

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.041

高效液相色谱法测定决明子4种成分含量

申玉龙¹, 徐 达¹, 金艳敏¹, 刘 勇², 王立伟¹, 安丽娜^{1△}

(1. 承德燕峰药业有限责任公司, 河北 承德 067600; 2. 河北省人民医院, 河北 石家庄 050051)

摘要:目的 建立同时测定决明子中4种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为迪马 Dimonsil 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(49:7:44, V/V/V), 等度洗脱, 柱温为30℃, 检测波长为222 nm, 流速为1.0 mL/min, 进样量为10 μL。结果 进样量线性范围橙黄决明素为0.024 64~0.246 4 μg($r=0.999\ 99$), 大黄素为0.017 4~0.174 μg($r=0.999\ 99$), 大黄酚为0.029 56~0.295 6 μg($r=0.999\ 99$), 大黄素甲醚为0.016~0.16 μg($r=0.999\ 98$); 平均回收率橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别为99.41%, 99.51%, 99.48%和99.24%, RSD 分别为0.58%, 0.82%, 0.95%和0.90%($n=6$)。结论 该方法可用于决明子质量的综合评价。

关键词:高效液相色谱法; 决明子; 橙黄决明素; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)09-0134-03

Determination of Four Active Ingredient in Cassiae Semen by HPLC

SHEN Yulong¹, XU Da¹, JIN Yanmin¹, LIU Yong², WANG Liwei¹, AN Lina¹

(1. Chengde Yanfeng Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengde, Hebei, China 067600; 2. Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China 050051)

Abstract: Objective To establish a simultaneous determination method of four active ingredient in cassiae semen by high-performance liquid chromatography(HPLC). **Methods** The chromatographic column was Dikma Dimonsil column (150 mm×4.6 mm, 5 μm). The contents were determined using a mixture of acetonitrile, methanol and 0.1% phosphoric acid(49:7:44, V/V/V) as the mobile phase by HPLC with equivalent elution. **Results** The methodological study showed that a good linear correlation existed in the range 0.024 64-0.246 4 μg($r=0.999\ 99$) for aurantio-obtusin, 0.017 4-0.174 μg($r=0.999\ 99$) for emodin, 0.029 56-0.295 6 μg($r=0.999\ 99$) for chrysophanol and 0.016-0.16 μg($r=0.999\ 98$) for epoxine methyl ether, respectively. The average recoveries for aurantio-obtusin, emodin, chrysophanol and aurantio-obtusin were 99.41%, 99.51%, 99.48% and 99.24%, respectively($n=6$). The RSD s were 0.58%, 0.82%, 0.95% and 0.90%($n=6$), respectively. **Conclusion** This method can be used for the comprehensive evaluation on the quality of cassiae semen.

Key words: high-performance liquid chromatography; cassiae semen; aurantio-obtusin; emodin; chrysophanol; epoxine methyl ether; determination

第一作者: 申玉龙, 男, 大学本科, 工程师, 研究方向为中药检验及质量标准, (电子信箱)277653233@qq.com。

△通信作者: 安丽娜, 女, 大学本科, 工程师, 研究方向为中药新药开发及质量标准, (电子信箱)anlinlove@163.com。

声提取15, 30, 45 min, 称定质量, 用甲醇-盐酸(100:1, V/V)补足减失的质量, 摇匀, 取续滤液, 用0.45 μm微孔滤膜滤过, 精密吸取10 μL, 注入液相色谱仪, 测得盐酸小檗碱含量分别为0.571 2, 0.668 0, 0.667 3 mg/g。可见, 超声提取30 min 盐酸小檗碱含量最高, 故确定超声提取时间为30 min。

3.3 方法评价

本研究中建立了多动安颗粒中黄连、佛手、麻黄、熟地黄的薄层色谱鉴别方法, 对该制剂中盐酸小檗碱含量进行测定, 并对方法学进行了考察。该方法简单, 专属性强、耐用性好, 可用于多动安颗粒的质量控制。

参考文献:

- [1] 汪 坤. 黄连阿胶安神胶囊质量标准研究[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(6): 61-64.
- [2] 张小华, 马新换, 杨春霞, 等. 佛手化痰散剂的显微和薄层色谱鉴别研究[J]. 甘肃中医药大学学报, 2019, 36(4): 26-29.
- [3] 王秀琴, 王东兴, 纪丽颖. 薄层色谱法鉴别参茸清眩膏[J].

