

HPLC 测定决明子中 3 种萘骈吡喃酮苷含量

徐义龙,唐力英,周喜丹,周国洪,王祝举*
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定决明子中红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 含量的方法。方法:采用 HPLC,Dionex Acclaim C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-四氢呋喃-1% 冰醋酸(17:2:81),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 278 nm。结果:红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 的进样量分别在 0.218~1.090,0.188~0.940,0.200~1.000 μg 和峰面积呈良好的线性关系,回归方程分别为 $Y=54.017X-0.3446$ ($r=0.9999$), $Y=78.63X-0.354$ ($r=0.9999$), $Y=74.098X-0.4335$ ($r=0.9999$);平均加样回收率分别为 98.43% (RSD 1.75%),101.89% (RSD 1.10%),102.46% (RSD 1.15%)。结论:该方法快速、灵敏、准确、可靠、重复性好,可用于中药决明子药材的质量控制。

[关键词] 决明子;红镰霉素龙胆二糖苷;决明子苷;决明子苷 C;含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0054-03

[doi] 10.11653/syjf2014050054

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1420.019.html>

[网络出版时间] 2013-12-18 14:20

Determination of Three Naphthopyrone Glycosides in
Cassia obtusifolia by HPLC

XU Yi-long, TANG Li-ying, ZHOU Xi-dan, ZHOU Guo-hong, WANG Zhu-ju*
(Institute of Traditional Chinese Materia Medica, Chinese Academy
of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatographic method (HPLC) for simultaneous determination of rubrofusarin gentiobioside, casside, cassiaside C in *Cassia obtusifolia*. **Method:** The HPLC with Dionex Acclaim C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used, acetonitrile-THF-1% acetic acid (17:2:81) was used as a mobile phase, with flow rate of 1 mL·min⁻¹, column temperature at 30 ℃ and detection wavelength at 278 nm. **Result:** Rubrofusarin gentiobioside, casside, cassiaside C showed good linearity ($r=0.9999$) in the range of 0.218-1.09, 0.188-0.94, 0.200-1.000 μg, regressive equation were $Y=54.017X-0.3446$ ($r=0.9999$), $Y=78.63X-0.354$ ($r=0.9999$), $Y=74.098X-0.4335$ ($r=0.9999$) respectively; the average recoveries of the method were 98.43%, 101.89%, 102.46%, RSD were 1.75%, 1.10%, 1.15%. **Conclusion:** The method was proved to be simple, rapid, sensitive, precise, reliable and repeatable. It can be applied to the quality control of Semen Cassia.

[Key words] *Cassia obtusifolia* L.; rubrofusarin gentiobioside; casside; cassiaside C; determination

决明子为豆科植物决明或小决明的干燥成熟种子,具有清肝明目、润肠通便的功效^[1]。决明子始载于《神农本草经》,列为上品,历代本草及医学著作均有收载,是一味应用频次高、药效显著、资源丰富的传统中药。同时,决明子也被列为卫生部“既是食品又是药品的物品”名单中,由此可见其在医

[收稿日期] 20130917(007)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173552)

[第一作者] 徐义龙,在读硕士研究生,从事饮片化学成分与质量标准研究,Tel:010-64013301,E-mail:xuyilongjx@163.com

[通讯作者] *王祝举,研究员,硕士生导师,从事饮片化学成分及炮制原理研究,Tel:010-64033301,E-mail:wangzhuju@sina.com

疗保健方面的重要作用。现代研究表明,决明子中含蒽醌类、萘并吡喃酮类、脂肪酸类、氨基酸和无机元素等,其主要成分为蒽醌类和萘并吡喃酮类^[2-5]。药理作用主要有保肝、降血脂、降血压、润肠通便等^[6-7]。萘并吡喃酮类成分是决明子中一类具有特异性的成分,具有对抗四氯化碳和半乳糖胺对原代培养小鼠肝细胞毒害的作用^[8-9]。目前,决明子药材的质量控制大多采用蒽醌苷元类成分为指标来控制其含量,2010年版《中国药典》收载的含测方法是以大黄酚和橙黄决明素为指标,这些成分在决明子中专属性差、含量低,且提取方法需要经过酸水解步骤,操作繁琐。我们在前期的研究中曾采用萘并吡喃酮糖苷类化合物红镰霉素龙胆二糖苷为指标对其进行含量测定,结果其含量较高且具有较好的专属性^[10]。通过对决明子化学成分的进一步研究,我们选取3个含量较高,专属性好,且有保肝活性的萘并吡喃酮糖苷类成分(红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷C)进行定量分析研究,建立高效液相色谱法测定其含量,并对不同来源的决明子药材进行成分测定。

