

HPLC法同时测定不同产地羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量

何盛江^{1*}, 聂阳^{1#}, 陈刚², 焦豪妍¹, 杨燕军¹(1.广东省中药研究所, 广州 510520; 2.解放军第113医院, 浙江宁波 315040)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4719-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.37

摘要 目的:建立同时测定羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的方法,并比较不同产地药材各成分含量差异。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。结果:大黄素、大黄酚、大黄素甲醚检测质量浓度线性范围分别为2.04~24.48 μg/ml($r=0.9997$)、2.00~24.00 μg/ml($r=0.9995$)、1.02~12.24 μg/ml($r=0.9998$);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为97.09%~102.65%(RSD=1.79%, $n=9$)、97.10%~100.31%(RSD=0.97%, $n=9$)、95.45%~100.18%(RSD=1.45%, $n=9$)。结论:该方法检测简便,精密密度、稳定性、重复性好,可用于羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的同时测定;不同产地药材中各成分含量差异显著。

关键词 高效液相色谱法;羊蹄;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚;含量测定

Simultaneous Determination of Emodin, Chrysophanol and Physcion in *Rumex japonicus* from Different Producing Areas by HPLC

HE Shengjiang¹, NIE Yang¹, CHEN Gang², JIAO Haoyan¹, YANG Yanjun¹(1.Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510520, China; 2.Chinese PLA 113 Hospital, Zhejiang Ningbo 315040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for contents determination of emodin, chrysophanol and physcion in *Rumex japonicus*, and compared the differences of components in medicinal materials from different producing areas. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent C₁₈ with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 35 ℃, and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 2.04-24.48 μg/ml for emodin ($r=0.9997$), 2.00-24.00 μg/ml for chrysophanol ($r=0.9995$) and 1.02-12.24 μg/ml for physcion ($r=0.9998$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 97.09%-102.65% (RSD=1.79%, $n=9$), 97.10%-100.31% (RSD=0.97%, $n=9$) and 95.45%-100.18% (RSD=1.45%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple with high precision, stability and reproducibility, and can be used for the simultaneous determination of emodin, chrysophanol and physcion in *R. japonicus*. There are obvious differences in medicinal materials from different producing areas.

KEYWORDS HPLC; *Rumex japonicus*; Emodin; Chrysophanol; Physcion; Content determination

羊蹄为蓼科属植物皱叶酸模 *Rumex crispus* L. 或羊蹄 *Rumex japonicus* Houtt. 的果实,又名东方宿、败毒菜根、牛大黄等,以根或全草入药,具有杀虫、活血止血、清热解毒等功效,可外用于治疗外痔、急性乳腺炎、黄水疮、皮癣等症^[1-2]。羊蹄主要含有大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、酸模素、槲皮素等化学成分,其中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为主要药效成分^[3-5]。目前,各地羊蹄药材质量标准无含量测定项,而文献报道仅以高效液相色谱法(HPLC)测定药材中大黄素或大黄酚单一成分的含量^[6-7]。因此,笔者采用HPLC法同时测定不同产地羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量,为更全面地控制药材质量提供可靠方法。

1 材料

* 副主任药师,博士。研究方向:中药新药与新剂型。电话:020-28854995。E-mail: hesj@gdyzy.edu.cn

通信作者:副主任药师。研究方向:中药活性成分与新药。电话:020-28854883。E-mail: drugs999@163.com

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括DAD二极管阵列检测器(美国Agilent公司);KH-500DE型数控超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:10 kHz)。

1.2 试剂

大黄素对照品(批号:0756-200110,纯度>98%)、大黄酚对照品(批号:110796-201017,纯度>98%)、大黄素甲醚对照品(批号:110758-200610,纯度>98%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

羊蹄药材购自广州清平中药材市场(见表1),经解放军第113医院陈刚副主任药师鉴定为蓼科植物羊蹄 *R. japonicus* Houtt. 的根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇

(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:35 ℃;进样量:20 μl。

表1 羊蹄药材来源
Tab 1 Origin of *R. japonicus*

编号	产地
1	广东始兴
2	广东梅州
3	广西河池
4	江苏徐州
5	四川平武
6	浙江温岭
7	安徽涡阳

表2 梯度洗脱程序
Tab 2 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0~7.5	76→76	24→24
7.5~15.0	76→92	24→8
15.0~16.5	92→72	8→24
16.5~20.0	72→72	24→24

