

HPLC法同时测定决明子与其配方颗粒中2种成分

顾英琳¹, 张胜波^{2*}, 李正国²

(1. 济宁医学院药学院, 山东 济宁 272067; 2. 济宁市食品药品检验检测中心, 山东 济宁 272073)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定决明子与其配方颗粒(决明子)中橙黄决明素和大黄酚的含量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Waters Atlantic T3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 90% 乙腈与 10% 异丙醇混合液-0.1% 磷酸(70:30); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 284 nm。结果 橙黄决明素、大黄酚在 0.60~100.00 μg/mL 范围内线性关系良好($r>0.9998$)。药材中橙黄决明素、大黄酚平均加样回收率(RSD)分别为 94.20%(1.59%)、98.71%(1.01%), 配方颗粒中两者平均加样回收率(RSD)分别为 96.42%(1.50%)、102.15%(1.03%)。结论 该方法稳定可靠, 重复性好, 可用于决明子与其配方颗粒的质量控制。

关键词: 决明子; 决明子配方颗粒; 橙黄决明素; 大黄酚; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)11-3636-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.11.041

决明子为豆科植物决明或小决明的干燥成熟种子^[1], 始载于《神农本草经》^[2], 具有清热明目、润肠通便的功效^[3-5]。决明子配方颗粒是由具有 GMP 资质的制药公司生产的中药汤剂改良产品, 其优点在于携带和使用方便^[6], 在临床治疗上常用于治疗羞明多泪、目暗不明、目赤涩痛、头痛眩晕、大便秘结等症状^[7], 但大多数配方颗粒缺乏统一的质量标准和一致性评价^[8-10]。配方颗粒与中药材标准水煎剂的等效性尚不清楚。研究显示, 决明子中的有效成分主要为蒽醌类化合物^[11-14], 目前有关决明子中有效成分含量测定的研究多针对橙黄决明素、大黄酚、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素等, 其中以对橙黄决明素和大黄酚的研究为主^[15-18]。本研究拟采用 HPLC 法对决明子与其配方颗粒中橙黄决明素、大黄酚成分进行目标导向分离。与 2020 年版《中国药典》中描述的提取工艺相比, 本方法操作简单、专属性高, 稳定性好, 更有利于企业对配方颗粒的质量进行客观评价, 同时降低对决明子及其配方颗粒中橙黄决明素、大黄酚含量检测的成本。

1 材料

1.1 仪器 Nexera LC-20ADXR 高效液相色谱系统(日本岛津公司), 配置 SPD-20A 紫外可见光检测器、LC-20AD 多溶剂输送系统、CTO-20AC 柱温箱、LabSolutions 数据处理工作站; BT25S 型十万分之一电子天平、CP224S 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); KQ-500VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 大黄酚(批号 110796-201922, 纯度 99.4%)、橙黄决明素(批号 111900-202006, 纯度 99.0%)

对照品(中国食品药品检定研究院)。决明子(批号 181201, 产地河南洛阳, 亳州市圣海中药饮片有限公司), 经专家鉴定为正品。炒决明子配方颗粒(批号 9115612, 2.0 g/袋, 相当于原药材 10 g, 广东一方制药有限公司)。0.45 μm 醋酸纤维素膜过滤器(大连精研分析仪器有限公司)。甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Thermo Fisher 公司); 异丙醇为色谱纯, 无水乙醇、乙酸乙酯、磷酸等均为分析纯(天津市四友精细化学品有限公司); 水为超纯水(1815 元素型摩尔超纯水系统制备)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取橙黄决明素、大黄酚对照品各 10.00 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇混匀、定容, 超声处理 10 min, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得(质量浓度为 200 μg/mL)。

2.1.2 供试品溶液 决明子粉碎后过 120 目筛, 精密称取粉末和配方颗粒各 1 g, 分别置于 250 mL 圆底烧瓶中, 各加入 80 mL 甲醇水浴加热, 回流时间为 100 min, 趁热过滤, 用甲醇洗涤残渣 3 次, 合并滤液, 再水浴加热, 回收甲醇, 残渣中加入 20 mL 蒸馏水进行溶解, 超声处理 10 min, 加入 20 mL 无水乙醇-乙酸乙酯(1:1)混合液萃取, 萃取层用水浴锅进行加热, 回收溶剂, 残渣用甲醇溶解, 分 3 次移至 25 mL 量瓶中, 加入甲醇混匀、定容, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2 色谱条件 Waters Atlantic T3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 90% 乙腈与 10% 异丙醇混合液-

