

- [15] Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinaseB/Akt[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(2): 262-267.
- [16] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Phosphoinositide-3-kinase /akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke [J]. *Molecular Neurobiology*, 2006, 34(3): 249-270.
- [17] 张乐, 李晓艳, 李震, 等. 神经节苷脂联合依达拉奉对局灶性脑缺血再灌注大鼠 PI3K、Akt 蛋白表达的影响研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2015, 23(4): 142-145.
- [18] 刘媛媛, 崔颖, 高俊玲, 等. P-Akt、Bid 与小鼠局灶性脑缺血后处理保护作用的关系[J]. *解剖学报*, 2011, 42(2): 164-169.
- [19] 祝赫, 黄海艳, 张继平, 等. 补阳还五汤预处理对脑缺血再灌注大鼠脑组织海马区 Akt 磷酸化水平的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(4): 451-455.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

## HPLC 法对决明子中 3 种有效成分含量的测定

张梅<sup>1</sup>, 冯良<sup>2</sup>, 潘娜<sup>1</sup>

1. 郑州市妇幼保健院, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450000

**[摘要]** 目的: 高效液相色谱法测定决明子中红鞣霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O-β-D-葡萄糖苷 3 种有效成分的含量。方法: 采用 Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱, 柱温 30℃, 以乙腈和四氢呋喃混合溶液 (A)-1%冰醋酸 (B) (A : B=30 : 70) 为流动相等度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 278 nm。结果: 3 种有效成分得到了基线分离。红鞣霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O-β-D-葡萄糖苷分别在 0.136 4~1.091 μg、0.117 9~0.943 μg、0.126 3~1.010 μg 与相应的峰面积呈现良好的线性关系, 回归方程分别为  $Y=3.78 \times 10^6 X-143\ 929$ 、 $Y=2.67 \times 10^6 X-78\ 435$ 、 $Y=3.15 \times 10^6 X-108\ 435$ ; 平均加样回收率分别为 100.53%、98.95%、102.30%。对不同产地决明子药材进行测定, 结果显示 3 种有效成分的含量差异较大。结论: 经过方法学验证, 本方法准确、可靠、重复性好, 可以为决明子药材评价与质量控制提供有效参考。

**[关键词]** 决明子; 红鞣霉素龙胆二糖苷; 决明子苷 C; 橙黄决明素-6-O-β-D-葡萄糖苷; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 01-0015-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.01.004

### Determination of Content of Three Effective Components in Cassia Seed with HPLC

ZHANG Mei, FENG Liang, PAN Na

**Abstract:** Objective: To establish methods of high performance liquid chromatograph(HPLC) so as to determine content of rubrofusarin gentiobioside, assiaside C and Aurantio-obtusifolin-6-O-β-D-glucopyranoside of cassia seed. **Methods:** Performed Zorbax Eclipse XDB - C18 column at the temperature of 30℃, and used acetonitrile and tetrahydrofuran(A)-1% acetic acid (B) (A : B=30 : 70) as mobile phase by isocratic elution, with the flow rate being 1.0 mL/min and detection wavelength at 278 nm. **Results:** Three effective components achieved a baseline resolution. Rubrofusarin gentiobioside, assiaside C and Aurantio-obtusifolin-6-O-β-D-glucopyranoside respectively demonstrated a good linear relationship with the peak area in the range of 0.136 4~1.091 μg, 0.117 9~0.943 μg, and 0.126 3~1.010 μg. The respective typical equation was  $Y=3.78 \times 10^6 X-143\ 92$ ,  $Y=2.67 \times 10^6 X-784\ 35$ ,  $Y=3.15 \times 10^6 X-108\ 435$  respectively, and their average recovery was 100.53%, 98.95% and 102.30% respectively. For the determination of cassia seed from different habitats, the result indicated there was great difference among the content of these three effective components. **Conclusion:** By methodology

**[收稿日期]** 2017-05-19

**[作者简介]** 张梅 (1983-), 女, 主管中药师, 研究方向: 中药学及医院药学。

verification, the determination method is accurate, reliable, and of good reproducibility. It can be an effective reference to the evaluation and quality control of cassia seed.