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取大黄素对照品10.2 mg、大黄酚对照品10.0 mg和大黄素甲醚对照品5.1 mg,分别置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为204、200、102 μg/ml的单一对照品贮备液。精密量取上述单一对照品贮备液适量,置于同一10 ml量瓶中,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 将药材粉碎,过40目筛,精密称取0.20 g,置于具塞锥形瓶中,加甲醇25 ml,称定质量,加热回流30 min,放冷,再次称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,得续滤液。精密量取上述续滤液5 ml,置于圆底烧瓶中,挥去甲醇,加8%盐酸溶液10 ml,超声处理5 min,再加三氯甲烷10 ml,加热回流1 h,冷却,移至分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液用三氯甲烷提取2次,每次10 ml。三氯甲烷液依次以铺有无水硫酸钠2 g的漏斗滤过,合并三氯甲烷液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,转移至10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,在此色谱条件下,对照品和样品中其他成分均可达到基线分离,与相邻色谱峰的分度均>1.5;理论板数以大黄素峰计≥3 000。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下大黄素、大黄酚、大黄素甲醚单一对照品贮备液各0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加流动相定容,制成系列单一对照品溶液。精密量取上述系列单一对照品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量

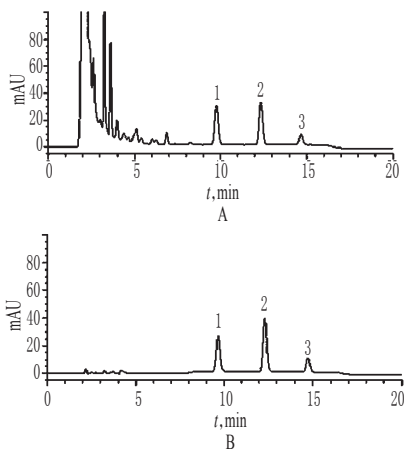


图1 高效液相色谱图

A.供试品;B.混合对照品;1.大黄素;2.大黄酚;3.大黄素甲醚

Fig 1 HPLC chromatogram

A.test sample; B.mixed reference substance; 1.emodin; 2.chrysophanol; 3.physcion

浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得大黄素、大黄酚、大黄素甲醚回归方程分别为 $y=44.737x-2.9878$ ($r=0.9997$)、 $y=66.738x-12.416$ ($r=0.9995$)、 $y=34.554x-2.7702$ ($r=0.9998$)。结果表明,大黄素、大黄酚、大黄素甲醚检测质量浓度线性范围分别为2.04~24.48、2.00~24.00、1.02~12.24 μg/ml。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.17%、0.89%、1.02% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:1)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.48%、0.27%、1.18% ($n=7$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均含量分别为1.711、1.102、0.456 mg/g, RSD分别为1.42%、1.55%、0.87% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(编号:1)适量,共6份,分别加入低、中、高质量的大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.9 样品含量测定

取7批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶

液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表3 加样回收试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery test(n=9)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
大黄素	0.100 2	0.171 4	0.142 8	0.312 1	98.50	99.37	1.79
	0.100 5	0.172 0	0.142 8	0.310 6	97.09		
	0.099 7	0.170 6	0.142 8	0.309 8	97.49		
	0.100 3	0.171 6	0.183 6	0.354 7	99.72		
	0.099 2	0.169 7	0.183 6	0.358 2	102.65		
	0.100 3	0.171 6	0.183 6	0.355 6	100.21		
	0.100 4	0.171 8	0.204 0	0.378 3	101.23		
	0.099 3	0.169 9	0.204 0	0.371 2	98.68		
	0.099 8	0.170 8	0.204 0	0.372 2	98.75		
大黄酚	0.100 2	0.110 4	0.080 0	0.190 4	99.97	99.37	0.97
	0.100 5	0.110 8	0.080 0	0.191 0	100.31		
	0.099 7	0.109 9	0.080 0	0.189 7	99.79		
	0.100 3	0.110 5	0.100 0	0.210 1	99.57		
	0.099 2	0.109 3	0.100 0	0.208 9	99.58		
	0.100 3	0.110 5	0.100 0	0.210 3	99.77		
	0.100 4	0.110 6	0.120 0	0.230 2	99.63		
	0.099 3	0.109 4	0.120 0	0.227 8	98.64		
	0.099 8	0.110 0	0.120 0	0.226 5	97.10		
大黄素甲醚	0.100 2	0.045 7	0.030 6	0.074 9	95.45	98.23	1.45
	0.100 5	0.045 8	0.030 6	0.076 0	98.60		
	0.099 7	0.045 5	0.030 6	0.075 2	97.18		
	0.100 3	0.045 7	0.040 8	0.085 7	97.95		
	0.099 2	0.045 2	0.040 8	0.085 4	98.44		
	0.100 3	0.045 7	0.040 8	0.086 2	99.17		
	0.100 4	0.045 8	0.051 0	0.095 5	97.49		
	0.099 3	0.045 3	0.051 0	0.096 1	99.65		
	0.099 8	0.045 5	0.051 0	0.096 6	100.18		

