HPLC梯度洗脱法同时测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量*

□卫莹芳** 谢达温 万 丽 郭山山 闫 婕 刘 永 王化东

（成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室 成都 611137）

摘 要：目的：采用HPLC梯度洗脱法同时测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量。方法：用Kromasil 100A C_{18}色谱柱（5μm，4.6mm×150mm，迪马公司）；甲醇-0.1%磷酸溶液梯度洗脱：0~15min（65∶35），15~16 min（65~85∶35~15），16~40 min（85∶15）；柱温：室温；检测波长：285nm（0~15min），254nm（15~40min）；流速：1mL·min^{-1}。结果：橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的线性范围分别为0.00038~0.00608μg（r=0.9998）、0.0029~0.0464μg（r=0.9999）、0.00105~0.0168μg（r=0.9996）、0.00044~0.00704μg（r=0.9998），平均回收率分别为99.50%（RSD=0.71%）、99.59%（RSD=1.42%）、99.31%（RSD=0.59%）、99.74%（RSD=0.91%）。结论：本方法专属性强，重复性好，可用于决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量测定。

关键词：决明子 橙黄决明素 大黄素 大黄酚 大黄素甲醚 HPLC

决明子为常用中药，来源于豆科植物决明（Cassia obtusifolia L.）和小决明（Cassia tora L.）的干燥成熟种子[1]，始载于《神农本草经》，具有清热明目，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。《中国药典》2005年版一部决明子项下仅测定大黄酚的含量，用以控制决明子的内在质量。本文认为仅以单一成分不能全面地反映决明子药材的内在质量，其中橙黄决明素、大黄素和大黄素甲醚也是决明子的有效成分，且橙黄决明素为其特征性成分。因此，本文采用HPLC梯度洗脱法同时测定不同产地决明子药材中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量，以期全面综合地比较全国不同产地决明子药材的质量。

一、实验材料、试药、试剂及仪器

1. 实验材料

试验所用不同产地的32份决明子药材样品是由卫莹芳教授、龙飞博士、谢达温、马小花、李晨、刘永等人分别采自我国10个省区的决明子主产地，均经成都中医药大学药学院药鉴教研室卫莹芳教授鉴定，为豆科植物决明（Cassia obtusifolia L.）和小决明（Cassia tora L.）的干燥成熟种子（见表1）。

收稿日期：2009-05-31

修回日期：2009-07-24

* 科技部国家自然科技资源共享平台项目（2005DKA21000）：药用植物种质资源标准化整理、整合及共享试点—子课题：“川牛膝、决明、小决明、穿心莲、大麻、赤小豆等，负责人：卫莹芳（总课题负责人：黄璐琦）。

** 联系人：卫莹芳，教授，博士研究生导师，主要研究方向：中药品种、质量及资源，E-mail：wyfang6@163.com。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2. 试剂、试药

对照品：大黄素（批号：110756-200110），大黄素甲醚（批号：110758-200610），大黄酚（批号：110796-200716），均购自中国药品生物制品检定所，供含量测定用。橙黄决明素（由成都中医药大学万丽教授提供，纯度为 98%），供含量测定用。

试剂：甲醇为色谱纯，水为重蒸馏水。

3. 仪　器

PROSTAR210 高效液相色谱仪（美国瓦里安公司）；KQ-250B 型超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司），水浴锅（北京市长风仪器仪表公司（CF 长风），SHZ-D（Ⅲ）循环水式真空泵（巩义市子华仪器有限公司）。

二、方法与结果

1. 色谱条件

色谱柱：Kromasil 100A C_{18}（5μm，4.6mm×150mm，迪马公司）；以甲醇和 0.1%磷酸溶液为流动相，按表 2 进行梯度洗脱；柱温：室温；紫外检测波长：285nm（0~15min），254nm（15~40min）；流速：1mL·min^{-1}。理论塔板数以大黄酚计均大于 3000[2~3]。

2. 混合对照品溶液的制备

精密称取橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量，置 P_2O_5 干燥器中真空干燥 24h，加甲醇分别制成含橙黄决明素 19μg·mL^{-1}、大黄素 14.5μg·mL^{-1}、大黄酚 52.5μg·mL^{-1}、大黄素甲醚 11μg·mL^{-1} 的混合溶液，即得混合对照品溶液。

