

· 研究报告 ·

白藜药材中大黄素含量的反相高效液相色谱法测定

孟 飞, 宋学立 (中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院淄博院区, 山东 淄博 255300)

[摘要] 目的 建立白藜药材中大黄素含量的测定方法, 为完善白藜药材的质量控制标准提供方法和依据。方法 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱: Apollo-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸(85:15); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 室温; 检测波长: 220 nm。结果 在选定的色谱条件下, 白藜药材中大黄素在 0.124~3.968 μg/ml 范围内线性关系良好, 直线回归方程为 $Y=53\ 962X-966.46$, $r=0.999\ 7$, 平均回收率为 99.7%, RSD 为 2.5% ($n=9$)。结论 该方法所测结果准确、灵敏度高、重现性好, 适用于白藜药材中大黄素的含量测定。

[关键词] 白藜; 大黄素; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)03-0264-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201911114

Emodin assay in *Ampelopsis radix* by RP-HPLC

MENG Fei, SONG Xueli (Zibo Branch of No. 960 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Zibo 255300, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for Emodin assay in *Ampelopsis radix*, and to improve the quality control of *Ampelopsis radix*. **Methods** Reversed phase high performance liquid chromatography was used. The column: Apollo-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); mobile phase: methanol:0.2% phosphoric acid (85:15); flow rate: 1.0 ml/min; column temperature: room temperature; detection wavelength: 220 nm. **Results** With the specified chromatographic conditions, there was a good linear relationship for Emodin in *Ampelopsis radix* in the range of 0.124-3.968 μg/ml. The linear regression equation was $Y=53\ 962X-966.46$, $r=0.999\ 7$. The average recovery was 99.7%. RSD=2.5% ($n=9$). **Conclusion** This method is accurate, sensitive and repeatable. It is suitable for the determination of emodin in *Ampelopsis radix*.

[Key words] *Ampelopsis radix*; emodin; HPLC

白藜为葡萄科蛇葡萄属植物白藜的干燥块根, 首载于《神农本草经》。白藜是最早用于疮痍、烫伤^[1]治疗的药物, 具有解毒、生肌的功效。资料显示, 白藜在皮肤创伤治疗中的使用频率较高。随着白藜药理研究的不断深入, 发现白藜还具有抗菌、抗病毒^[2-6]、免疫调节及促进溃疡快速愈合等作用。

在 2015 版《中国药典》中, 白藜的质量标准只有定性分析而无定量分析。白藜成分检测中发现其含大黄素等蒽醌类活性成分^[7], 且白藜中大黄素的定量测定方法文献资料^[8-9]较少。本实验采用反相高效液相色谱法, 建立白藜药材中大黄素含量测定方法, 为白藜的质量控制标准提供方法和依据。

[基金项目] 原济南军区联勤部司令部课题(CJN15J052)

[作者简介] 孟 飞, 硕士研究生, 中药师, 研究方向: 中药制剂研究, Email: mengfei2012602182@126.com

[通讯作者] 宋学立, 硕士, 副主任药师, Email: blacket1966@163.com, Tel: (0533)6552149

1 试药与仪器

1.1 试药

大黄素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110756-201512, 经面积归一化法计算含量为 99.1%); 甲醇(烟台远东精细有限公司, 批号: 160706)为色谱纯, 水为超纯水, 磷酸(莱阳市双双化工有限公司, 批号: 2010246)为分析纯, 硫酸(淄博市淄川区张庄化学试剂厂, 批号: 950626)为分析纯。白藜饮片(安国市弘发中药材饮片有限公司, 批号: 131001), 经淄博市中医院药品供应科主任魏星教授鉴定为葡萄科蛇葡萄属植物白藜 *Ampelopsis japonica*(Thunb.) Makino 的干燥块根。

1.2 仪器

Lab Alliance PC 3000 高效液相色谱仪(美国科学系统公司), 紫外检测器(北京普析通用仪器有限公司); LD310-2R 电子天平(沈阳龙腾电子有限公司); FA/JA 系列电子天平(上海上平仪器有限公司); RE-201D 型恒温水浴锅、RE-201D 型旋转

蒸发器(郑州博科仪器设备有限公司);766-3型远红外快速干燥箱(江苏省南通县金余电器配件厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Apollo-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液(85:15),流速1.0 ml/min,检测波长220 nm,进样量20 μl。在此条件下,大黄素与相邻色谱峰分离度良好,无干扰,理论塔板数为2 000。对照品与供试品色谱图见图1。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备