表4 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 4 Determination results of contents in samples(n=3,mg/g)

样品编号	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
1	1.711	1.102	0.456
2	0.825	0.864	0.230
3	1.107	0.806	0.295
4	1.498	0.969	0.262
5	1.908	1.272	0.509
6	0.947	0.735	0.197
7	1.897	1.223	0.506

3 讨论

药材中的大黄素、大黄酚、大黄素甲醚以结合态、游离态形式存在^[8],因此样品的前处理是保证含量测定结果准确的关键。本试验采用甲醇回流提取,酸性甲醇水解,水解温度比在酸水中低,酚类成分破坏少,加上去除了萃取和蒸干步骤,理论上测定的含量更接近其真实含量^[9]。

参考药典^[8]及文献^[10]方法,HPLC法测定以甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相,经过多次预试验优化,确定梯度洗脱程序。结

果表明,本试验所建立的HPLC法在16 min内可完成测定,大黄素、大黄酚的保留时间约为9.8、12.3 min,两者分离效果好,不仅耗时短、操作简便、重复性好,而且结果可靠。

本试验对全国7个产地羊蹄药材中大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量进行测定,结果平均含量分别为1.41、1.00、0.35 mg/g,RSD分别为32.06%、20.96%、38.51%,表明不同产地羊蹄药材中各成分含量差异显著。笔者采购的全国7个产地羊蹄药材为其根部,而仔细观察药材却发现各地药材根部上部保留的茎长短不一,这可能导致含量差异,参考与羊蹄同属的大黄药材的根头、根身和根尾等部位所含的大黄素、大黄酚等成分的含量差别较大,含量顺序为依次递减^[11],这可印证羊蹄药材不同部位含量存在差异。有研究发现,羊蹄的根中大黄素含量高于根茎中含量,酸性土壤条件下羊蹄根中大黄素的含量明显高于碱性土壤条件^[6]。

综上所述,本方法检测简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于羊蹄药材中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的同时测定。

参考文献

- [1] 中华本草编撰委员会.中华本草:第2册[M].上海:上海科学技术出版社,1999:729.
- [2] 吴琪,黄璐,茹梦,等.羊蹄化学成分及其抗肿瘤活性研究[J].药学与临床研究,2013,21(3):227.
- [3] 邱小梅,邹剑成,王定勇.羊蹄根的化学成分研究[J].中国药房,2009,20(9):681.
- [4] 邓立华,刘丹,雷钧涛.羊蹄根有效部位的初步分离[J].吉林医药学院学报,2009,30(4):197.
- [5] 林菲娟.正交试验法优选羊蹄中游离蒽醌的提取工艺[J].中药材,2012,35(9):1 521.
- [6] 周子晔,林迦勒,林观样.不同土壤性质下羊蹄各部位大黄素含量的比较[J].中华中医药学刊,2012,30(2):428.
- [7] 邹剑成,邱小梅,王定勇.RP-HPLC法测定羊蹄根中大黄素的含量[J].中药材,2009,32(7):1 081.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:22,237.
- [9] 张力,马静,欧洋,等.四川产亚大黄的鉴别及其大黄素、大黄酚的测定[J].华西药学杂志,2015,30(3):322.
- [10] 卫莹芳,谢达温,万丽,等.HPLC梯度洗脱法同时测定决明子中樱黄决明素、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,2009,11(6):868.
- [11] 王荣,贾正平,张强,等.甘肃道地药材大黄不同部位的指纹图谱研究[J].中国药房,2012,23(1):39.

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-01-14)

(编辑:张 静)

《中国药房》杂志——WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,欢迎投稿、订阅