

• 质量标准 •

## 凉膈丸定性定量方法研究

师涛<sup>1,2</sup>, 孟宪生<sup>2,3</sup>, 罗国安<sup>2\*</sup>, 王义明<sup>2</sup>, 龚千峰<sup>1</sup>

(1. 江西中医学院, 江西南昌 330004; 2. 清华大学中药现代化研究中心, 北京 100084;  
3. 辽宁中医药大学, 辽宁沈阳 110032)

[摘要] 目的: 凉膈丸的定性定量方法研究。方法: 采用TLC法对制剂中的黄芩、栀子进行定性鉴别; 用HPLC对制剂中的大黄药材进行含量测定。色谱柱: Alltima ODS C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.2%磷酸(40: 40: 20); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为254 nm。结果: TLC法能对黄芩、栀子进行专属性定性分析; 大黄酸在(0.055 86~ 0.558 6) μg范围内线性良好,  $r = 0.999 6$ , 平均回收率 100.79%, RSD = 1.04% ( $n = 6$ ); 大黄素在(0.079 8~ 0.798 0) μg范围内线性良好,  $r = 0.999 7$ , 平均回收率 102.64%, RSD = 1.53% ( $n = 6$ ); 大黄酚的含量在(0.063 84~ 0.638 4) μg范围内线性良好,  $r = 0.999 8$ , 平均回收率 103.20%, RSD = 0.82% ( $n = 6$ )。结论: 所建立的方法可准确的进行定性和定量检测, 方法可靠, 重复性好, 可有效控制凉膈丸的质量。

[关键词] 凉膈丸; 薄层色谱; 高效液相色谱; 质量标准

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0001-03

## Studies on Qualitative and Quantitative Methods of Liangge Pills

SHI Tao<sup>1,2</sup>, MENG Xian-sheng<sup>2,3</sup>, LUO Guo-an<sup>2\*</sup>, WANG Yi-ming<sup>2</sup>, GONG Qian-feng<sup>1</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;  
2. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;  
3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the qualitative and quantitative methods of Liangge Pills. **Methods:** TLC was used to identify Radix Scutellariae, Fructus Gardenia; HPLC was used to determine rheinic acid, emodin and chrysophanol in the preparation. The samples were separated on an Alltima ODS C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with methanol-acetonitril-0.1% phosphoric (40: 40: 20) as the mobile phase. The detection wavelength was set at 254 nm and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **Results:** Radix Scutellariae, Fructus Gardeniae could be indentified by TLC. The calibration curve was linear in the range of (0.055 86~ 0.558 6) μg,  $r = 0.999 6$ , for rheinic acid, the average recovery was 100.94%, RSD = 1.25% ( $n = 6$ ); The calibration curve was linear in the range of (0.079 8~ 0.798 0) μg,  $r = 0.999 7$ , for emodin, the average recovery was 102.49%, RSD = 1.42% ( $n = 6$ ); The calibration curve was linear in the range of (0.063 84~ 0.638 4) μg,  $r = 0.999 8$ , for chrysophanol, the average recovery was 103.24%, RSD = 0.85% ( $n = 6$ ). **Conclusion:** The methods are simple, reliable, and it can be used for quality control of Liangge Pills.

[Key words] Liangge Pills; TLC; HPLC; quality standard

[收稿日期] 2007-09-06

[基金项目] 国家十一五科技支撑计划(2006BAI08B04-01)

[通讯作者] \* 罗国安, Tel: (010) 62781688; E-mail: luoga@tsinghua.edu.cn

凉膈丸收载于卫生部药品标准中药成方制剂第二册中<sup>[1]</sup>,由大黄、黄芩、栀子等 9 味中药组成,具有消炎解热,消火凉膈功效。由于部颁标准中对凉膈丸未有任何定性或定量鉴别项,已远远不能满足对质量控制的要求,为此本研究增订了黄芩和栀子的薄层定性鉴别,同时对方中用量较大的君药大黄的主要成分大黄酸、大黄素和大黄酚进行了定量分析研究。建立了可靠、准确、专属性强的质量控制方法,为该制剂建立质量标准提供了依据。

## 1 仪器、试剂和供试样品

美国 Waters2695 高效液相色谱仪, 2996DAD 二极管阵列检测器, E-Power 化学工作站; BP211D 型电子天平(十万分之一,德国 Sartorius 公司); KQ-500E 超声波处理器(昆山超声设备有限公司);