**Keywords:** Cassia seed; Rubrofusarin gentiobioside; Assiaside C; Aurantio-obtusifolin-6-O- $\beta$ -D-glucopyranoside; Content determination

决明子, 又称草决明、决明, 为豆科植物决明或小决明的干燥成熟种子, 味甘、苦、咸, 性微寒, 具有清肝明目、润肠通便的功效<sup>[1]</sup>。现代医学研究显示, 决明子主要有效成分为蒽醌类和萘并吡喃酮类, 药理作用主要包括降血脂<sup>[2]</sup>、调血压<sup>[3-4]</sup>、保肝<sup>[5]</sup>及抑菌<sup>[6]</sup>、抗氧化<sup>[7]</sup>等, 在各种降脂减肥的制剂中广泛应用。目前, 决明子药材的质量控制标准一般采用提取步骤繁琐的游离蒽醌类成分为指标, 忽略了同样具有生物活性、含量较高的萘并吡喃酮类化合物<sup>[8]</sup>。为了对决明子进行更好的质量控制, 本研究采用 HPLC 法建立了 3 种有效成分红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的含量分析方法, 并选取了三个主要产地的决明子药材进行测定, 为进一步完善决明子药材的质量控制和评价体系提供依据和参考。

## 1 材料

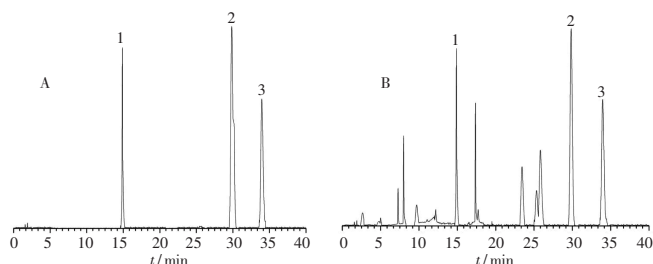
**1.1 仪器** 高效液相色谱仪(G1312B 型泵, G1329A 型自动进样器, G1316A 型柱温箱, G1314B 型检测器, Agilent Chemstation 仪器控制及数据处理系统, 德国安捷伦公司)。Sartorius 2004MP 型十万分之一电子分析天平。

**1.2 药品与试剂** 红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷对照品为自制, 经 HPLC 检测, 面积归一化法计算纯度大于 98%; 决明子供试品药材购于中国药品生物制品检定所。各产地药材样品购自于其省市药材市场或药店。乙腈为 HPLC 级, 甲醇为色谱级, 两者均购自 Fisher 公司; 四氢呋喃、冰醋酸为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 购自北京百灵威科技有限公司; 纯净水由 Milli-Q 超纯水制备系统制备。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈 - 四氢呋喃 (90 : 10) 混合溶液(A)-1%冰醋酸(B), A 相 : B 相为 30 : 70; 流速 1.0 mL/min, 柱温 30℃, 检测波长 278 nm, 进样量 10  $\mu$ L。在此色谱条件下, 对照品和

决明子供试品中红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的色谱峰与其他非检测成分峰达到基线分离, 无干扰, 对照品与供试品的色谱图见图 1。



注: 1. 红镰霉素龙胆二糖苷; 2. 橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 3. 决明子苷 C

图 1 对照品(A)和决明子供试品(B)的液相色谱图

## 2.2 对照品溶液的配制

**2.2.1 单一对照品储备液的配制** 分别精密称取红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷各 5 mg, 各置于 10 mL 量瓶中, 分别加 90% 甲醇溶解并定容至刻度, 配制成红镰霉素龙胆二糖苷浓度 0.545 5 g/L、决明子苷 C 0.471 5 g/L、橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 0.505 0 g/L 的单一对照品储备液。

**2.2.2 混合对照品溶液的配制** 精密吸取 2.2.1 中 3 个对照品储备液各 0.5 mL 于 5 mL 量瓶中, 并加 90% 甲醇稀释至刻度, 摇匀配制成含红镰霉素龙胆二糖苷浓度 0.054 55 g/L、决明子苷 C 0.047 15 g/L、橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 0.050 50 g/L 的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 将决明子药材样品粉碎, 过 60 目筛, 精密称取 0.2 g, 置于圆底烧瓶中, 准确加入 25 mL 90% 甲醇, 称量重量后加热回流 2 h, 放至室温, 再称重, 用 90% 甲醇补足缺失的质量, 过滤并弃去初滤液, 取续滤液适量过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜后为供试品溶液。