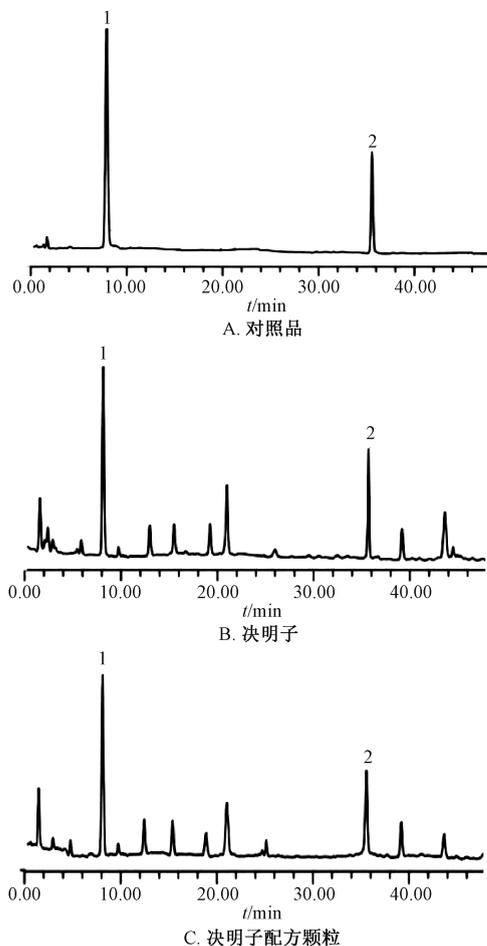
收稿日期: 2021-12-18

基金项目: 山东省中医药发展计划项目(2019-0445)

作者简介: 顾英琳(1974—), 女, 高级实验师, 从事药物制剂及药物分析研究。Tel: 13792005812, E-mail: 26510799@qq.com

* 通信作者: 张胜波(1974—), 男, 副主任药师, 从事药品检验及质量标准研究。Tel: (0537) 3165933, E-mail: 1932876271@qq.com

0.1%磷酸(70:30);体积流量1.0 mL/min;柱温35℃;检测波长284 nm;进样量10 μL。色谱图见图1。



1. 橙黄决明素 2. 大黄酚
图1 各成分HPLC色谱图

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液0.01、0.03、0.10、0.40、2.00、5.00 mL,分别置于6个10 mL量瓶中,甲醇稀释摇匀,定容,0.45 μm微孔滤膜过滤,制得质量浓度为0.2、0.6、2.0、8.0、40、100 μg/mL的对照品溶液,在“2.2”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得方程分别为橙黄决明素 $Y=8.41 \times 10^3 X+13.26$ ($r=0.9999$)、大黄酚 $Y=9.22 \times 10^3 X+4.92$ ($r=0.9998$),分别在0.60~100.00 μg/mL范围内线性关系良好。

2.3.2 日内精密性试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液0.6、8.0、70 μg/mL,同一天在“2.2”项色谱条件下进样测定6次,测得橙黄决明素峰面积RSD分别为0.67%、1.02%、1.93%,大黄酚峰面积RSD分别为1.32%、0.85%、1.76%,表明该方法日内精密性良好。

2.3.3 日间精密性试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液0.6、8.0、70 μg/mL,在“2.2”项色谱条件下进样测定6次,连续3 d,测得橙黄决明素峰面积RSD分

别为0.98%、1.61%、2.60%;大黄酚峰面积RSD分别为1.46%、1.05%、2.23%,表明该方法日间精密性良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液及“2.1.2”项下供试品溶液适量,于0、1、2、8、12、24 h在“2.2”项色谱条件下进样测定,测得对照品溶液中橙黄决明素、大黄酚峰面积RSD分别为0.12%、0.21%,决明子供试品溶液中橙黄决明素、大黄酚峰面积RSD分别为0.34%、0.25%,决明子配方颗粒供试品溶液中橙黄决明素、大黄酚峰面积RSD分别为0.27%、0.24%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 称取同一批决明子和决明子配方颗粒各6份,按“2.1.2”项下方法制备决明子和决明子配方颗粒供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下进样测定6次,测得决明子中橙黄决明素含量RSD为1.26%,大黄酚含量RSD为0.9%;决明子配方颗粒中橙黄决明素含量RSD为0.82%,大黄酚含量RSD为0.66%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的同一批决明子和决明子配方颗粒各6份,每份0.1 g,分别精密加入10 mL对照品溶液(含橙黄决明素、大黄酚各10.00 μg/mL),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下进样测定,计算加样回收率。结果,决明子中橙黄决明素、大黄酚的平均加样回收率(RSD)分别为94.20% (1.59%)、98.71% (1.01%),决明子配方颗粒中橙黄决明素、大黄酚的平均加样回收率(RSD)分别为96.42% (1.50%)、102.15% (1.03%)。

2.4 含量测定 取决明子(批号181201)及其配方颗粒(批号9115612)各3份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算含量,结果见表1。

表1 各成分含量测定结果(% , n=3)