取大黄素对照品(含量为99.1%)约10 mg,精密称定,置于1 000 ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为9.91 μg/ml的大黄素对照品储备液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

取过5目筛的白芍药材粉末,置烘箱内(70±2)℃,2 h烘干。精密称量30 g,用10倍量质量分数20%的硫酸在50℃条件下回流水解2 h。过滤,取滤渣。滤渣用纯化水洗至中性(pH=7),烘干。称其质量,记录。再以8倍量体积的95%乙醇在82℃条件下回流提取2次,每次1 h,过滤,合并乙醇提取液,减压蒸馏,浓缩至无醇味,加乙醇溶解并定容于10 ml容量瓶中,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下制备的大黄素对照品溶液各125、250、500、1 000、2 000、4 000 μl,分别置10 ml容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配制成

6种不同浓度的对照品溶液。依次精密吸取对照品溶液各20 μl注入高效液相色谱仪中,记录峰面积。以峰面积 Y 为纵坐标,对照品溶液浓度 X 为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $Y = 53\,962X - 966.46$, $r = 0.999\,7$;结果表明大黄素在0.124~3.968 μg/ml浓度范围内线性关系良好。

2.3.2 精密度试验

精密量取对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积。大黄素峰面积RSD为1.7%。仪器精密度良好,符合要求。

2.3.3 重复性试验

精密称取同一批号样品6份,按“2.2.2”项下方法平行制备样品溶液,在“2.1”项色谱条件下,分别进样,测定大黄素的峰面积,RSD为1.2%($n=6$),结果表明本方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

按“2.1”项下色谱条件,分别精密量取在室温(10~30℃)下放置0、2.5、5、7.5、10、24 h的同一份供试品溶液各20 μl进样测定,记录大黄素的峰面积,6次进样结果表明,供试品溶液在24 h内基本稳定,RSD为1.5%。

2.3.5 加样回收率试验

取同一批次(批号:20170704)已知含量的白芍药材样品9份,分别按相当于样品溶液中大黄素含量的80%($n=3$)、100%($n=3$)、120%($n=3$)加入“2.3.1”项下制备的对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件进行测定。计算回收率,结果见表1。

2.3.6 样品测定

取不同批次白芍药材样品,分别按“2.3.2”项下方法制备样品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定峰面积,连续进样3次,以外标法计算含量,测定结果见表2。

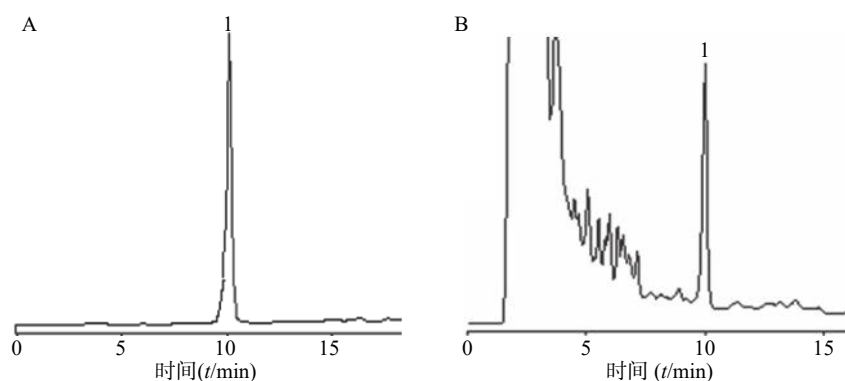


图1 白芍HPLC图

A.对照品;B.供试品;1.大黄素

表1 白芷药材样品加样回收率试验结果

样品含有量 (m/mg)	加样量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.225	0.180	0.399	96.7	99.7	2.5
0.225	0.180	0.403	98.9		
0.225	0.180	0.409	102.0		
0.225	0.225	0.446	98.2		
0.225	0.225	0.458	103.6		
0.225	0.225	0.447	98.7		
0.225	0.270	0.503	103.0		
0.225	0.270	0.494	99.6		
0.225	0.270	0.487	97.0		

表2 白芷样品大黄素含量测定结果 (n=3)

批号	含量(μg/g)	RSD(%)
20170622	17.845	1.16
20170626	19.113	2.07
20170704	15.002	2.50

