



HPLC 同时测定决明子中 4 种主要成分的含量

苏会娟, 王祝举*, 唐力英

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定决明子药材中蒽醌类和萘并吡喃酮类 4 种主要成分含量的方法, 为决明子药材的质量控制提供依据。方法: 采用 Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 流动相水-乙腈-四氢呋喃-冰醋酸 (100: 23: 5: 1) 等度洗脱。检测波长 278 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。结果: 4 种成分达到了基线分离。红链霉素龙胆二糖苷, 决明子苷, auranthiobutyrin-6- O - β -D-glucopyranoside 以及决明子苷 B 线性范围为 0.274 ~ 1.37, 0.153 ~ 0.765, 0.302 ~ 1.51, 0.052 ~ 0.26 μ g, 相关系数 r 均为 0.999 9。平均加样回收率分别为 100.9% (RSD 1.8%), 101.2% (RSD 1.2%), 99.40% (RSD 2.2%), 100.5% (RSD 1.6%)。结论: 建立了高效液相测定决明子中 4 种主要成分含量的方法, 该方法精确, 简便, 可靠, 重现性好, 可用于决明子药材的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 决明子; 红链霉素龙胆二糖苷; auranthiobutyrin-6- O - β -D-glucopyranoside; 决明子苷; 决明子苷 B 含量测定

决明子为豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *C. tora* 的干燥成熟种子, 具有清肝明目, 润肠通便的功效。用于目赤涩痛, 羞明多泪, 头痛眩晕, 目暗不明, 大便秘结等症^[1]。现代研究表明, 决明子中主要含有萘并吡喃酮类和蒽醌类成分, 此 2 类成分也是主要的药效成分^[2-4]。决明子含量测定方法目前多为水解后游离蒽醌含量的测定^[5], 对蒽醌苷类以及萘并吡喃酮苷类含量测定的报道很少。为了更好地对决明子的质量进行控制, 本研究采用高效液相色谱法, 建立了 4 种主要药效成分红链霉素龙胆二糖苷、决明子苷、auranthiobutyrin-6- O - β -D-glucopyranoside 及决明子苷 B 含量分析方法, 并对全国各地不同来源的 10 批决明子药材进行了含量测定。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (LC-20AT 型泵, SPD-M 20A 检测器, CTO-20A 柱温箱, LC solution 数据处理系统, 日本岛津公司)。SARTIM S 2004MP 型 1/10 万电子分析天平。

1.2 药品与试剂 红链霉素龙胆二糖苷、决明子苷、auranthiobutyrin-6- O - β -D-glucopyranoside 以及决明子苷 B 对照品为本实验室自制, 经 HPLC 检查, 用面积归一化法计算, 纯度大于 98%; 决明子药材分别购

于全国各地药材市场或药材公司, 由中国中医科学院中药所王祝举研究员鉴定为豆科植物决明子 *C. obtusifolia* 的干燥成熟种子。乙腈为 HPLC 级 (Fisher 公司), 甲醇为色谱纯 (天津四友公司), 水为重蒸水, 四氢呋喃, 冰醋酸为色谱级, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相水-乙腈-四氢呋喃-冰醋酸 (100: 23: 5: 1)。检测波长 278 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。进样量 10 μ L。在该色谱条件下, 样品中红链霉素龙胆二糖苷, 决明子苷, auranthiobutyrin-6- O - β -D-glucopyranoside 以及决明子苷 B 的色谱峰与其他非被测成分峰能达到基线分离, 保留时间在 30 min 内, 对照品与样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品红链霉素龙胆二糖苷 1.37 mg, 决明子苷 1.53 mg, auranthiobutyrin-6- O - β -D-glucopyranoside 1.51 mg 以及决明子苷 B 1.04 mg, 置 5 mL 量瓶中, 用 90% 甲醇溶解并定容。分别准确量取 2, 1, 2, 0.5 mL 置同一个 10 mL 量瓶中, 用 90% 甲醇定容, 摇匀, 既得混合对照品溶液。每 1 mL 对照品溶液分别含红链霉素龙胆二糖苷 0.054 8 mg, 决明子苷 0.030 6 mg, auranthiobutyrin-6- O - β -D-glucopyranoside 0.060 4 mg 及决明子苷 B 0.010 4 mg。