样品	橙黄决明素			大黄酚		
决明子	6.02	6.25	6.14	4.11	4.22	4.11
决明子配方颗粒	9.98	9.86	9.95	6.56	6.39	6.42

3 讨论

研究表明,决明子药材与配方颗粒在临床上常用于治疗羞明多泪、目暗不明、目赤涩痛、头痛眩晕、大便秘结等症[24]。随着中药在全世界范围的推广,定量准确已经不能满足于对中药质量的控制要求,而建立多指标成分同步分析的模式已经成为关注的重点。决明子主要是通过水解鞣苷进行质量控制,包括其水解产物大黄酚及橙黄决明素。本研究建立测定决明子药材与配方颗粒的HPLC特征图谱,对两者中橙黄决明素、大黄酚的含量进行测定,建立质量标准,鉴别市场上决明子药材与配方颗粒的正伪与优劣。

本研究通过对提取方式(超声提取法、热回流提取法、连续回流提取法)的考察发现,热回流提取法对橙黄

决明素和大黄酚同时提取的效果相对较好；在此基础上进一步考察甲醇、70%甲醇、50%甲醇对提取结果的影响，结果表明甲醇提取物色谱图杂质干扰较少，且提取率较高，故选择甲醇热回流提取法；对提取时间（30、60、100、150 min）进行考察，确定提取时间为100 min时，有效成分已提取完全。此外，本研究考察不同流动相的分离效果，与传统的乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸这3个不同流动相系统的分离效果相比较，乙腈与异丙醇（90：10）混合液-0.1%磷酸等度洗脱对所测有效成分达到基线分离，效果较好。

相较于以往研究方法，本方法操作简单，采用等度洗脱，专属性高，稳定性好，降低检验成本，通过对决明子与配方颗粒中橙黄决明素、大黄酚的含量测定，对质量进行客观评价，鉴别市场上决明子与配方颗粒的正伪与优劣，为保证药材质量提供科学依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：151.

[2] 徐义龙. 决明子化学成分及炮制对其影响研究[D]. 北京：中国中医科学院，2014.

[3] 刘金金，殷军艺，黄晓君，等. 决明子多糖结构和生物活性功能研究进展[J]. 食品研究与开发，2019，40(23)：212-224.

[4] 李正杰，张彦芬，柏艳柳，等. HPLC同时测定决明子配方颗粒中2种成分[J]. 食品与药品，2020，22(1)：56-59.

[5] 葛俊德，黄娜娜，郭欣，等. 不同提取工艺对炒决明子急性毒性和物质基础的影响[J]. 药物评价研究，2019，42(4)：641-647.

[6] 陈艳芬，刘伟民，江滨，等. 不同工艺决明子配方颗粒

与传统饮片的药效学比较[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(13)：161-164.

[7] 黄娜娜，窦莹雯，孙蓉. 基于功效及物质基础的决明子药理与毒理作用研究进展[J]. 中国药物警戒，2016，13(5)：282-285.

[8] 闫婕，卫莹芳，胡慧玲，等. HPLC测定全国不同产地及进口决明子大黄酚与橙黄决明素含量[J]. 时珍国医国药，2016，27(1)：56-58.

[9] 邓施璐，龙远春，张兵，等. 决明子多糖含量测定方法[J]. 南昌大学学报（理科版），2019，43(3)：241-245.

[10] 杨冰，任娟，秦昆明，等. 决明子药理作用及其机制研究进展[J]. 中药材，2018，41(5)：1247-1251.

[11] 梁朔，张振秋，米宝丽，等. HPLC法同时测定决明子中6种蒽醌类成分[J]. 中成药，2013，35(3)：584-588.

[12] 董晓强，尹占芳. 决明子的化学成分及药理作用研究[J]. 中国当代医药，2013，20(7)：18-19；23.

[13] 李春晓，王月明，韦东来，等. 决明子的主要化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代农业研究，2018，25(6)：47-50.

[14] 孔祥锋，臧恒昌. 决明子化学成分及药理活性研究进展[J]. 药学研究，2013，32(11)：660-662.

[15] 王艳霓，管养洪，彭飞，等. HPLC法测定决明子中橙黄决明素和大黄素的含量[J]. 中国中医药现代远程教育，2016，14(24)：143-144.

[16] 王青，张伟东，宋小妹，等. HPLC法同时测定不同产地决明子中12种蒽醌类成分的含量[J]. 解放军药学报，2012，28(6)：502-505.

[17] 包敏，唐小鹏，朱跃芳，等. 一测多评法测定决明子中5种蒽醌类成分的含量[J]. 中南药学，2018，16(9)：1287-1291.

[18] 李正杰，张彦芬，柏艳柳，等. HPLC同时测定决明子配方颗粒中2种成分[J]. 食品与药品，2020，22(1)：56-59.