

HPLC 同时测定了哥王中芦荟大黄素和大黄素甲醚的含量

慕善学¹, 孙丽霞^{1,2}, 魏岚¹, 徐翠玲¹, 孙立新^{1*}

(1. 沈阳药科大学 药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学 中药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:建立 HPLC 法同时测定了哥王中芦荟大黄素和大黄素甲醚含量的方法。方法:采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为体积分数为 0.15% 磷酸水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 ℃。结果:芦荟大黄素和大黄素甲醚的质量浓度分别在 1.584 ~ 25.34 ($r = 0.999\ 2$) 和 1.598 ~ 25.57 μg·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 3$) 内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 100.2% (RSD 1.8%) 和 99.7% (RSD 1.1%)。不同产地了哥王中大黄素甲醚和芦荟大黄素含量差异较大, 其中广东韶关产地的芦荟大黄素含量最高, 大黄素甲醚含量最低; 福建福州产地的大黄素甲醚含量最高, 芦荟大黄素含量最低; 浙江(批号 120724)了哥王未检测到芦荟大黄素, 贵州安顺产地的了哥王中未检测到大黄素甲醚。结论:该方法简便、快速、准确, 为了哥王药材的质量控制提供参考。

[关键词] 了哥王; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0073-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015180073

Simultaneous Determination of Aloe-emodin and Physcion in *Wikstroemia indica* by HPLC MU Shan-xue¹, SUN Li-xia^{1,2}, WEI Lan¹, XU Cui-ling¹, SUN Li-xin^{1*} (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of aloe-emodin and physcion in *Wikstroemia indica*. **Method:** Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was eluted with the mobile phases of acetonitrile-0.10% phosphoric acid water in a gradient mode. The UV detection wavelength was 254 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was set at 30 ℃, and the sample size was 20 μL. The difference in the content of aloe-emodin and physcion in *W. indica* from ten origins was compared. **Result:** All of aloe-emodin and physcion samples showed a good linearity within the range of 1.584-25.34 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 2$), 1.598-25.57 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 3$), respectively. The average recoveries were 100.2% and 99.7%, with RSD of 1.8% and 1.1%, respectively. There was a great difference in the content of aloe-emodin and physcion in *W. indica* of different origins. Specifically, *W. indica* from Shaoguang, Guangdong province, had the highest content of aloe-emodin but the lowest content of physcion; *W. indica* from Fuzhou, Fujian province, had the highest content of physcion but the lowest content of aloe-emodin. Aloe-emodin was not detected in 120724 *W. indica* from Zhejiang, and physcion was not detected from Anshun, Guizhou province. **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate and so can be applied for the quality control of *W. indica*.

[Key words] *Wikstroemia indica*; HPLC; content determination

了哥王具有清热解毒、消肿止痛和化痰散结等功效, 临床用于呼吸道、泌尿道等感染的治疗, 另外对肝炎、肾炎等有一定疗效^[1]。近年来研究表明了哥王具有显著抗肿瘤活性^[2-3]。了哥王主要成分有黄酮类、香豆素类、蒽醌类、木脂素类等。芦荟大黄

素、大黄素甲醚为蒽醌类成分, 有较强的抗肿瘤活性^[4-5]。目前关于了哥王中有效成分的定量分析研究主要集中于黄酮类、香豆素类、木脂素类、挥发油和微量元素^[6-10], 尚未见对了哥王中蒽醌类成分含量测定的报道。本文拟建立 HPLC 法同时测定了哥

[收稿日期] 20140804(013)

[基金项目] 辽宁省教育厅创新团队项目(LT2012018); 辽宁省科技厅项目(2011412004)

[第一作者] 慕善学, 硕士, 工程师, 从事药物分析学研究, TeL:024-23986268, E-mail:2368326396@qq.com

[通讯作者] *孙立新, 博士, 教授, 从事药物分析学研究, TeL:024-23986365, E-mail:slx04@163.com

王中芦荟大黄素和大黄素甲醚的含量,并比较不同产地了哥王中 2 种成分的含量差异,为完善了哥王质量控制提供依据。

1 材料

日立高效液相色谱仪, L-2400 紫外检测器, D-2000 Elite 色谱工作站(日本 Hitachi 公司)。

芦荟大黄素对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 13030701,纯度 > 98.0%),大黄素甲醚对照品(自制,经面积归一化法测定纯度 > 98.0%)。甲醇(色谱纯,德国默克公司),乙腈(色谱纯,百灵威科技有限公司),水为纯化水(杭州娃哈哈集团有限公司),磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),其余试剂均为分析纯。

