 mL(相当于大黄酸 1.1358 mg),按 2.1 项下方法制备供试品溶液,测定。结果见表 2。

表 2 温肾降浊散中 3 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery

样品	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回 收率/%	RSD /%
大黄酚	0.299	2.052	2.164	4.206	101.1	1.9
	0.292	2.065	2.164	4.242		
	0.295	2.051	2.164	4.199		
	0.307	2.036	2.164	4.207		
	0.306	2.046	2.164	4.272		
	0.290	2.015	2.164	4.268		
大黄素	0.299	0.542	0.521	1.077	102.6	2.3
	0.292	0.524	0.521	1.072		
	0.295	0.559	0.521	1.098		
	0.307	0.563	0.521	1.090		
	0.306	0.548	0.521	1.095		
	0.290	0.578	0.521	1.094		
大黄酸	0.299	1.258	1.135	2.422	101.7	2.9
	0.292	1.256	1.135	2.398		
	0.295	1.245	1.135	2.428		
	0.307	1.268	1.135	2.423		
	0.306	1.298	1.135	2.398		
	0.290	1.236	1.135	2.428		

2.9 样品测定 取 10 批样品,制备供试品溶液,每个样品按确定的色谱条件进行分析,以外标法计算样品中大黄酚、大黄素、大黄酸的含量,见表 3。

表 3 温肾降浊散样品中 3 种成分测定

Table 3 Results of sample content

	mg·g <sup>-1</sup>		
	大黄酚	大黄素	大黄酸
	7.01	1.79	4.03
	7.23	1.79	3.99
	7.01	1.78	4.04
	7.07	1.79	3.97
	6.95	1.83	4.03
	7.01	1.81	3.99
	7.05	1.82	3.99
	7.09	1.82	4.04
	6.98	1.83	3.97
	7.04	1.81	4.00
	7.00	1.79	4.04

### 3 讨论

本实验运用高效液相色谱法对温肾降浊散中大黄酚、大黄素和大黄酸进行含量测定,结果大黄酚、大黄素、大黄酸平均质量分数为 7.03, 1.81, 4.01 mg·g<sup>-1</sup>。方法学考察中各项实验结果的 RSD 均 < 3%,表明本方法重复性好、具有良好的回收率、仪器精密度高、样品稳定性好。

本实验以大黄酸、大黄酚和大黄素的含量测定为微观控制指标,对温肾降浊散质量控制进行了探讨及评价。这种质量评价方法能够更加客观、合理地控制温肾降浊散的质量。

#### [参考文献]

- [1] 尧爱珉,黄金秋,徐大星,等.由 RP-HPLC 法测定栀子大黄汤中多种成分的含量及其在方剂配伍研究中的应用[J].中国药科大学学报,2013,44(6):531-535.
- [2] 黄燕飞,刘志红,陈惠萍,等.大黄酸和罗格列酮对 db/db 糖尿病小鼠代谢紊乱和肾脏损伤的作用比较[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2006,13(3):215-221.
- [3] 谭正怀,沈映君,赵军宁,等.大黄酸对人肾小球系膜细胞功能的影响[J].药学学报,2004,39(11):881-886.
- [4] 朱加明,刘志红,黄燕飞,等.大黄酸对 db/db 小鼠糖尿病肾病疗效的观察[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2002,19(1):3-10.
- [5] 邹大江,黄先菊,高瑞希,等.HPLC 测定雪上一枝蒿中 3 种生物碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(8):41-43.
- [6] 巩克民,赵怀清,季宏建,等.HPLC 测定增液汤中麦冬皂苷 D'的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(8):86-88.
- [7] 戚继红,岳莉,沈伟.高效液相色谱法测定风湿定胶囊中欧前胡素和异欧前胡素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(8):93-95.
- [8] 王胤,沈力,周浓,等.HPLC 同时测定大黄剂中的 5 种蒽醌类衍生物[J].光谱实验室,2012,29(5):2928-2932.

[责任编辑 顾雪竹]