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 检测波长的选择

笔者所查文献^[8-10]中,测量大黄素所用波长有254、290 nm等。通过实验发现,不同的波长影响其重现性及灵敏度。通过对大黄素标准品甲醇溶液全波段(200~400 nm)紫外扫描可见:其在220、254、260、272、278 nm处均具有特征吸收。通过综合比较上述波长处大黄素峰的峰形及峰面积,220 nm处波长的峰形较好、干扰少、峰面积较大,故选定220 nm作为白芷药材中大黄素的测定波长。

3.1.2 流动相的选择

大黄素的化学名为1'3'8-三羟基-6-甲基蒽醌,具有一定的极性和酸性。所查文献中,大黄素含量测定的流动相体系有多种。在实验过程中发现,流动相对色谱峰的保留时间及分离度有较大影响。故本实验在选择流动相时,考察了不同比例的甲醇-水,乙腈-水,甲醇:0.1%磷酸溶液^[8-10],甲醇:0.5%磷酸溶液^[11],甲醇:0.2%磷酸溶液,甲醇:0.02%磷酸溶液,甲醇:1%冰醋酸^[12]等不同溶剂系统,结果表明,相同条件下,甲醇:0.2%磷酸溶液(85:15)为流动相时,可以达到基线分离,出峰时间较短,峰形较好。

3.1.3 流速与进样量的选择

在流动相及波长选定的条件下,考察了不同流

速(0.5~2.0 ml/min)对出峰时间的影响,当流速小于1.0 ml/min时,保留时间延长,使流动相的用量增加,会造成试剂的浪费;当流速大于1.0 ml/min时,保留时间缩短,但大黄素的峰会与杂质峰产生重叠,影响分离度及重现性。本实验选择1.0 ml/min作为流速。

在样品浓度一定的条件下,考察了不同进样体积(10~30 μl)的影响。实验结果表明,进样体积小于20 μl时,重现性及灵敏度均下降;大于20 μl时,杂质峰明显。当进样量为20 μl时,峰的对称性得到保证。因此,本实验选择20 μl为进样量。

3.2 样品提取方法的选择

已有文献^[8]对白芷中大黄素的提取方法采用甲醇提取及三氯甲烷萃取法。通过实验发现这种方法稳定性差、步骤烦琐,且所用试剂毒性较大。本实验在上述提取方法的基础上,参照大黄药材中大黄素的提取方法^[10],通过4因素(粒度、溶剂剂量、溶剂浓度、提取时间)3水平的正交设计确定了白芷中大黄素的提取方法。结果表明,采用过5目筛的白芷粉末,先用20%的硫酸在50℃条件下回流酸水解2 h,滤渣用纯化水洗至中性。再用8倍量体积的95%乙醇,水浴回流2 h能够达到较好的提取效果。白芷中含大黄素等游离蒽醌,还含有结合型蒽醌^[13-14]。先进行酸水解,使结合型蒽醌水解,结果大黄素的含量有所提高。白芷具有的抗菌性与其中的大黄素^[15-16]有关,大黄素是白芷的活性成分。本提取方法克服了以往相关文献报道方法的不足,分离度好、重现性好、结果准确,因此大黄素作为白芷药材中指标成分有一定可行性,为完善白芷药材的质量控制标准提供了方法和依据。新药临床试验的质量是药品上市后安全、有效的保障^[17],所以临床试验过程中的质量控制尤为重要。包括相似性评价(外观检测和观感评估测试)、安全性评价(常规安全性检测)、适用性评价(薄层鉴别、HPLC、指标成分测定和药理实验)和最终制剂的质量标准。临床试验过程中的质量控制所要评价的范围更广、要求更为严格,是为了确保临床数据的真实、准确、完整和可靠,为下一步临床应用提供依据,对提高医疗水平具有重大意义。

【参考文献】

- [1] 俞琦,蔡琨,田维毅.白芷醇提取物可影响免疫功能[J].中国医药报,2005,5(7):20-21.
- [2] 贾敏,张寒.白芷、乌头单用及合用对人胃腺癌细胞SGC-7901增殖、凋亡的影响[J].现代中西医结合杂志,2011,