3. 供试品溶液的制备

取决明子药材粉末（过三号筛）约 0.5g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50mL，称定重量，置水浴上加热回流 1h，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过。精密量取续滤液 25mL，蒸干，加 10%盐酸溶液 30mL，置水浴上加热水解 1h，立即冷却，用三氯甲烷振摇提取 4 次，每次 30mL，合并三氯甲烷液，回收溶剂至干，残渣用甲醇溶解，转移至 10mL 量瓶中，并稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液过 0.45μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

4. 线性关系考察

分别取橙黄决明素、大黄素和大黄酚对照品溶液，各分别进样 0.5、1、2、4、8μL，取大黄素甲醚对照品溶液，分别进样 1、2、4、8、16μL，测定峰面积积分值，以进样量（μg）为横坐标（X），峰面积积分值为纵坐标（Y），绘制标准曲线，计算回归方程。结果表明：橙黄决明素在 0.00038~0.00608μg 范围内线性关系良好，回归方程是 $Y=1.1332\times10^{10}X-1.4827\times10^{6}$，$r=0.9998$；大黄素在 0.0029~0.0464μg 范围内线性关系良好，回归方程是 $Y=3.5846\times10^{8}X-6.0352\times10^{5}$，$r=0.9999$；大黄酚在 0.00105~0.0168μg 范围内线性关系良好，回归方程是 $Y=5.6325\times10^{9}X-9.9539\times10^{5}$，$r=0.9996$；大黄素甲醚在 0.00044~0.00704μg 范围内线性关系良好，回归方程是 $Y=2.2629\times10^{9}X-5.8068\times10^{5}$，$r=0.9998$。

5. 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10μL，连续进样 6 次，

表 1　决明子药材样品

编号	来源	产地	编号	来源	产地
1	决明	四川省成都市郫县合作镇	17	决明	安徽省枞阳县钱桥镇宜庆村
2	决明	成都中医药大学药用植物园	18	决明	湖北省钟祥市丰乐镇卫星村
3	决明	四川省峨眉山市峨嵋学院	19	小决明	广西武鸣县城厢镇合旗村
4	决明	四川省宜宾市南溪县大坪乡	20	小决明	广西省罗城县东门镇
5	决明	四川省绵阳市游仙区玉河镇	21	小决明	广西来宾市桥巩乡上塘村
6	决明	四川省梓潼县马鸣乡云峰	22	小决明	广西贵港市黄练镇
7	决明	四川省剑阁县武连镇新华	23	小决明	广西平南县丹竹镇
8	决明	河南省邓州市十林镇江营村	24	小决明	广西邕宁县蒲庙中学
9	决明	河南省镇平县贾宋乡	25	小决明	广西扶绥县龙头乡龙头村
10	决明	河南省新野县王庄	26	小决明	广西天等县进结镇
11	决明	河南省社旗县城关镇东半坡村	27	小决明	广西上林县白圩镇
12	决明	山东省济南市济阳县崔寨镇	28	小决明	广西博白县双凤镇
13	决明	山东省菏泽市	29	小决明	广西北流市新圩镇
14	决明	陕西中医学院药用植物园	30	小决明	广西梧州市旺甫镇
15	决明	四川简阳市石盘镇	31	小决明	广东英德市大湾镇
16	决明	广西省宜州市洛东镇潘村	32	小决明	云南澄江县右所乡

表 2　梯度洗脱表

时间（min）	甲醇（%）	0.1%磷酸溶液（%）
0~15	65	35
15~16	65~85	35~15
16~40	85	15

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

分别记录橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积积分值。橙黄决明素平均峰面积值为 21239024，RSD 为 0.64%；大黄素平均峰面积值为 5351490，RSD 为 0.48%；大黄酚平均峰面积值为 30571644，RSD 为 0.80%；大黄素甲醚平均峰面积值为 2684623，RSD 为 0.47%，结果表明精密度良好。

6. 重复性试验

取同一批样品粉末，平行 5 份，按供试品制备方法制备，分别进样 10μL，测定峰面积，结果橙黄决明素平均峰面积值为 22818200，RSD 为 0.60%；大黄素平均峰面积值为 1783119，RSD 为 1.27%；大黄酚平均峰面积值为 40572312，RSD 为 1.80%；大黄素甲醚平均峰面积值为 4516906，RSD 为 0.86%，结果表明重复性良好。

