

· 化学与分析 ·

## QAMS 测定一清颗粒中大黄蒽醌类成分含量

李东影<sup>1,2</sup>, 冯伟红<sup>1\*</sup>, 王智民<sup>1\*</sup>, 张启伟<sup>1</sup>, 陈两绵<sup>1</sup>, 杨菲<sup>1,2</sup>, 吉丽娜<sup>1,2</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;  
2. 天津中医药大学, 天津 300193)

**[摘要]** 目的: 采用 QAMS 测定一清颗粒中 4 种蒽醌类成分的含量。方法: 采用 RP-HPLC, Accurasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸水溶液 (85:15), 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。以大黄素为内参物, 采用 QAMS 测定 11 批一清颗粒中大黄蒽醌类成分含量, 并与外标法实测值进行比较。结果: 大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的加样回收率分别为 103.6%, 98.8%, 99.5%, 99.4%, RSD 分别为 0.29%, 1.8%, 2.7%, 3.8%。 $f_{\text{大黄酸/大黄素}}^{254\text{ nm}} = 1.14$ ,  $f_{\text{大黄酚/大黄素}}^{254\text{ nm}} = 1.47$ ,  $f_{\text{大黄素甲醚/大黄素}}^{254\text{ nm}} = 1.04$ ,  $r_{\text{大黄酸/大黄素}} = 0.64$ ,  $r_{\text{大黄酚/大黄素}} = 1.38$ ,  $r_{\text{大黄素甲醚/大黄素}} = 1.88$ , 两种含量测定方法的结果无明显差异。结论: 该方法简便、可靠, 可用于控制一清颗粒中大黄蒽醌类成分含量。

**[关键词]** 高效液相色谱; 一测多评法; 一清颗粒; 蒽醌; 相对校正因子; 相对保留值

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0053-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013170053

## Determination of Four Anthraquinones in Yiqing Granules by QAMS

LI Dong-ying<sup>1,2</sup>, FENG Wei-hong<sup>1\*</sup>, WANG Zhi-min<sup>1\*</sup>,  
ZHANG Qi-wei<sup>1</sup>, CHEN Liang-mian<sup>1</sup>, YANG Fei<sup>1,2</sup>, JI Li-na<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Materia Medica, Beijing 100700, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a HPLC for determining the contents of four anthraquinones in Yiqing granules by a single marker (QAMS). **Method:** RP-HPLC was performed on an Accurasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), eluted with a mobile phase of methanol-0.4% phosphoric acid solution (85:15). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was set at 30 °C and the detection wavelength was 254 nm. Using emodin as an internal reference substance, the contents of four anthraquinones in 11 batches of Yiqing granules was authentically determined by QAMS, and compared with the measured values by external standard method. **Result:** Recoveries of rhein, emodin, chrysophanol and physcion were 103.6%, 98.8%, 99.5%, 99.4% with RSD were 0.29%, 1.8%, 2.7%, 3.8%, respectively.  $f_{\text{rhein/emodin}} = 1.14$ ,  $f_{\text{chrysophanol/emodin}} = 1.47$ ,  $f_{\text{physcion/emodin}} = 1.04$ ,  $r_{\text{rhein/emodin}} = 0.64$ ,  $r_{\text{chrysophanol/emodin}} = 1.38$ ,  $r_{\text{physcion/emodin}} = 1.88$ , there were no significant differences between results determined by the two standard method. **Conclusion:** This method was simple and reliable, it could be used for determination of the four anthraquinones in Yiqing granules.

**[收稿日期]** 20130225(003)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005, 2009ZX09308-003); 2007 年国家中医药管理局中医药行业科技专项(200707009)

**[第一作者]** 李东影, 硕士, 从事中药质量分析研究, Tel: 13439423096, E-mail: lidongying12272006@126.com

**[通讯作者]** \* 冯伟红, 副研究员, 从事中药质量分析研究, Tel: 13671138637, E-mail: weihong\_bj@126.com;

\* 王智民, 研究员, 从事中药化学与质量分析研究, Tel: 13501719763, E-mail: zhmw123@263.net

[ **Key words** ] HPLC; a quantitative method for simultaneous assay ( QAMS ); Yiqing granules; anthraquinone; relative correction factor; relative retention value

中药成分复杂,单指标评价模式难以全面反映中药的内在质量,中药的多指标质量评价模式是中药现代化发展的要求,但多指标评价必须以大量高纯度的对照品为前提,故阻碍了这一模式的发展,而“一测多评法”(QAMS)可较好解决这些矛盾。近年来 QAMS 在单味中药中应用较多<sup>[1-9]</sup>,在复方中应用仅见香连制剂<sup>[10]</sup>、冠脉康胶囊<sup>[11]</sup>、三黄片<sup>[12]</sup>等。