2.3 供试品溶液制备 取样品粉末 (过 60 目筛) 0.2 g 精密称定, 置圆底烧瓶中, 准确加入 25 mL

[稿件编号] 20101105004

[通信作者] 王祝举, Tel: (010) 64033301, Email: wangzhujia@sina.com

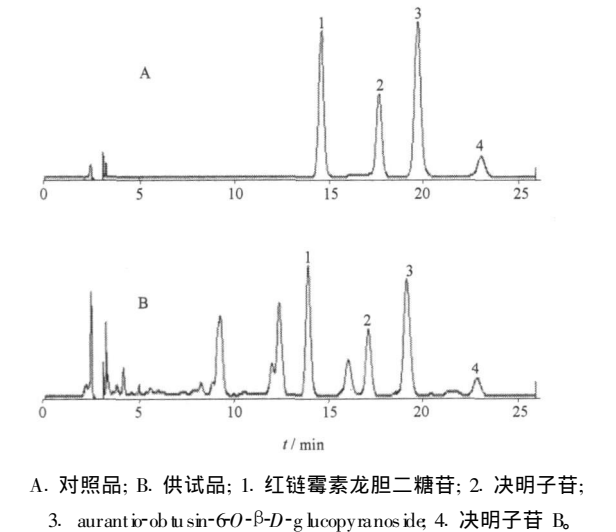


图 1 决明子对照品与样品的色谱图

90% 甲醇, 称重, 加热回流 2 h 放至室温, 用 90% 甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 以微孔滤膜 (0.45μm) 滤过即得供试品液。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μL 依次进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y), 进样量 (μg) 为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 回归方程和线性范围见表 1。

表 1 回归方程和线性范围

化学成分	回归方程	r	线性范围 /μg
红链霉素龙胆二糖苷	$Y = 4 \times 10^4 X - 101\ 322$	0.999 9	0.274~1.37
决明子苷	$Y = 4 \times 10^4 X - 71\ 760$	0.999 9	0.153~0.765
aurantiobtusin-6-O-β-D-glucopyranoside	$Y = 4 \times 10^4 X - 248\ 925$	0.999 9	0.302~1.51
决明子苷 B	$Y = 4 \times 10^4 X - 25\ 322$	0.999 9	0.052~0.26

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 在上述色谱条件下测定峰面积, 计算 5 次峰面积的 RSD, 结果 4 种对照品的 RSD 分别为红链霉素龙胆二糖苷 0.09%, auranthiobtusin-6-O-β-D-glucopyranoside 0.47%, 决明子苷 0.35%, 决明子苷 B 1.4%。表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验 称取同一样品 0.2 g 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 准确吸取供试液 10 μL, 分别在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测定样品中 4 种被测成分的峰面积, 计算 RSD, 结果红链霉素龙胆二糖苷, 决明子苷, auranthiobtusin-6-O-β-D-glucopyranoside 以及决明子苷 B 在 24 h 内峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.3%,

1.3%, 1.8%。表明在 24 h 内样品的稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一样品, 称取 6 份, 每份 0.2 g 按 2.3 项下方法制备供试品溶液。准确吸取供试液 10 μL 进样, 测定峰面积, 计算含量。结果 6 份样品中, 红链霉素龙胆二糖苷, 决明子苷, auranthiobtusin-6-O-β-D-glucopyranoside 及决明子苷 B 含量的 RSD 分别为 2.1%, 2.6%, 1.2%, 2.6%, 表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验 分别取 6 份已知含量的决明子粉末 0.03 g 精密称定, 每份准确加入混合对照品溶液 5 mL, 按 2.3 项下方法操作, 制备供试液, 以选定的色谱条件进行测定, 结果见表 2。

表 2 决明子粉末加样回收率

对照品	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
红链霉素龙胆二糖苷	0.288	0.274	0.561	99.7	100.9	1.8
	0.280		0.559	101.8		
	0.284		0.563	101.8		
	0.287		0.562	100.3		
	0.288		0.557	98.2		
	0.285		0.569	103.5		
决明子苷	0.177	0.153	0.332	101.1	101.2	1.2
	0.179		0.335	101.7		
	0.182		0.339	102.2		
	0.178		0.329	98.9		
	0.181		0.337	101.9		
	0.175		0.330	101.1		
aurantiobtusin-6-O-β-D-glucopyranoside	0.310	0.302	0.614	100.6	99.40	2.2
	0.304		0.612	102.0		
	0.320		0.613	97.2		
	0.301		0.609	101.4		
	0.321		0.615	97.8		
	0.319		0.613	97.5		
决明子苷 B	0.063	0.052	0.116	101.6	100.5	1.6
	0.061		0.114	101.6		
	0.064		0.117	102.3		
	0.064		0.115	98.4		
	0.064		0.116	99.5		
	0.062		0.113	99.4		

2.9 样品含量测定 精密称取不同产地干燥决明子粉末 0.2 g 按 2.3 项下方法制备供试品溶液。准确吸取 10 μL, 进样, 在上述色谱条件下测定, 计算 10 批不同地区市售决明子药材中红链霉素龙胆二糖苷、决明子苷、aurantiobtusin-6-O-β-D-glucopyranoside 及决明子苷 B 的含量, 见表 3。