甲醇、乙腈(Fisher 公司,色谱纯);水为超纯水(Milli Q 超纯水,过 0.2 μm 微孔滤膜);其他化学试剂均为分析纯。

黄芩苷对照品(批号:110715-200514)、栀子苷对照品(批号:110749-200512)、大黄酸对照品(批号:0757-200206)、大黄素对照品(批号:110756-200110)、大黄酚对照品(批号:110796-200514),均购于中国药品生物制品检定所,供含量测定用。

阴性对照(按处方药味除去被测药材,其余药味按成药的生产工艺制备的模拟样品)。

凉膈丸,市售。

## 2 薄层鉴别

**2.1 黄芩** 取样品 10 丸,研细,精密取 2 g,加乙酸乙酯:甲醇(3:1)混合溶液 30 mL,超声处理 40 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 溶解,作为供试品溶液。另取黄芩苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。吸取上述 2 种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 的三氯化铁乙醇溶液。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色斑点,且阴性对照液在相应位置上无干扰。

**2.2 栀子** 取样品 10 丸,研细,精密称取 2 g,加甲醇 20 mL,超声处理 40min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 5 mL 溶解,作为供试品溶液。另取栀子苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 5 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述 2 种溶液 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水(5:5:1:1)为

展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105℃ 加热至斑点显色清楚。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色斑点,且阴性对照液在相应位置上无干扰。

## 3 含量测定

**3.1 色谱条件** 色谱柱:Alltima ODS C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.2% 磷酸(40:40:20);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长为 254 nm;进样量:10 μL。

### 3.2 试验溶液的制备

**3.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取大黄酸、大黄素和大黄酚对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 分别含大黄酸 28 μg,大黄素 40 μg,大黄酚 32 μg 的混合对照品溶液,即得。

**3.2.2 样品溶液的制备** 取样品,研细,取约 1 g,精密称定,精密加入盐酸-乙醇(1:25)混合溶液 50 mL,超声处理 10 min,置水浴锅加热回流 90 min,放冷,再称定重量,用盐酸乙醇溶液补足失去重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**3.2.3 阴性样品溶液的制备** 除大黄外,将其他药材以相同工艺、相同制法制成缺大黄的阴性样品溶液,即得。

**3.3 系统适应性试验** 取大黄酸、大黄素和大黄酚混合对照品溶液、样品溶液和阴性对照溶液,按 3.1 项下色谱条件进样 10 μL,结果阴性样品对测定无干扰。

**3.4 线性关系考察** 分别精密吸取含大黄酸(27.93 μg·mL<sup>-1</sup>)、大黄素(39.9 μg·mL<sup>-1</sup>)、大黄酚(31.92 μg·mL<sup>-1</sup>)混合对照品溶液 2, 5, 8, 10, 15, 20 μL,按上述色谱条件依次进样测定。以对照品进样量 X(μg)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标作标准曲线。得回归方程:大黄酸  $Y = 2.8 \times 10^6 X - 6.4 \times 10^4$ ,  $r = 0.9996$ ;大黄素:  $Y = 4.8 \times 10^6 X - 8.2 \times 10^4$ ,  $r = 0.9997$ ;大黄酚:  $Y = 6.1 \times 10^6 X - 1.0 \times 10^4$ ,  $r = 0.9998$ 。结果表明,大黄酸在(0.05586~0.5586) μg、大黄素在(0.0798~0.7980) μg、大黄酚在(0.06384~0.6384) μg 范围内均有良好线性关系。

**3.5 精密度试验** 取同一批号样品,按 3.2.2 项下的方法制备样品供试液,在相同色谱条件下连续进样 6 次,测定峰面积,结果大黄酸、大黄素、大黄酚面积 RSD 分别为 1.59%、0.85% 和 1.85% (n=6),表明精密度良好。

**3.6 稳定性试验** 取同一批号样品,按 3.2.2 项下的方法制备样品供试液,在相同色谱条件下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 注入高效液相色谱仪,测定峰面积,结果大黄酸、大黄素、大黄酚面积 RSD 分别为 2.05%、2.22% 和 2.79% ( $n=6$ ),表明样品在 24 h 内稳定。

**3.7 重复性试验** 取同一批号样品,共 6 份,按 3.2.2 项下的方法制备样品供试液,在相同色谱条件下进样分析,测定大黄酸、大黄素和大黄酚面积并计算含量,结果大黄酸平均含量为  $0.9150 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,大黄素平均含量为  $0.8245 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,大黄酚平均含量为  $1.8438 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。RSD 分别为 1.90%、2.36% 和 2.00% ( $n=6$ ),表明重复性良好。