一清颗粒收载于 2010 年版《中国药典》,由黄连、大黄、黄芩组成,具有清热泻火解毒、化瘀凉血止血的功效,目前仅以黄芩苷为质量控制的指标性成分,对方中大黄却未建立相应的质量控制方法<sup>[1]</sup>。本实验以一清颗粒为研究对象,将三黄片中大黄蒽醌类成分 QAMS<sup>[12]</sup>直接用于一清颗粒中大黄蒽醌类成分的含量测定,并与该制剂采用常规外标法得到的实测值进行比较,以验证 QAMS 在含大黄复方中应用的可行性。

## 1 材料

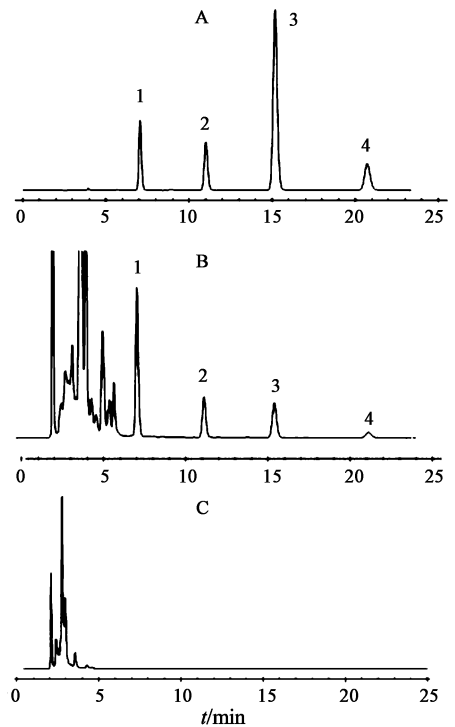
Shimadzu LC20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),XS205 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110757-200206, 100756-200110, 110796-201017, 110758-201013),11 批一清颗粒(成都华神集团股份有限公司制药厂,批号 100504);成都华神集团股份有限公司制药厂,批号 110405;北京亚东生物制药有限公司,批号 1101006;哈药集团三精制药诺捷有限责任公司,批号 1104331;重庆陪都药业股份有限公司,批号 11YQ04;重庆陪都药业股份有限公司,批号 11YQ05;黑龙江济仁药业有限责任公司,批号 100703;湖北纽兰药业有限公司,批号 20101201;江西红星药业有限公司,批号 K110321;山西澳迓药业有限公司,批号 1010009;陕西东泰制药有限公司,批号 0107443),甲醇为色谱纯,水为哇哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 含量测定方法学考察

**2.1.1 色谱条件**<sup>[12]</sup> Accurasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸水溶液(85:15),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,检测波长 254 nm,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品;

1. 大黄酸; 2. 大黄素; 3. 大黄酚; 4. 大黄素甲醚

图 1 一清颗粒 HPLC

**2.1.2 供试品溶液的制备**<sup>[1]</sup> 取一清颗粒约 1 g,精密称定,置 25 mL 锥形瓶中,精密加入 2% 盐酸 10 mL,超声处理 5 min,加入三氯甲烷 15 mL,于 70 ℃ 水浴上加热回流 30 min,冷却,转移至分液漏斗中。分取三氯甲烷液,酸液再用三氯甲烷加热回流 2 次,每次 10 mL,每次 20 min,分取三氯甲烷液,酸液再用三氯甲烷液 10 mL 振荡提取,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣精密加甲醇 10 mL 使溶解,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 依次精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品 1.029, 1.013, 3.214, 0.907 mg,置 25 mL 量瓶中,用少量三氯甲烷溶解后加甲醇稀释至刻度,配成混合对照品贮备液,备用。分别精密吸取混合对照品贮备液 0.1, 0.12, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 1, 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得系列混合对照品溶液,备用。另精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,用少量三氯甲烷溶解后加甲醇制成 4 种成分质量浓度依次为 40.8, 41.2, 129.2, 36.4 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,备用。