7. 稳定性试验

取编号 4 的样品粉末，按供试品制备方法制备，精密吸取供试品溶液 10μL，分别于 0、1、2、4、6、12、24h 进样测定其峰面积，结果橙黄决明素平均峰面积值为 22723881，RSD 为 1.16%；大黄素平均峰面积值为 1818577，RSD 为 1.76；大黄酚平均峰面积值为 40296275，RSD 为 1.57%；大黄素甲醚平均峰面积值为 4503681，RSD 为 0.43%，结果表明供试品溶液在 24h 内基本稳定。

8. 加样回收试验

取已知含量的同一批样品，精密称取 20 份，每份约 0.25g，每 5 份分别精密加入橙黄决明素对照品 0.17mg，大黄素对照品 0.04mg，大黄酚对照品 0.67mg 和大黄素甲醚对照品 0.20mg，按供试品制备方法制备，按色谱条件测定，进样 10μL，测定峰面积，根据加入量和测得量，计算回收率。结果橙黄决明素平均回收率为 99.50%，RSD 为 0.71%；大黄素平均回收率为 99.59%，RSD 为 1.42%；大黄酚平均回收率为 99.31%，RSD 为 0.59%；大黄素甲醚平均回收率为 99.74%，RSD 为 0.91%。

9. 样品测定

分别取全国不同产地的决明子药材粉末 0.5g，平行两份，精密称定，按供试品溶液制备方法制备，分别吸取各供试品溶液 10μL，注入液相色谱仪，测定，即得。测定结果见表 3。

表 3　全国不同产地决明子药材中四种蒽醌类成分的含量(n=2)

编号	来源	橙黄决明素（%）	大黄素（%）	大黄酚（%）	大黄素甲醚（%）	总含量（%）
1	决明	0.052	0.010	0.136	0.050	0.247
2	决明	0.057	0.013	0.202	0.056	0.328
3	决明	0.021	0.017	0.068	0.036	0.143
4	决明	0.083	0.019	0.301	0.078	0.481
5	决明	0.045	0.012	0.131	0.039	0.227
6	决明	0.031	0.011	0.100	0.035	0.177
7	决明	0.023	0.007	0.091	0.034	0.154
8	决明	0.069	0.018	0.269	0.079	0.434
9	决明	0.035	0.007	0.106	0.025	0.173
10	决明	0.036	0.009	0.144	0.030	0.219
11	决明	0.081	0.021	0.297	0.086	0.485
12	决明	0.043	0.012	0.138	0.042	0.235
13	决明	0.072	0.026	0.287	0.061	0.445
14	决明	0.053	0.023	0.218	0.094	0.388
15	决明	0.029	0.006	0.077	0.021	0.134
16	决明	0.044	0.013	0.135	0.036	0.228
17	决明	0.044	0.013	0.135	0.036	0.228
18	决明	0.067	0.021	0.264	0.057	0.409
19	小决明	0.022	0.007	0.187	0.071	0.286
20	小决明	0.018	0.004	0.070	0.015	0.106
21	小决明	0.023	0.007	0.196	0.072	0.299
22	小决明	0.014	0.007	0.104	0.025	0.150
23	小决明	0.026	0.009	0.144	0.057	0.236
24	小决明	0.015	0.007	0.219	0.083	0.325
25	小决明	0.013	0.011	0.236	0.099	0.359
26	小决明	0.023	0.004	0.138	0.050	0.216
27	小决明	0.031	0.012	0.131	0.042	0.216
28	小决明	0.023	0.006	0.122	0.037	0.189
29	小决明	0.020	0.008	0.147	0.050	0.224
30	小决明	0.029	0.008	0.115	0.051	0.203
31	小决明	0.014	0.005	0.083	0.032	0.134
32	小决明	0.017	0.009	0.131	0.036	0.193