1 仪器与试药

Dionex U-3000 型高效液相色谱仪系列,包括 Dionex U-3000 DAD 检测器, Dionex U-3000 pump, Dionex U-3000 Auto sampler, Dionex U-3000 RS Column compartment, Chromeleon 7 色谱工作站。METTLER TOLEDO 型 1/10 万电子分析天平。

红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 对照品由本实验室自制,结构经波谱鉴定,用 HPLC 法测定纯度均 > 98%,乙腈为 HPLC 级(Fisher 公司),甲醇为色谱纯(Fisher 公司),水为重蒸水,其余试剂为分析纯。决明子药材于 2011 年购自安徽亳州,由王祝举研究员鉴定为豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* 或小决明 *C. tora* 的成熟种子。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Dionex Acclaim C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-四氢呋喃-1%冰醋酸(17:2:81),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 278 nm。

2.2 样品制备

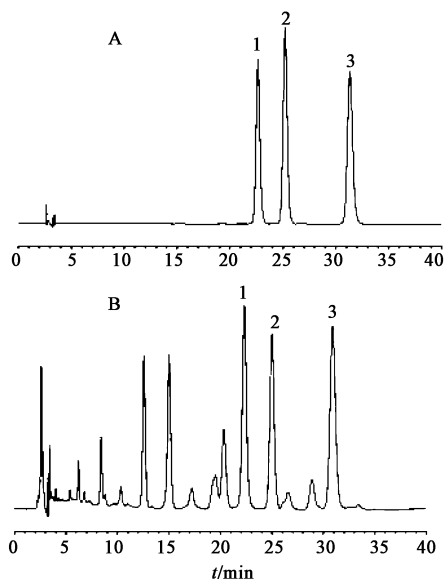
2.2.1 对照品溶液的制备 分别称取红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 各 1 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,配置成 0.109,0.094,0.100 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 将决明子药材粉碎,过

4 号筛,取 200 mg,精密称定,置于 50 mL 三角瓶中,准确加入 25 mL 甲醇,称重,水浴回流提取 1 h,放至室温,再称重,用甲醇补足减失的质量,过滤,弃去初滤液,取续滤液适量,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤即为供试品溶液,备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2,4,6,8,10 μL 进样,测定峰面积,记录数据。分别以进样量为横坐标(*X*),峰面积为纵坐标(*Y*)绘制标准曲线,得红镰霉素龙胆二糖苷的回归方程为 $Y = 54.017X - 0.3446$ ($r = 0.9999$),在 0.218 ~ 1.090 μg 呈良好的线性关系;决明子苷的回归方程为 $Y = 78.63X - 0.354$ ($r = 0.9999$),在 0.188 ~ 0.940 μg 呈良好的线性关系;决明子苷 C 的回归方程为 $Y = 74.098X - 0.4335$ ($r = 0.9999$),在 0.200 ~ 1.000 μg 呈良好的线性关系。对照品和供试品的液相色谱图见图 1。



1. 红镰霉素龙胆二糖苷;2. 决明子苷;3. 决明子苷 C

图 1 对照品(A)和决明子供试品(B)的液相色谱

2.3.2 精密度试验 吸取对照品溶液,在 2.1 项色谱条件下,连续重复进样 6 次,每次 10 μL,记录红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 的峰面积,计算精密度。红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 的 RSD 分别为 1.07%,0.82%,0.91%,表明精密度良好。

2.3.3 重复性试验 称取同一批决明子样品共 6 份,每份 200 mg,精密称定,按 2.2.2 项下供试品溶液制备方法操作,在上述色谱条件下,吸取 10 μL 测定,记录峰面积,计算含量,红镰霉素龙胆二糖苷、决

明子苷、决明子苷 C 的平均百分含量分别为 0.50% , 0.29% , 0.42% , RSD 分别为 2.07% , 0.84% ,1.54% ,表明重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 按 2.2.2 项下供试品溶液制备方法操作制备决明子供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下,分别在 0,2,4,6,8,12,24 h 测定,记录峰面积。红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 的 RSD 分别为 0.68% ,1.51% ,0.86% 。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 称取已知含量的决明子样品 6 份,每份约 100 mg,分别加入红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷、决明子苷 C 对照品适量,按供试品溶液制备方法操作,并按上述色谱条件测定三者的平均回收率,结果见表 1。