了哥王药材是瑞香科植物南岭堯花 *Wikstroemia indica*,其根、茎叶和果实均可入药。10 批样品均为市售品,由沈阳药科大学路金才教授鉴定。

2 方法与结果

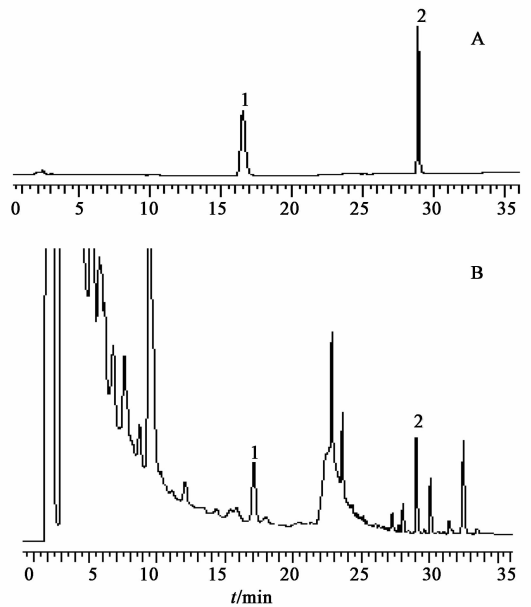
2.1 色谱条件与系统适用性试验 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.15% 磷酸(B),梯度洗脱程序(0~5 min, 40% A; 5~17 min, 40%~43% A; 17~23 min, 43%~90% A; 23~34 min, 90% A; 34~36 min, 90%~40% A);流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 254 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,芦荟大黄素、大黄素甲醚理论塔板数均不低于 5 000,与相邻组分峰的分离度均 > 1.5,色谱峰对称因子均在 0.95~1.05。见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取干燥至恒重的芦荟大黄素约 2 mg、大黄素甲醚约 2 mg,精密称定,分别置 25 mL 量瓶中,用 80% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 88.0, 94.0 mg·L⁻¹ 的芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品储备液。

精密吸取芦荟大黄素对照品储备液 9.0 mL 和大黄素甲醚对照品储备液 8.5 mL,置同一 25 mL 量瓶中,用 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为 31.68, 31.96 mg·L⁻¹ 的芦荟大黄素和大黄素甲醚混合对照品溶液,4 °C 备用。

2.2.2 供试品溶液制备 取了哥王干燥药材细粉(过 60 目筛)约 1 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 50 mL,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)2 次,每次 30 min,过滤,合并提取液,减压蒸干,残渣用 80% 的甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,以 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,用



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芦荟大黄素; 2. 大黄素甲醚

图 1 了哥王 HPLC

Fig. 1 Typical chromatograms of *Wikstroemia indica*

0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察 量取混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列混合对照品溶液。按照 2.1 项下的色谱条件分析。分别以对照品溶液质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标(X),峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。芦荟大黄素 $Y = 4.151 \times 10^4 X - 3.254 \times 10^3$ ($r = 0.999 2$); 大黄素甲醚 $Y = 3.520 \times 10^4 X - 2.860 \times 10^3$ ($r = 0.999 3$)。结果表明,芦荟大黄素和大黄素甲醚分别在 1.584~25.34, 1.598~25.57 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 取混合对照品溶液(芦荟大黄素 12.67 mg·L⁻¹, 大黄素甲醚 12.78 mg·L⁻¹),按 2.1 项下色谱条件测定,结果芦荟大黄素和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.0%。表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 取了哥王细粉(广东江门)约 1 g,精密称定,按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份,测定峰面积。结果芦荟大黄素和大黄素甲醚平均质量分数分别为 158.9, 37.44 μg·g⁻¹, RSD 分别为 1.6%, 1.2%。表明供试品重复性良好。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液,室温放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, 按 2.1 项下色谱条件测定,结果芦荟大黄素和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.0%, 表明供试品溶液室温下 24 h 内稳定。

2.7 回收率试验 取已知含量的了哥王细粉 9 份(广东韶关,芦荟大黄素、大黄素甲醚含量分别为 158.9,37.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)约 0.5 g,精密称定,分别加入相当于药材原有含量的 50%,100%和 150%对照品溶液,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.1 项下的色谱条件分析,计算回收率,结果见表 1。

表 1 芦荟大黄素、大黄素甲醚的加样回收率测定

Table 1 Recoveries of aloe-emodin and physcion

| 成分 | 样品中量 / μg | 加入量 / μg | 测得量 / μg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|-------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 芦荟大黄素 | 79.56 | 38.72 | 117.8 | 98.8 | 100.2 | 1.8 |
| | 79.51 | 38.72 | 117.5 | 98.1 | | |
| | 79.57 | 38.72 | 119.2 | 102.4 | | |
| | 79.73 | 80.08 | 158.8 | 98.7 | | |
| | 79.56 | 80.08 | 158.5 | 98.6 | | |
| | 79.75 | 80.08 | 159.6 | 99.7 | | |
| | 79.37 | 118.8 | 199.8 | 101.4 | | |
| | 79.73 | 118.8 | 200.4 | 101.6 | | |
| | 79.87 | 118.8 | 201.7 | 102.6 | | |
| | 79.87 | 118.8 | 201.7 | 102.6 | | |
| 大黄素甲醚 | 18.75 | 9.4 | 27.95 | 97.9 | 99.7 | 1.1 |
| | 18.74 | 9.4 | 28.03 | 98.8 | | |
| | 18.75 | 9.4 | 28.21 | 100.6 | | |
| | 18.79 | 18.8 | 37.32 | 98.6 | | |
| | 18.75 | 18.8 | 37.41 | 99.3 | | |
| | 18.79 | 18.8 | 37.64 | 100.3 | | |
| | 18.71 | 28.2 | 47.26 | 101.2 | | |
| | 18.79 | 28.2 | 47.16 | 100.6 | | |
| | 18.82 | 28.2 | 47.14 | 100.4 | | |
| | 18.82 | 28.2 | 47.14 | 100.4 | | |