- 20(27): 3388-3390.
- [3] 杭佳, 张梦美, 叶晓川, 等. 白藜药效成分没食子酸抑制人肝癌HepG2细胞生长及作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 291-295.
- [4] 张梦美, 叶晓川, 黄必胜, 等. 白藜抗肿瘤活性部位的筛选研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14(2): 40-42.
- [5] 张波, 周芳亮, 卢芳国, 等. 96种中药材对流感病毒神经氨酸酶活性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2788-2792.
- [6] 朱长俊, 朱红薇. 白藜正丁醇提取物抗菌作用研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 2011, 20(1): 67-68.
- [7] 赫军, 羨冀, 宋莹莹, 等. 白藜化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(8): 636-638.
- [8] 陈爱军, 刘运美, 曾雷, 等. 反相高效液相色谱法测定白藜药材中大黄素的含量[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(12): 147-148.
- [9] 汪兴军, 张寒, 王娜娜. 高效液相色谱法检测白藜中大黄素的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(8): 1235-1236.
- [10] 杨世颖, 刘淑聪, 杜冠华, 等. 大黄中药材及其醇、水提取物中大黄素成分分析标准物质研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 456-462.
- [11] 汤丽昌. 保健食品逢泰胶囊中大黄素和大黄酚的含量测定[J]. 食品安全导刊, 2019(31): 62-63.
- [12] 贾文江, 李春, 曹望弟, 等. 商洛野生牛耳大黄中3种成分含量测定及影响因素研究[J]. 中国药业, 2019, 28(22): 13-15.
- [13] 赫军, 畅晓兵, 杨旭, 等. 白藜化学成分(II)[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(3): 188-190.
- [14] 梁国华. HPLC法测定舒痔丸中大黄素与大黄酚的含量[J]. 中国药师, 2010, 13(1): 66-68.
- [15] 沈爱娟, 蔡宛如. 大黄素抗炎作用及对急性肺损伤治疗作用研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(10): 1261-1264.
- [16] 陈海龙, 杨晓燕. 大黄素治疗脓毒症的研究进展[J]. 山东中医杂志, 2018, 37(5): 435-438.
- [17] 陈舒茵, 梁春才, 韦斌, 等. 谈药物临床试验的质量控制[J]. 中国医药导报, 2011, 8(31): 154-156.
- [收稿日期] 2019-11-26 [修回日期] 2020-01-03
[本文编辑] 李睿旻

(上接第254页)

- [9] ZHANG L J, SCHUPPAN D. Traditional Chinese Medicine (TCM) for fibrotic liver disease: hope and hype[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(1): 166-168.
- [10] CHEN Q L, WU F Z, WANG M, et al. Transcriptional profiling and miRNA-target network analysis identify potential biomarkers for efficacy evaluation of fuzheng-Huayu For *Mula*-treated hepatitis B caused liver cirrhosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): E883.
- [11] CHENG Q, LI N, CHEN M Q, et al. Fuzheng Huayu inhibits carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through activating hepatic NK cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 175-181.
- [12] TAO Y Y, YAN X C, ZHOU T, et al. Fuzheng Huayu recipe alleviates hepatic fibrosis via inhibiting TNF- α induced hepatocyte apoptosis[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 449.
- [13] WANG R Q, MI H M, LI H, et al. Modulation of IKK β /NF- κ B and TGF- β 1/Smad via Fuzheng Huayu recipe involves in prevention of nutritional steatohepatitis and fibrosis in mice[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(4): 404-411.
- [14] XIE H D, TAO Y Y, LV J, et al. Proteomic analysis of the effect of fuzheng Huayu recipe on fibrotic liver in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 972863.
- [15] XING X R, CHEN S, LI L, et al. The active components of fuzheng Huayu For *Mula* and their potential mechanism of action in inhibiting the hepatic stellate cells viability-A network pharmacology and transcriptomics approach[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 525.
- [16] 安芸, 杨剑宏, 王臣臣, 等. UHPLC/Q-TOF-MS法分析决明子化学成分[J]. 中成药, 2017, 39(4): 776-781.
- [17] 李军茂, 何明珍, 欧阳辉, 等. 超高效液相色谱与飞行时间质谱联用快速鉴别木芙蓉叶的化学成分[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(14): 1162-1168.
- [18] 吴欢, 占远, 陈海芳, 等. UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS对紫花地丁中化学成分的快速表征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 70-75.
- [19] 陈珏蓓, 马文彪, 王月红. HPLC法测定心舒乐片中丹参酮II A、羟基红花黄色素A、苦杏仁苷[J]. 中成药, 2012, 34(3): 490-494.
- [20] 官玲花. HPLC法同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮II_A的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(32): 3056-3058.
- [收稿日期] 2019-06-12 [修回日期] 2020-03-10
[本文编辑] 李睿旻