**2.4 线性关系考察** 见表 1。分别精密吸取 2.2.2 中混合对照品溶液 2.5, 5, 10, 15, 20  $\mu$ L 进样, 测定

并记录峰面积。以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标(X)、以峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷回归方程分别为  $Y=3.78 \times 10^6 X-143\ 929$ 、 $Y=2.67 \times 10^6 X-78\ 435$ 、 $Y=3.15 \times 10^6 X-108\ 435$ , 线性范围分别为  $0.136\ 4 \sim 1.091\ \mu\text{g}$ 、 $0.117\ 9 \sim 0.943\ \mu\text{g}$ 、 $0.126\ 3 \sim 1.010\ \mu\text{g}$ 。

表 1 回归方程与线性范围

有效成分	回归方程	r	线性范围( $\mu\text{g}$ )
红镰霉素龙胆二糖苷	$Y=3.78 \times 10^6 X-143\ 929$	0.999 9	0.136~1.091
决明子苷 C	$Y=2.67 \times 10^6 X-78\ 435$	0.999 9	0.118~0.943
橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷	$Y=3.15 \times 10^6 X-108\ 435$	0.999 9	0.126~1.010

2.5 精密度试验 见表 2。精密吸取 2.2.2 中混合对照品溶液  $10\ \mu\text{L}$ , 连续重复进样 6 次, 在 2.1 色谱条件下连测 3 天, 测定并记录峰面积, 分别以红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷色谱峰峰面积计算精密度, 三种有效成分的日内精密度、日间精密度均小于 3%, 表明仪器检测的精密度良好。

表 2 精密度试验结果 %

对照品	日内精密度(n=6)			日间精密度(n=3)
	RSD(d1)	RSD(d2)	RSD(d3)	RSD
红镰霉素龙胆二糖苷	0.42	0.99	0.74	0.80
决明子苷 C	0.93	0.49	0.86	0.75
橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷	0.59	0.69	0.89	0.81

2.6 稳定性试验 精密称取同一样品  $0.2\ \text{g}$ , 按 2.3 步骤制备供试品溶液, 在 2.1 色谱条件下, 分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 取供试品溶液  $10\ \mu\text{L}$  进样测定, 记录 3 种被测成分各次检测的峰面积, 计算 RSD。结果红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷在 24 h 内峰面积的 RSD 分别为 1.9%、1.4%、1.6%。表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取 6 份同一批次决明子样品粉末(过 60 目筛), 每份  $0.2\ \text{g}$ , 按 2.3 中步骤制备供试品溶液, 在 2.1 色谱条件下吸取  $10\ \mu\text{L}$  进样测定, 记录各峰面积, 并分别计算红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量的 RSD 分别为 1.9%、2.6%、2.4%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 见表 3。精密称取 6 份已知含量的决明子样品粉末(过 60 目筛), 每份  $0.05\ \text{g}$ , 分别加入 2.2.1 中单一对照品储备溶液红镰霉素龙胆二糖苷  $0.55\ \text{mL}$ 、决明子苷 C  $0.45\ \text{mL}$  及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷  $1.2\ \text{mL}$ , 按 2.3 中步骤制备供试品溶液, 在 2.1 色谱条件下吸取  $10\ \mu\text{L}$  进样测定, 回收率=(测得量-样品中含量)/加入量, 红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的平均加样回收率分别为 100.53%、98.95%、102.30%。

表 3 加样回收率试验结果(n=6)