2.8 样品含量测定 分别取 10 批了哥王细粉约 1.0 g,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分析,计算芦荟大黄素和大黄素甲醚的含量,结果见表 2。实验结果显示不同产地了哥王中大黄素甲醚和芦荟大黄素含量差异较大,其中广东韶关产地的芦荟大黄素含量最高,大黄素甲醚含量最低;福建福州产地的大黄素甲醚含量最高,芦荟大黄素含量最低;浙江(批号 120724)了哥王未检测到芦荟大黄素,贵州安顺产地的了哥王中未检测到大黄素甲醚。说明不同的生长环境对了哥王中这 2 种成分的含量有影响。

3 讨论

在甲醇-水、乙腈-水洗脱系统下对色谱条件进行优化,结果在乙腈-水色谱条件下,峰形较好,待测物与相邻峰分离度较好。考察了磷酸、冰乙酸、甲酸等改性剂,磷酸改善峰拖尾效果明显,故确定乙腈(A)-0.10%磷酸水(B)为流动相进行梯度洗脱。

比较回流提取法和超声提取法,结果表明相同时间内超声提取法和回流提取法含量接近,但超声

表 2 不同产地了哥王中芦荟大黄素及大黄素甲醚的含量测定($n=3$)
Table 2 Contents (C) of aloe-emodin and physcion in different regions ($n=3$)

| No. | 产地 | 芦荟大黄素 | | 大黄素甲醚 | |
|-----|-----------|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|
| | | C/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD/% | C/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ | RSD/% |
| 1 | 四川 广元 | 42.03 | 1.5 | 63.87 | 1.2 |
| 2 | 广西 梧州 | 37.40 | 1.4 | 75.40 | 0.6 |
| 3 | 湖南 永州 | 54.65 | 0.5 | 71.62 | 1.3 |
| 4 | 安徽 亳州 | 76.09 | 1.7 | 60.42 | 0.8 |
| 5 | 广东 江门 | 31.65 | 1.3 | 173.4 | 1.0 |
| 6 | 浙江 120724 | - | - | 109.1 | 1.1 |
| 7 | 浙江 120136 | 57.96 | 1.3 | 134.1 | 0.4 |
| 8 | 贵州 安顺 | 31.73 | 0.8 | - | - |
| 9 | 广东 韶关 | 158.9 | 1.6 | 37.44 | 1.2 |
| 10 | 福建 福州 | 17.86 | 1.7 | 248.3 | 1.4 |

提取法操作简单,故选用超声提取法。又考察提取溶剂(乙醇,甲醇,90% 甲醇,80% 甲醇,70% 甲醇,60% 甲醇,50% 甲醇);溶剂倍量(30,50,80 倍);超声提取时间(20,30,40 min);提取次数(1,2,3 次)。结果表明,采用 80% 甲醇超声提取 2 次,每次 30 min,2 种化学成分提取效率最高。

[参考文献]

[1] 朱亚敏,胡敏灿.了哥王的药理研究和临床应用[J].浙江中医杂志,2004,39(1):42-43.

[2] 陈扬,李艳春,马恩龙,等.了哥王抗肿瘤活性部位筛选[J].中华中医药学刊,2008,26(11):2520-2522.

[3] 陈扬,孙立新.中药了哥王研究进展[J].沈阳药科大学学报,2009,26(7):587-590.

[4] 郑言博,马卓.葱醌类化合物抗菌与抗肿瘤活性的研究进展[J].湖北中医药杂志,2012,34(2):74-76.

[5] 李天东,古静燕,罗英.中华芦荟抗肿瘤活性成分的研究[J].时珍国医国药,2009,20(10):2397-2398.

[6] 卢雪飞,邓振雪,魏岚,等.HPLC 同时测定了哥王中 4 种香豆素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(20):42-45.

[7] 刘丽霞,刘薇,张春玲,等.HPLC 法同时测定了哥王中芹菜素和山柰酚的含量[J].沈阳药科大学学报,2010,27(5):369-372.

[8] 孙立新,刘丽霞,杨雯雯,等.HPLC 法同时测定了哥王中罗汉松脂酚和牛蒡子苷元的含量[J].沈阳药科大学学报,2010,27(12):893-896.

[9] 梁勇,林德球,郭宝江,等.了哥王挥发油的化学成分分析[J].精细化工,2005,22(5):357-359.

[10] 熊友香,尤志勉,芦镭玲,等.不同产地了哥王药材中微量元素含量测定[J].江西中医药,2009,40(3):54-55.

[责任编辑 顾雪竹]