华南国防医学杂志, 2017, 31(9): 61-64.

- [4] 郝 哲, 宋晓红, 王丽军, 等. 麻杏抗感颗粒薄层鉴别方法改进及含量测定[J]. 海峡药学, 2018, 30(9): 75-78.
- [5] 黄传俊, 梅 勇, 杨 莉, 等. HPLC法同时测定金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素的含量[J]. 中国药房, 2018, 29(12): 42-45.
- [6] 郑 全, 郭维霄, 刘 芳. 小青龙颗粒薄层鉴别方法的改进[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(3): 625-626.
- [7] 朱 静, 袁宏佳, 刘兴文. 麻苏平喘胶囊制备工艺及薄层色谱鉴别[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(9): 785-786.
- [8] 姚 能, 严常开, 吴 宁. 小儿葛黄止泻颗粒质量标准研究[J]. 中国药业, 2018, 27(8): 14-17.
- [9] 盖晓红, 刘素香, 任 涛, 等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4919-4927.
- [10] PARK SH, SUNG JH, KIM EJ, et al. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines [J]. Brazilian J Med Biol Res, 2015, 48(2): 111-119.

(收稿日期: 2019-08-28)

决明子主要含蒽醌类,有橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、美决明素、黄决明素、决明素、芦荟大黄素等多种蒽醌苷元和与糖结合成的苷类^[1-4],具有清热明目^[5]、润肠通便^[6]功效。2015年版《中国药典(一部)》^[7]中以橙黄决明素和大黄酚为决明子药材的检测指标,其供试品溶液的前处理方法烦琐、复杂。本研究中采用普通的高效液相色谱仪、等度洗脱,同时测定了决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:LC-20AT型高效液相色谱仪,包括DGU-20A型泵,SPD-M20A型二极管阵列检测器,LC-solution型色谱工作站,SIL-20A型自动进样器(日本岛津公司)。

试剂:决明子药材(共3批,承德燕峰药业有限责任公司),由河北省药品检验研究院韩桂茹主任药师鉴定为决明子 *Gassia obtusifolia* L. 的种子;橙黄决明素对照品(批号为111900-201202,供含量测定用,含量以95.0%计),大黄素对照品(批号为110756-200110,供含量测定用),大黄酚对照品(批号为110796-201319,供含量测定用,含量以99.6%计),大黄素甲醚对照品(批号为110758-201013,供含量测定用,含量以99.8%计),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(批号为161218)、乙腈(批号为161123)均为色谱纯,均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;磷酸(分析纯,天津市红岩化学试剂厂,批号为090903)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:迪马 Dimonsil 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(49:7:44, V/V/V),等度洗脱;柱温:30℃;检测波长:222 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。理论板数按橙黄决明素峰计应不低于6000。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取在干燥器中干燥24 h的橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,精密称定,加甲醇制成原液,取原液适量,加90%甲醇制成每1 mL含橙黄决明素0.009 mg、大黄素0.004 mg、大黄酚0.015 mg、大黄素甲醚0.004 mg的混合溶液,即得。

供试品溶液:取决明子药材细粉0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸溶液(10:1, V/V)25 mL,称定质量,置80℃水浴中加热回流30 min,放冷,若瓶壁有黏附,超声去除,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液3 mL,置10 mL容量瓶中,加2%氢氧化钠溶液1.5 mL,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取每1 mL含橙黄决明素0.01232 mg、