表 1 决明子中 3 种成分加样回收率试验							
成分	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%	
红镰霉素 龙胆二糖苷	0.500 5	0.487 5	0.986 4	99.68	98.55	1.82	
	0.504 0	0.487 5	0.986 7	99.02			
	0.505 5	0.487 5	0.977 5	96.83			
	0.497 5	0.487 5	0.977 6	98.48			
	0.506 0	0.487 5	0.975 1	96.23			
决明子苷	0.504 5	0.487 5	0.997 1	101.04	101.89	1.10	
	0.290 3	0.293 8	0.589 6	101.89			
	0.292 3	0.293 8	0.594 0	102.71			
	0.293 2	0.293 8	0.593 1	102.08			
	0.288 6	0.293 8	0.591 8	103.24			
决明子苷 C	0.293 5	0.293 8	0.587 3	100.03	102.64	1.26	
	0.292 6	0.293 8	0.590 5	101.40			
	0.420 4	0.436 3	0.865 0	101.91			
	0.423 4	0.436 3	0.872 5	102.95			
	0.420 4	0.436 3	0.873 5	103.87			
	0.417 9	0.436 3	0.873 2	104.36	101.49		
	0.424 6	0.436 3	0.867 4	101.49			
	0.423 8	0.436 3	0.865 4	101.23			

2.4 决明子药材的含量测定 分别称取 9 批来源不同的决明子样品 200 mg,按 2.2.2 项制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件,准确吸取供试液 10 μL,进行测定,结果见表 2。

3 讨论

对 9 个不同来源决明子药材中的 3 个萘骈吡喃酮成分进行含量测定,结果表明不同产地中 3 种萘骈吡喃酮类成分含量均较高,明显高于蒽醌苷元类成分的含量。可以看出,该类成分在决明子药材中含量较高,同时具有保肝活性,性质稳定,选取其作

表 2 不同产地决明子药材中 3 种萘骈吡喃酮的含量(n = 3) %			
产地	红镰霉素龙胆二糖苷	决明子苷	决明子苷 C
安徽	0.93	0.36	0.46
浙江	0.64	0.35	0.58
山东	0.58	0.10	0.46
河北	0.63	0.18	0.59
广西	0.50	0.29	0.42
甘肃	0.62	0.38	0.66
陕西	0.66	0.37	0.55
河南	0.66	0.37	0.42
广东	0.63	0.41	0.50

为决明子药材质量控制的指标,能更好的体现药材本身的特征与品质。

比较了不同浓度的甲醇提取效率,结果表明低浓度甲醇中几乎无法提取出所测成分,90% 甲醇与 100% 甲醇提取率基本一致,因此选取甲醇作为提取溶剂。对回流、冷浸、超声等 3 种提取方法进行比较,结果回流提取 1 h 较超声提取 1 h 的提取效果明显提高,而冷浸过夜方法则提取效果较差,在加热条件下提取率明显增高,所以采用热回流提取方法。对提取时间进行了 0.5,1,2,3 h 的比较,结果提取效果基本一致,已提取完全,所以回流时间选择 1 h。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:135.

[2] 郝延军,桑育黎,赵余庆. 决明子的研究进展 [J]. 中草药, 2001,32(9):858.

[3] 肖培根. 新编中药志. 第 2 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002:235.

[4] 杨怀礼,张帮启,张明. 决明子中有效成分和临床应用的初步研究[J]. 基层中药杂志, 2002,16(4):45.

[5] 吕翠婷,黎海彬,李续娥,等. 中药决明子的研究进展[J]. 食品科技, 2006(8):295.

[6] 周建标. 重渗滤法提取决明子有效成分的实验研究[J]. 中国医药导报,2008,5(3):30.

[7] 高丽,周文静,马艳苗,等. 决明子乙醇提取物对高脂血症模型大鼠瘦素及神经肽 Y 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):235.

[8] Wong S M, Wong M, Seligmann O, et al. New antihepatotoxic naphthopyrone glycosides from the seeds of *Cassia tora*[J]. Planta Med, 1989,55(3):276.

[9] Wong S M, Wong M, Seligmann O, et al. Anthraqulnong glycosides from the seeds of *Cassia tora* [J]. Phytochemistry,1989, 28(1):211.

[10] 唐力英,王祝举,邬秋萍,等. HPLC 测定决明子中红镰霉素龙胆二糖苷的含量[J]. 中国中药杂志,2008, 33(2):366.

[责任编辑 顾雪竹]