**2.1.4 阴性样品溶液的制备** 根据一清颗粒的制备工艺,制备缺大黄阴性供试品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液。

**2.1.5 线性关系的考察** 分别精密吸取 2.1.3 项下混合对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,测定峰面积,以进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,采用最小二乘法进行线性回归,得回归方程  $Y_{\text{大黄酸}} = 3.96 \times 10^6 X - 2\ 344$  ( $r = 0.999\ 8$ ),  $Y_{\text{大黄素}} = 3.42 \times 10^6 X - 2\ 564$  ( $r = 0.999\ 9$ ),  $Y_{\text{大黄酚}} = 5.07 \times 10^6 X - 7\ 787$  ( $r = 0.999\ 8$ ),  $Y_{\text{大黄素甲醚}} = 3.71 \times 10^6 X - 1\ 905$  ( $r = 0.999\ 8$ ), 线性范围分别为 0.004 12 ~ 0.412, 0.004 05 ~ 0.405, 0.001 29 ~ 1.29, 0.003 63 ~ 0.363  $\mu\text{g}$ 。

**2.1.6 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,测定,结果大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.14%, 0.84%, 0.24%, 0.68%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.7 重复性试验** 取同一批一清颗粒供试品约 1 g,平行 6 份,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定峰面积,结果大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚提取量分别 0.117, 0.042 6, 0.034 9, 0.008 36  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 1.7%, 2.3%, 4.4%, 2.8%, 表明该方法重复性良好。

**2.1.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于制备后 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 h 进样,测定,结果大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.3%, 2.2%, 2.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.1.9 加样回收试验** 取已知含量的一清颗粒粉末约 0.5 g,精密称定,平行 6 份,分别加入一定量对照品溶液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量,结果见表 1,表明该测定方法回收率良好。

**2.2 相对校正因子和相对保留值的测定** 取 2.1.3 项下的对照品混合溶液,按上述色谱条件分别进样 0.5, 2, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{L}$  ( $n = 2$ ),测定 4 个蒽醌的峰面积并计算大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚与内参物大黄素间的相对校正因子及相对保留值,见表 2,将结果与文献报道的相对校正因子 ( $f_{\text{大黄酸}/\text{大黄素}}^{254\ \text{nm}} = 1.13$ ,  $f_{\text{大黄酚}/\text{大黄素}}^{254\ \text{nm}} = 1.46$ ,  $f_{\text{大黄素甲醚}/\text{大黄素}}^{254\ \text{nm}} = 1.01$ ) 和相对保留值 ( $r_{\text{大黄酸}/\text{大黄素}} = 0.66$ ,  $r_{\text{大黄酚}/\text{大黄素}} = 1.41$ ,  $r_{\text{大黄素甲醚}/\text{大黄素}} = 1.94$ ) 进行比较<sup>[12]</sup>,结果无显著性差异,表明报道的参数准确、可靠,这些参数可用于一清颗粒中有效成分的含量测定。

表 1 一清颗粒中大黄蒽醌类成分含量测定的加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品含量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
大黄酸	0.500 7	0.053 94	0.108 1	104.2	103.6	0.29
	0.500 6	0.053 92	0.107 8	103.6		
	0.500 5	0.053 91	0.107 8	103.6		
	0.500 8	0.053 95	0.107 8	103.6		
	0.501 1	0.053 98	0.107 7	103.3		
	0.499 6	0.053 94	0.107 7	103.4		
大黄素	0.500 9	0.020 76	0.041 9	96.97	98.8	1.8
	0.500 6	0.020 75	0.042 0	97.48		
	0.500 8	0.020 75	0.042 4	99.31		
	0.500 3	0.020 73	0.042 3	98.94		
	0.500 8	0.020 75	0.043 0	102.1		
	0.500 4	0.020 74	0.042 1	97.98		
大黄酚	0.499 5	0.016 21	0.031 7	98.04	99.5	2.7
	0.500 2	0.016 20	0.032 7	104.4		
	0.499 5	0.016 22	0.031 6	97.34		
	0.500 4	0.016 20	0.031 9	99.37		
	0.500 4	0.016 23	0.032 1	100.4		
	0.500 5	0.016 23	0.031 6	97.28		
大黄素甲醚	0.500 5	0.004 528	0.009 08	96.85	99.4	3.8
	0.499 5	0.004 536	0.009 12	97.53		
	0.500 4	0.004 528	0.009 43	104.3		
	0.499 5	0.004 536	0.009 04	95.83		
	0.499 5	0.004 528	0.009 13	97.91		
	0.500 4	0.004 536	0.009 43	104.1		

注:大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚加入量分别为 0.052 0, 0.021 8, 0.015 8, 0.004 7 mg。

**2.3 样品测定** 采用文献报道的相对保留值和相对校正因子对一清颗粒样品中待测大黄蒽醌类成分色谱峰进行定位<sup>[10]</sup>,计算各有效成分含量,作为 QAMS 计算值,与外标法(ESM)的实测值进行比较,见表 3,结果 2 种方法的测定结果无明显差异,表明 QAMS 的测定结果可靠。