大黄素0.0087 mg、大黄酚0.01478 mg、大黄素甲醚0.008 mg的对照品溶液,分别进样2,5,10,15,20 μL,测定峰面积,以进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。回归方程分别为,橙黄决明素 $Y = 3396367.8X + 770$, $r = 0.99999$;大黄素 $Y = 3822412.5X - 3923$, $r = 0.99999$;大黄酚 $Y = 5819232.8X - 6655$, $r = 0.99999$;大黄素甲醚 $Y = 2929021.8X - 7557$, $r = 0.99998$ 。结果表明,橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量分别在0.02464~0.2464 μg, 0.0174~0.174 μg, 0.02956~0.2956 μg, 0.016~0.16 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一对照品溶液,连续进样5次,每次10 μL,测定峰面积。结果橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的峰面积平均值分别为284616, 77743, 780744, 131634, RSD 分别为0.63%, 0.41%, 0.40%, 0.51% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0,1,2,8,24 h时进样,测定峰面积。结果橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为0.41%, 0.27%, 0.06%, 0.64% ($n = 5$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:依据2015年版《中国药典(四部)》中药品质量标准分析方法验证指导原则项下规定,采用同一浓度的6份样品进行评价,即以100%的剂量,取同一批样品(1号样)6份,依法制备供试品溶液,并测定含量。结果样品中橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均含量分别为1.430, 0.350, 2.251, 0.792 mg/g, RSD 分别为0.13%, 0.42%, 0.09%, 0.32% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:按重复性试验项下方法,取已知含量的同一批样品6份(1号样),每份0.25 g,按1:1的比例加入相应量的对照品,依法制备供试品溶液,测定含量,计算回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

因是单味药材,空白试剂无干扰,仅提供样品的测定图谱,详见图1。含量测定结果见表2。

3 讨论

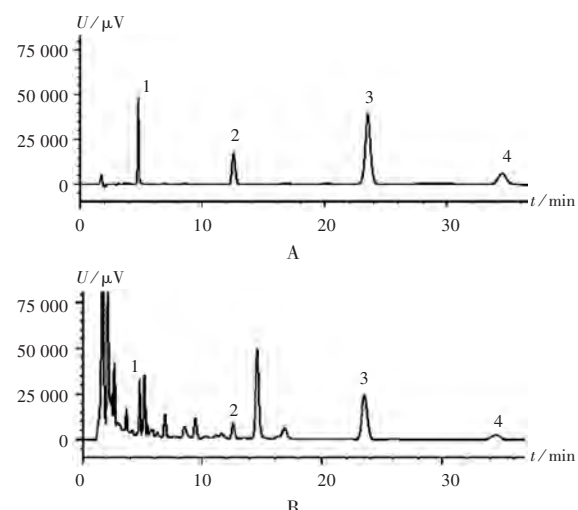
3.1 测定方法选择

采用普通的色谱仪、等度洗脱,以乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(49:7:44, V/V/V)为流动相,在(222±1) nm波长处同时测定决明子药材中橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量,各波峰分离度符合要求,进样1针,35 min出峰完毕。一台普通液相色谱仪即可完成测定,试验成本降低,普及范围大。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

取样量 (g)	样品含量(μg)				加入量(μg)				测得量(μg)				回收率(%)				$\bar{X}$ (%)				RSD(%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0.250 4	358.1	87.6	563.7	198.3	360.0	88.0	570.0	200.0	716.5	174.3	1130.7	394.1	99.56	98.52	99.47	97.90								
0.250 3	356.3	87.6	563.4	198.2	360.0	88.0	570.0	200.0	712.6	174.9	1125.6	395.4	98.97	99.20	98.63	98.60								
0.250 8	358.6	87.8	564.6	198.6	360.0	88.0	570.0	200.0	715.5	175.2	1135.9	397.6	99.14	99.32	100.23	99.50	99.41	99.51	99.48	99.24	0.58	0.82	0.95	0.90
0.250 1	357.6	87.5	563.0	198.1	360.0	88.0	570.0	200.0	717.7	175.6	1132.6	398.1	100.03	100.11	99.93	100.00								
0.250 6	358.4	87.7	564.1	198.5	360.0	88.0	570.0	200.0	713.7	174.9	1123.3	396.8	98.69	99.09	98.10	99.15								
0.251 0	358.9	87.8	565.0	198.8	360.0	88.0	570.0	200.0	719.1	176.5	1137.8	399.4	100.06	100.80	100.49	100.30								