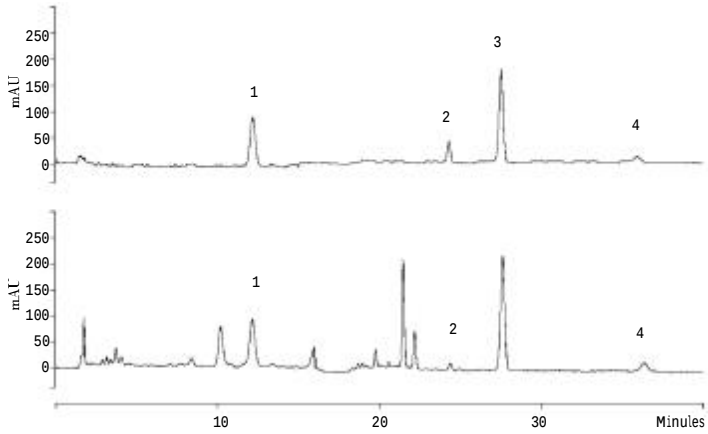

图 1　混合对照品 HPLC 色谱图及决明药材 HPLC 色谱图

1.橙黄决明素　2.大黄素　3.大黄酚　4.大黄素甲醚

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

三、讨 论

首次，采用双波长梯度洗脱方法，同时测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量，对色谱柱、流动相比例、梯度洗脱的时间、紫外检测波长及时间进行了考察，所得方法分离度良好，出峰时间较快，峰形尖锐、对称。

全国10个省区32个产地决明药材中的橙黄决明素含量在0.021%~0.083%之间；大黄素含量在0.006%~0.026%之间；大黄酚含量在0.068%~0.301%之间；大黄素甲醚含量在0.021%~0.094%之间；4种蒽醌类成分总含量在0.134%~0.485%之间。小决明橙黄决明素含量在0.013%~0.031%之间；大黄素含量在0.004%~0.012%之间；大黄酚含量在0.07%~0.236%之间；大黄素甲醚含量在0.015%~0.099%之间；4种蒽醌类成分总含量在0.106%~0.359%之间。结果显示，总蒽醌及大黄酚等4种成分的含量以河南社旗县、四川南溪县和山东荷泽市含量较高，而广东英德市和四川简阳市较低。有3个产地的药材大黄酚含量低于2005版《中国药典》的规定。小决明的蒽醌含量明显低于决明。

参考文献

1 国家药典委员会.中华人民共和国药典.2005版一部.北京：化学工业出版社，2005.

2 蒋午峻，王巧，袁志芳，等. 高效液相色谱法同时测定决明子中大黄素、大黄酚和大黄素甲醚. 河北医科大学学报，2006，27（4）：271~273.

3 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. 时珍国医国药，2006，17(7)：1138~1139.

The Simultaneous Measurement of Aurantio-obtusin, Emodin, Chrysophano1 and Physcione in Semen Cassiae by HPLC

Wei Yingtang, Xie Dawen, Wan Li, Guo Shenshan, Yan Jie, Liu Yong, Wang Huadong

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: This study aimed to simultaneously measure the content of aurantio-obtusin, emodin, chrysophano1 and physcione and in semen cassiae by HPLC. A Kromasil 100A C_{18} column (5μm, 4.6mm×150mm, DIKMA) was used for the gradient elution with a methanol-0.1% phosphonic acid solution: 0~15min (65:35), 15~16min (65~85: 35~15), 16~40min (85:15), at the flow rate of 1 mL·min^{-1} at room temperature. The UV wavelength was detected at 285 nm (0~15min) and 254nm (15~40min). The linear range was determined to be 0.00038~0.00608μg (r=0.9998), 0.0029~0.0464μg (r=0.9999), 0.00105~0.0168μg (r=0.9996) and 0.00044~0.00704μg (r=0.9998) respectively for aurantio-obtusin, emodin, chrysophano1 and physcione, with the average recovery of 99.50% (RSD=0.71%), 99.59% (RSD=1.42%), 99.31% (RSD=0.59%) and 99.74% (RSD=0.91%). The results showed that this method has good specificity and repeatability, and thus considered as a good tool for the measurement of aurantio-obtusin, emodin, chrysophano1 and physcione in semen cassiae.

Keywords: Semen cassiae; Aurantio-obtusin; Emodin; Chrysophano1; Physcione; HPLC

（责任编辑：李沙沙，责任译审：张立崴）

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn