

大黄中总大黄素成分含量测定条件优选

魏凤玲, 单光璇, 朱立平, 李 辉
(中日友好医院药学部, 北京 100029)

摘要: 目的: 优选大黄中总大黄素成分含量测定条件。方法: 采用均匀设计法, HPLC 测定其含量, 对影响总大黄素含量的主要因素: 水解时间、酸的浓度、酸用量、氯仿提取次数及氯仿用量 5 个因素进行考察, 结果利用 UROS 系统软件回归处理, 得出优化条件: 水解时间 9min; 氯仿用量 70ml; 提取次数 2 次; H_2SO_4 用量 10ml; H_2SO_4 浓度 1mol/L 经验证试验, 重复性好, 结果可靠。

关键词: 大黄; 蒽醌; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)01-0014-02

Determination Method of Anthraquinonoids in Radix et Rhizoma Rhei

WEI Feng-ling, SHAN Guang-xuan, ZHU Li-ping, LI Hui

(Department of pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029, China)

Abstract: Objective: To select the optimum extracted method of anthraquinonoids from radix et rhizoma Rhei by RP-HPLC. Methods: The main factors effecting the total anthraquinonoids, such as hydrolysis time, concentration and volume of acid, extraction times and volume of chloroform were examined by uniform design method. The data were calculated by UROS system. Results: The optimum extracted conditions: hydrolysis with 1mol/L H_2SO_4 10ml for 9min, extracted by 70ml chloroform for two times. Conclusion: This method was validated to show reliable and reproducible.

Key words: Radix et Rhizoma Rhei; Anthraquinone; HPLC

大黄中蒽醌类成分具有泻热通便, 促进肠蠕动等作用, 曾有比色法、HPLC 法等含量测定方法报道^[1,2], 其方法均需进行样品处理, 将结合型蒽醌类成分酸水解成游离蒽醌, 测定总蒽醌的含量。如处理方法不当, 会造成含量测定结果不准确。为优选出合理的样品处理方法, 实验采用均匀设计法, 对大黄中结合型大黄素成分的水解时间、酸的浓度、用量、氯仿提取次数及用量 5 个因素对总大黄素含量的影响进行考察, HPLC 测定其含量, 利用 UROS 系统软件对结果进行回归处理。

1 仪器试剂与药材

SCL-6 型 HPLC, 日本岛津。试剂均为分析纯。大黄素对照品由中国药品生物制品鉴定所提供。大黄药材购于北京市药材公司, 经中国药品生物制品鉴定所刘宝玲副研究员鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 波长选择 用 UV3000 紫外分光光度计紫外全波长扫描, 大黄素在 254nm 处有最大吸收。故选用

254nm 作为测定波长。

2.2 色谱条件 色谱柱: UPECOSILTM CL-18 4.6mm $\times$ 250mm; 流动相: 甲醇-水 (75: 25) 用磷酸调 pH = 3.5; 流速: 1.0ml/min, 柱温: 常温; 检测波长 254nm。

2.3 线性范围考察 精密取大黄素对照品 25.2mg, 置 10ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度作为对照品溶液。精密吸取 1.0 2.0 4.0 8.0 16.0ml, 分别置 5ml 容量烧瓶中, 加甲醇稀释至刻度。分别精密吸取 20 μ l, 注入液相色谱仪, 以大黄素进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程为: $Y = -4938.44 + 3178.405X$ $r = 0.9999$ 线性范围: 0.05mg ~ 0.81mg。

2.4 总大黄素含量测定条件优选

2.4.1 取大黄粗粉 100g, 6 倍量 95% 乙醇回流提取 4 次, 每次 30min, 提取液合并, 回收醇至 1: 5 (大黄: 提取液), 作为供试品溶液。

2.4.2 实验安排与结果 (见表 1)

分别精密吸取供试液 2ml, 置 100ml 圆底烧瓶中, 以下操作按实验安排表中条件进行。表中数据利用 UROS 系统软件回归处理, 得回归方程为: $Y = 0.1115 + 1.1301 \times 1 + 0.2690 \times 2 + 0.2102 \times 4 -$

$$5.5065 \times 5 - 0.1258 \times 1 \times 1 - 0.0027 \times 2 \times 2 - 0.0105 \times 3 \times 3 + 1.3704 \times 5 \times 5$$

表 1 实验安排与结果

编号	X1 回流时间 min	X2 氯仿加入量 (ml)	X3 氯仿提取次数 次	X4 硫酸加入量 (ml)	X5 硫酸浓度 (mol)	大黄素 含量 (mg)
1	2	40	3	4	3	4.8635
2	3	60	2	8	3	6.2524
3	4	30	1	16	2	6.0701
4	5	50	1	4	2	4.6455
5	6	70	4	12	2	4.7739
6	7	30	3	16	1	6.6544
7	8	50	2	8	1	5.2806
8	9	70	2	12	1	4.0475
9	10	40	1	4	4	5.9967
10	1	60	4	8	4	5.1721

分析上述方程, 优化条件设为 X1(水解时间) = 9min X2(氯仿用量) = 70ml X3(氯仿提取次数) = 1 X4(硫酸用量) = 10ml X5(硫酸浓度) = 1mol。

上述数据代入方程, 预测值 $Y = 16.89$, 其预测值比上述实验安排中的 10 个实验结果好。根据提取原理和实践经验, 将提取次数改为 2 次, 氯仿用量第一次 50ml, 第二次 20ml, 进行对比试验, 结果, 二次提取含量稍高。

2.5 验证试验 按上述优化条件进行 3 次测定, 精密吸取供试液 2ml, 置 100ml 圆底烧瓶中, 加入 1mol/L 硫酸 10ml, 加热回流 9min, 移出, 静置 5min, 冷水浴冷却, 加入氯仿 50ml, 加热回流 5min, 移出, 静置 5min, 冷水浴冷却, 用吸管吸出氯仿层溶液, 100ml 圆底烧瓶中, 再加氯仿 20ml, 加热回流 5min, 移出, 静置 5min, 冷水浴冷却, 用吸管吸出氯仿层溶液, 合并氯仿, 置蒸发皿中全部挥干(温度不超过 80℃), 用 10min 甲醇溶解并稀释至刻度, 过滤。HPLC 法测定其峰面积, 结果代入回归方程, 计算含量, 其结果接

近预测值, 证明条件可行。

2.6 回收率的测定 取 1.1560mg/ml 的大黄素对照品溶液 1ml, 加入供试液 1ml, 置 100ml 圆底烧瓶中, 以下自“加入氯仿 50ml”上述含量测定项下相同, 结果见表 2。

表 3 回收率测定结果

样品号	供试品含量 (药材+对照品 mg)	测定含量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD
1	1.3223	2.4605	98.46	100.49	2.65
2	1.3369	2.4754	99.49		
3	1.3367	2.5488	104.85		
4	1.4057	2.5568	99.58		
5	1.3355	2.5049	101.16		

3 讨论

测定总蒽醌的含量^[2-3] 文献, 以不同浓度的硫酸(0.5mol/L~ 2.5mol/L)水解 20min~ 2h。预实验发现, 4mol 硫酸水解时间不足 5min, 其含量低(水解不完全), 水解时间超过 10min, 含量稍低, 1mol 硫酸, 水解时间超过 20min, 含量明显降低, 说明酸的浓度和水解时间对含量有一定影响。

均匀设计的实验结果数据经回归处理, 得回归方程, 结合实践经验选择优化条件, 结果可靠, 建议在制剂研究中推广使用。

参考文献:

- [1] 丁安伟, 黄敏, 孔令东, 等. 正交试验法对大黄总蒽酯衍生物提取条件的优选[J]. 中药通报, 1988, 13(5): 239.
- [2] 柏茗, 李新荣, 杨小云, 等. 槟榔四消丸质量控制方法探讨[J]. 中国中药杂志, 1995, 30(1): 42.
- [3] 郭澄, 张纯. 正交试验法优选大黄醇回流提取工艺[J]. 药学实践杂志, 1996, 14(1): 40.
- [4] 魏凤玲, 齐敏超, 钟加胜. 大黄蒽酯类成分提取工艺优选[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(10): 609.