### 3 讨论

QAMS 是近年来发展起来的一种快速、简便、经济的中药质量评价新模式,相对于常规的外标法,该定量模式有效地解决了在对照品短缺的情况下同类化合物的含量测定问题,在降低试验成本的同时大大节省了分析时间。采用 QAMS 测定了 11 批一清颗粒中蒽醌类成分含量,通过与外标法的测定结果进行比较,进一步验证了大黄中 4 种蒽醌类成分的相对校正因子及相对保留值准确、可靠<sup>[12]</sup>,这些参数可直接用于含大黄蒽醌类成分中药及中成药的质量控制。

表 2 一清颗粒中 4 种大黄蒽醌的相对保留值和相对校正因子的测定

进样体积 / $\mu\text{L}$	相对保留值			相对校正因子		
	$r_{\text{大黄酸/大黄素}}$	$r_{\text{大黄酚/大黄素}}$	$r_{\text{大黄素甲醚/大黄素}}$	$f_{\text{大黄酸/大黄素}}^{254\text{ nm}}$	$f_{\text{大黄酚/大黄素}}^{254\text{ nm}}$	$f_{\text{大黄素甲醚/大黄素}}^{254\text{ nm}}$
0.5	0.642	1.377	1.879	1.126	1.456	1.052
2	0.642	1.377	1.878	1.135	1.465	1.035
5	0.641	1.379	1.880	1.141	1.466	1.040
10	0.641	1.383	1.885	1.142	1.464	1.042
15	0.642	1.385	1.888	1.143	1.469	1.042
20	0.643	1.382	1.883	1.144	1.471	1.044
25	0.643	1.379	1.880	1.146	1.473	1.046
平均值	0.64	1.38	1.88	1.14	1.47	1.04
RSD/%	0.13	0.24	0.20	0.59	0.38	0.52

表 3 QAMS 与 ESM 测得的一清颗粒中蒽醌类成分含量

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	大黄素		大黄酸		大黄酚		大黄素甲醚	
	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	
1	0.022	0.039	0.039	0.020	0.020	0.005 6	0.005 7	
2	0.054	0.139	0.140	0.043	0.044	0.013 3	0.013 5	
3	0.037	0.171	0.173	0.015	0.015	0.004 2	0.004 3	
4	0.023	0.080	0.081	0.013	0.013	0.003 1	0.003 2	
5	0.034	0.086	0.087	0.025	0.025	0.008 5	0.008 6	
6	0.031	0.077	0.078	0.021	0.022	0.007 4	0.007 5	
7	0.051	0.116	0.117	0.027	0.027	0.007 9	0.008 1	
8	0.007	0.015	0.016	0.003	0.003	0.000 55	0.000 56	
9	0.039	0.115	0.117	0.030	0.030	0.008 6	0.008 8	
10	0.013	0.045	0.045	0.011	0.011	0.002 1	0.002 2	
11	0.065	0.216	0.218	0.033	0.034	0.008 3	0.008 4	

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 402.  
 [2] 杨菲, 冯伟红, 王智民, 等. 一测多评法测定银黄制剂中 4 种黄酮类成分含量[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(12): 984.  
 [3] 吉丽娜, 冯伟红, 王智民, 等. “一测多评”法与外标法测定三黄片中 4 种黄酮类成分[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2128.  
 [4] 张锴斌, 冯伟红, 王智民, 等. 一测多评法与外标法测定新清宁片中大黄蒽醌类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 61.  
 [5] 冯伟红, 王智民, 张启伟, 等. 一测多评法测定秦皮药材与饮片中香豆素类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1782.  
 [6] 孔晶晶, 朱晶晶, 王智民, 等. 一测多评法测定连翘中多种不同类型成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(17): 1301.

[7] 高慧敏, 宋宗华, 王智民, 等. 适合中药特点的质量评价模式——QAMS 研究概述[J]. 中国药学杂志, 2012, 37(4): 405.  
 [8] 魏凤环, 吴桂欣, 朱清利, 等. 一测多评法测定湿疹软膏中欧前胡素、异欧前胡素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 125.  
 [9] 孟江, 卢国勇, 程轩轩, 等. 一测多评法同时测定干姜中 4 种姜酚类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 77.  
 [10] 孔晶晶, 朱晶晶, 冯伟红, 等. 一测多评技术在中成药香连制剂质量评价中的应用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1445.  
 [11] 邹桂欣, 尤献民, 张颖, 等. 一测多评法在冠脉康胶囊多种成分检测中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1828.  
 [12] 王钰莹, 冯伟红, 杨菲, 等. “一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 212.

[责任编辑 仝燕]