成分	样品中含量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
红镰霉素龙胆二糖苷	0.291 9	0.591 1	99.73	100.53	1.89
	0.296 1	0.598 4	100.77		
	0.292 8	0.589 9	99.03		
	0.292 1	0.586 8	98.23		
	0.293 9	0.601 8	102.63		
	0.291 0	0.599 4	102.80		
	0.206 3	0.417 9	99.72		
	0.209 3	0.418 9	98.77		
	0.207 0	0.419 7	100.24		
	0.206 5	0.417 8	99.58		
决明子苷 C	0.207 7	0.414 2	97.31	98.95	1.11
	0.205 7	0.413 8	98.07		
	0.618 9	1.238 1	102.18		
	0.628 0	1.239 3	100.87		
	0.621 0	1.242 2	102.51		
	0.619 4	1.235 5	101.67		
橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷	0.623 2	1.252 7	103.88	102.30	1.01
	0.617 1	1.239 4	102.69		

2.9 决明子药材样品含量测定 见表 4。分别精密称取 3 个不同地区决明子药材粉末(过 60 目筛), 按 2.3 中步骤制备供试品溶液, 在 2.1 色谱条件下吸取  $10\ \mu\text{L}$  进样测定, 记录色谱峰面积并计算含量。

表 4 不同地区决明子药材含量测定结果(n=3) %

产地	红镰霉素龙胆二糖苷	决明子苷 C	橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷
河南	0.58	0.41	1.23
安徽	0.35	0.84	0.97
山东	0.64	0.52	0.86

### 3 讨论

本研究比较了热回流提取法、超声提取法及冷浸

提取法 3 种不同的提取方法, 结果发现热回流提取法对蒽醌苷类和萘并吡喃酮苷两类物质同时提取的效果相对较好; 在此基础上进一步比较了 70% 甲醇、90% 甲醇及纯甲醇 3 种溶剂的提取效率, 同时也比较了 1 h、2 h、3 h、4 h 时的提取效率, 结果发现用 90% 甲醇提取效果较好, 且 2 h 时有效成分已提取完全, 因此选择 90% 甲醇溶液热回流提取 2 h 作为最终的提取方法。此外, 本研究比较了乙腈-水溶液、乙腈-1% 冰醋酸水溶液、乙腈和四氢呋喃混合溶液-1% 冰醋酸水溶液等 3 个不同流动相系统的分离效果, 结果发现乙腈四氢呋喃(90:10)混合溶液-1% 冰醋酸水溶液等度洗脱对所测有效成分达到基线分离, 效果较好。

本研究建立了 HPLC 法同时检测决明子药材中红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 3 种成分含量的方法, 方法学试验结果表明, 该方法简单准确, 重复性良好, 样品加样回收率较好, 没有酸水解步骤, 可用做决明子药材质量标准与控制的方法之一。

本研究应用该方法对 3 个不同产地决明子药材中红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 C 及橙黄决明素-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量进行了测定, 结果发现不同产地决明子药材中三种成分含量有较大差异, 考虑到此三种成分含量均较高, 且具有一定生物活性, 可

以选取其作为体现决明子药材特征与品质的指标, 为决明子药材标准规范化提供参考。

#### [参考文献]

- [1] 卢金清, 黎强, 李肖爽, 等. 决明子研究进展[J]. 湖北中医药大学学报, 2014, 16(4): 124-126.
- [2] 张喜, 董慧. 决明子及其主要成分治疗高血脂症的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(35): 3972-3974.
- [3] 于海荣, 王一帆, 陈建双. 决明子蒽醌苷对两肾一夹高血压大鼠左室心肌肥厚及舒张功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(1): 34-35.
- [4] 何冰心. 川芎决明方合硝苯地平治疗高血压病 30 例[J]. 陕西中医, 2007, 28(10): 1296-1297.
- [5] 李博萍, 陈依雨, 潘竞镛, 等. 决明子提取物对高脂-高果糖诱导非酒精性脂肪肝大鼠的调脂保肝作用[J]. 海峡药学, 2015, 27(9): 21-24.
- [6] 王立英, 王艳珍, 吴丽艳, 等. 响应面法优化超临界 CO<sub>2</sub> 萃取决明子挥发油工艺及其抑菌活性研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 594-601.
- [7] 赵红岩. 决明子生品中游离蒽醌的提取工艺优化和抗氧化活性分析[J]. 农产品加工, 2015(7): 30-32.
- [8] 张小梅, 杨荣平, 励娜, 等. 决明子中蒽醌类成分的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 97-98.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)