注:A为橙黄决明素,B为大黄素,C为大黄酚,D为大黄素甲醚。



1. 橙黄决明素 2. 大黄素 3. 大黄酚 4. 大黄素甲醚
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

表2 决明子4种成分含量测定结果(mg/g)

批号	橙黄决明素	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	总含量
1	1.430	0.350	2.251	0.792	4.823
2	1.285	0.328	2.229	0.675	4.517
3	1.415	0.677	2.232	0.776	5.100

3.2 供试品溶液前处理程度改进

2015年版《中国药典》中需甲醇加热回流提取,取适量提取液蒸干、残渣再加稀盐酸水解,水解液用三氯甲烷萃取4次,萃取液再蒸干,用溶剂定容。粗略地计算,处理1批样品需有机溶剂195 mL,耗时5~6 h,费时费力,且严重污染环境。以无浓缩、萃取、蒸干的环保方法,取代了甲醇提取、提取液蒸干、水溶解、三氯甲烷萃取、萃取液再蒸干、有机溶剂定容的传统方法,效率提高、时间缩短、环境污染降低,精密度和准确度提升。

3.3 流动相等度洗脱程序选择

目前,决明子或其制剂的含量测定中多数是测定橙黄决明素和大黄酚含量^[8-11],也有测定橙黄决明素、大黄素、大黄酚含量的^[12],还有测定橙黄决明素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的^[12-13],最多测定到12种蒽醌类成分^[14],均为梯度洗脱,除采用超高效液相色谱

法,特定的超高效液相色谱柱出峰时间在4 min^[12](但波峰分离不佳,尤其是样品中大黄素波峰保留时间与对照品相差较大)内外,其余测定4种成分的梯度洗脱时间多设定为40 min以上。

参考文献:

- [1] 李秋红. 决明子的化学、药理与炮制研究进展[J]. 中医药学报, 2006,34(6):49-50.
- [2] 陈秋东,徐蓉,徐志南. 决明子中蒽醌化学成分及其生物活性研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志,2003,20(2):120-124.
- [3] 唐力英,王祝举,傅梅红,等. 决明子中游离蒽醌类化学成分研究[J]. 中药材,2009,32(5):717-719.
- [4] 贾振宝,丁霄霖. 决明子中蒽醌类成分研究[J]. 中药材, 2006,29(1):28-29.
- [5] 韩昌志. 决明子的明目作用[J]. 中国医院药学杂志,1993, 13(5):2000-2001.
- [6] 张立海,慈慧. 决明子润肠通便的化学成分及临床应用研究[J]. 首都医药,2011,8(16):56.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:145.
- [8] 黄小平,钟国跃,张雪梅,等. HPLC法测定决明子中大黄酚和橙黄决明素[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2065-2067.
- [9] 王云霞,张鑫. 变换波长HPLC同时测定决明子中橙黄决明素和大黄酚的含量[J]. 陕西中医药,2016,39(8):1080-1081.
- [10] 张倩,吴翠,朱文灯,等. HPLC法测定五味决明茶中橙黄决明素和大黄酚含量[J]. 海峡药学,2015,27(6):73-74.
- [11] 王小凤,樊淑彦,何晓文,等. 山庄降脂片中橙黄决明素、大黄素、大黄酚的HPLC测定[J]. 中国医药工业杂志,2009, 40(10):770-772.
- [12] 詹雁,阮佳,谭镭,等. UPLC法同时测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 中国测试, 2013,39(2):56-58.
- [13] 卫莹芳,谢达文,万丽,等. HPLC梯度洗脱法同时测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化-中药研究,2009,11(6): 868-871.
- [14] 王青,张伟东,宋小妹,等. HPLC法同时测定不同产地决明子中12种蒽醌类成分的含量[J]. 解放军药学报, 2012,28(6):502-505.

(收稿日期:2019-07-30)