**3.8 加样回收率试验** 精密量取已知含量的凉膈丸(大黄酸  $0.9150 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,大黄素  $0.8245 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,大黄酚  $1.8438 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 0.5 g,共 6 份,分别加入以甲醇为溶剂的对照品溶液(每 1 mL 含大黄酸  $8.002 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,大黄素  $9.177 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和大黄酚  $19.152 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 50 mL,按 3.2.2 项下的方法制备样品供试液,精密吸取续滤液 10  $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算回收率,结果见表 1 2 3。

表 1 大黄酸回收率试验 ( $n=6$ )

称样量 (g)	样品中大黄 酸( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	对照品加 入量(mg)	测得量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
0.519 3	0.475 2	0.400 1	0.875 7	100.10	100.94	1.25
0.528 2	0.483 3	0.400 1	0.890 5	101.77		
0.520 4	0.476 2	0.400 1	0.885 9	102.40		
0.517 9	0.473 9	0.400 1	0.880 4	101.60		
0.531 4	0.486 2	0.400 1	0.882 1	98.95		
0.533 2	0.487 9	0.400 1	0.891 3	100.82		

表 2 大黄素回收率试验 ( $n=6$ )

称样量 (g)	样品中大黄 素( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	对照品加 入量(mg)	测得量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
0.519 3	0.428 2	0.458 9	0.889 1	100.44	102.49	1.42
0.528 2	0.435 5	0.458 9	0.909 3	103.25		
0.520 4	0.429 1	0.458 9	0.906 6	104.05		
0.517 9	0.427 0	0.458 9	0.903 7	103.88		
0.531 4	0.438 1	0.458 9	0.905 4	101.83		
0.533 2	0.439 6	0.458 9	0.905 3	101.48		

表 3 大黄酚回收率试验 ( $n=6$ )

称样量 (g)	样品中大黄 酚( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	对照品加 入量(mg)	测得量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
0.519 3	0.957 5	0.957 6	1.946 7	103.30	103.24	0.85
0.528 2	0.973 9	0.957 6	1.952 6	102.20		
0.520 4	0.959 5	0.957 6	1.939 8	102.37		
0.517 9	0.954 9	0.957 6	1.945 3	103.43		
0.531 4	0.979 8	0.957 6	1.981 6	104.62		
0.533 2	0.983 1	0.957 6	1.974 4	103.52		

#### 4 讨论

为同时测定大黄酸、大黄素和大黄酚的含量,文献报道对大黄的含量测定中所采用的色谱条件多为药典所载的条件。参考相关文献<sup>[2,5]</sup>,试用乙腈-0.1%磷酸,甲醇-0.5%冰醋酸,甲醇-0.1%高氯酸,甲醇-0.1%磷酸等流动系统,经过试验,都不理想,后改用甲醇-乙腈-0.2%磷酸流动相,样品中大黄酸、大黄素和大黄酚与其他组分均能达到基线分离,空白对照亦无干扰,效果较好。

对于蒽醌类化合物的测定,在 254 nm、280 nm 以及 440 nm 处均有较强的吸收。采用 254 nm 的检测波长,实验结果良好,故选择 254 nm 为检测波长。

实验中考察了不同提取时间(60, 90, 120min)、不同溶剂用量(50, 75, 100 mL)。结果表明,按文中所述方法,样品中的大黄酸、大黄素和大黄酚能提取完全。将该方法与《中华人民共和国药典》2005 版一部大黄药材提取方法相比较,该方法操作简单。

本实验采用 TLC 法对方中黄芩、栀子进行了定性鉴别,分离满意,专一性强;HPLC 法测定制剂中大黄酸、大黄素和大黄酚的含量,方法简便,重复性好,故可作为凉膈丸的质量控制方法。

#### [参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准——中药成方制剂[S]. 第二册,北京: 卫生部药典委员会,1990. 215.
- [2] 卢文彪,曾元儿. 大承气汤颗粒剂质量控制研究[J]. 湖南中医药导报,2002,8(4): 148-151.
- [3] 刘东平. HPLC 法测定大败毒胶囊中大黄素和大黄酚的含量[J]. 现代中药研究与实践,2005,19,(3): 35-37.
- [4] 王云娇,李武毅,张永云. 清火片中大黄素和大黄酚的 HPLC 法测定[J]. 中草药,2006,37(7): 1034-1035.
- [5] 李立荣,雷玉萍,殷帅. HPLC 测定通便消痞片中大黄素、大黄酚总量的含量[J]. 中成药,2007,29: 458-460.