表 3 各地区市售决明子药材含量测定 (n = 3) %

来源	红链霉素 龙胆二 糖苷	决明 子苷	aurantiobtusir 6-O-β-D- glucopyranoside	决明子苷 B	总和
陕西	0.71	0.26	0.84	0.09	1.90
广西	0.74	0.22	0.88	0.09	1.93
广东	0.81	0.20	0.99	0.20	2.20
南昌	0.96	0.14	1.46	0.12	2.68
河北	0.80	0.56	1.00	0.28	2.64
湖北	0.66	0.41	0.78	0.18	2.03
湖南	0.56	0.17	0.86	0.04	1.63
东北	0.56	0.32	0.68	0.01	1.57
山东	0.68	0.44	0.84	0.18	2.14
安徽	0.96	0.59	1.00	0.21	2.76

3 结果与讨论

本研究建立了高效液相色谱法同时测定决明子中蒽醌苷类和萘并吡喃酮苷 4 种主要成分含量的方法, 该方法准确, 灵敏, 简单, 快速, 可作为决明子药材质量标准的方法之一。

对全国各地不同来源的 10 批决明子中 4 种成分进行了含量测定, 结果表明, 不同来源的决明子中 4 种成分的含量有较大差异, 可达 40% 以上甚至更大。4 种成分在决明子中的含量分布具有一定的相关性, 同一个样品, 4 种成分的含量基本呈平行关系。

本研究考察了不同流动相的分离效果, 1% 冰醋酸-乙腈-四氢呋喃 (79: 18: 3), 分离效果差。梯度洗

脱, 考察结果不理想, 最终采用流动相水-乙腈-四氢呋喃-冰醋酸 (100: 23: 5: 1) 等度洗脱分离效果好, 并且方法学考察结果理想。

分别考察了冷浸、超声、热回流 3 种提取方法, 结果表明热回流对蒽醌苷类及萘并吡喃酮苷都有很好的提取效果; 并且考察了 70%, 90% 及纯甲醇 3 种溶剂的提取效率, 结果表明在甲醇中稍加水可以使提取效果有很大的提高; 同时考察了 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h 时的提取效率, 结果表明 2 h 时已提取完全, 所以选择 90% 甲醇溶液热回流 2 h 作为提取方法。

本研究首次同时测定了决明子中蒽醌苷以及萘并吡喃酮苷中 4 种主要原生苷类化合物的含量, 为决明子的质量控制提供了参考依据。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 135.

[2] 张启伟, 阴健, 张俊. 生、炒决明子及其煎剂中部分活性成分的比较 [J]. 中草药, 1996, 27(2): 79.

[3] Wang SM, MaryM W, Otto S et al Anthraquinone Glycosides from the Seeds of *Cassia tora* [J]. Phytochemistry, 1989, 28(1): 211.

[4] Wong SM, MaryM W, Otto S et al New Antihypertensive Naplthorpyrone Glycosides from the Seeds of *Cassia tora* [J]. Planta Med, 1989, 55(3): 276.

[5] 胡轶娟, 万丽, 张加雄, 等. 高效液相色谱法测定不同产地决明子中橙黄决明素含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1138.

Sim ultaneous detem ination of 4 major com ponents in semen cassiae obtusifoline by HPLC

SU Huijuan WANG Zhuji*, TANG Liying
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective To establish a HPLC method for the simultaneous determination of 4 major components in semen cassiae obtusifoline and provide valuable data for quality control of semen cassiae obtusifoline. Method Kromasil 100-5 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Eluted with water-acetonitrile-tetrahydrofuran-glacial acetic acid (100:23:5:1). Detect at 278 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Result Four compositions were separated well. Good linearities were obtained within the range of 0.274-1.37 μg, 0.153-0.765 μg, 0.302-1.51 μg and 0.052-0.26 μg for rubrofusarin gentiobioside, casside, auranitobtusir 6-O-β-D-glucopyranoside, casside B respectively. The average recoveries were 100.9% (RSD 1.8%), 101.2% (RSD 1.2%), 99.40% (RSD 2.2%), 100.5% (RSD 1.6%). Conclusion The method is accurate, reliable and convenient. It can be used to control the quality of semen cassiae obtusifoline and its products.

[Key words] HPLC; semen cassiae obtusifoline; rubrofusarin gentiobioside; auranitobtusir 6-O-β-D-glucopyranoside; casside; casside B; determination

doi 10.4268/cjmm2011017

[责任编辑 丁广治]