

超临界流体萃取-HPLC 法测定何首乌中大黄酸、 大黄素及大黄素甲醚的含量

第二军医大学药学院(上海 200433)

袁海龙* 柳正良

第二军医大学附属长征医院

张 纯 郭 澄

中国人民解放军 222 医院

李仙逸

摘 要 采用超临界流体萃取法(SFE)提取中药何首乌中的蒽醌类成分,并用 RP-HPLC 法进行分离测定。在 SFE 中,通过对萃取条件的考察,确定萃取压力为 42 MPa,温度 70℃,改性剂 0.4 mL,静态萃取时间 5 min 及动态萃取体积 5 mL。RP-HPLC 中,以 C₈为固定相,甲醇-0.2%磷酸溶液(70:30)为流动相,检测波长 437 nm。本法准确可靠,何首乌中各成分的平均回收率分别为大黄酸 99.1%(RSD 2.0%)、大黄素 98.2%(RSD 1.1%)、大黄酚 100.7%(RSD 2.6%)和大黄素甲醚 99.5%(RSD 0.9%)。

关键词 超临界流体萃取 HPLC 何首乌 蒽醌类成分

何首乌为蓼科植物 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根,具有滋补强壮、解毒消痛、润肠通便等功效。何首乌含有蒽醌类、二苯乙烯苷类及磷脂等有效成分,其中,蒽醌类是重要活性成分。已有报道采用分光光度法^[1]、薄层层析法^[2]及高效液相色谱法^[3~6]等分析何首乌及其制剂中的蒽醌类成分,但预处理繁琐费时,分离效率不高。超临界流体萃取(SFE)是近代分离领域出现的高新技术,除了可以减少有机溶剂使用外,还具有萃取效率和选择性高、省时、萃取溶媒便于挥发、提取物较为干净、环境污染小、操作条件易于改变等特点,是一种较为理想的萃取方法^[7]。本文建立了 SFE-HPLC 法分离测定何首乌中的蒽醌类成分,为何首乌及其制剂的质量控制提供方法学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器:SP8800 液相色谱仪,UV-2000 检测仪,SP4400 积分仪(美国光谱物理公

司);ISCO100 注射泵,SFX-10 超临界流体萃取仪(美国 ISCO 公司);HA-202M 电子天平(日本)。

1.2 试剂:大黄素、大黄素甲醚、大黄酚及大黄酸对照品(中国药品生物制品检定所提供);何首乌药材购于安徽亳州药材市场,由第二军医大学药学院生药教研室鉴定;甲醇为色谱纯,氯仿为分析纯。

2 实验方法

2.1 色谱条件:色谱柱为 Econosphere C₈ 5 μ (250 mm×4.6 mm),流动相为甲醇-0.2%磷酸(70:30),流速 1.2 mL/min,室温,检测波长 437 nm。

2.2 SFE 萃取条件的选择

2.2.1 改性剂的选择:超临界 CO₂ 流体的极性与正己烷相似,因此在萃取极性成分时,一般要加入少量极性溶剂,以改善萃取效果。我们考察了甲醇、氯仿和乙酸乙酯三种溶剂,以选择甲醇萃取效率为最高,因此我们选择

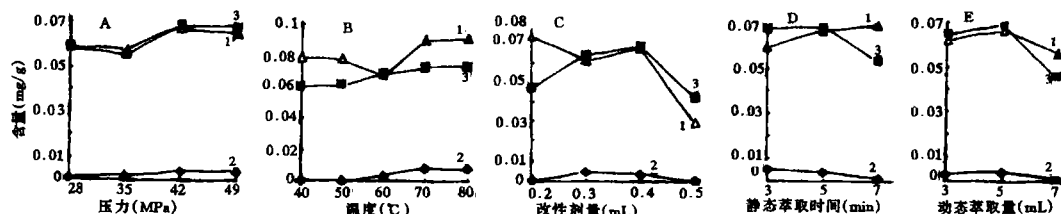
* Address: Yuan Hailong, College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai

袁海龙 男,1992年毕业于第二军医大学药学院,学士学位,1996年攻读硕士研究生。主要研究方向为中草药提取工艺及质量控制。已获军队科技进步奖1项,先后发表论文10余篇,其中1篇获第三届岛津杯优秀论文三等奖。

了甲醇作为改性剂。

2.2.2 萃取压力的选择:超临界流体具有很大的可压性,在一定温度下,压力增加,超临界流体的密度增加,溶质在流体中的溶解度增大,萃取效率提高。固定其他参数,改变压力从 28~49 MPa,每隔 7 MPa 萃取一个点,结果见图 1-A。从图可见,选择 42 MPa 作萃取压力较好。

2.2.3 温度的选择:恒压下,温度升高,流体密度下降,但溶解度是溶质挥发度的函数,提高温度可指数级地提高溶质的蒸气压,从而增加溶质的溶解度,提高萃取效率。改变温度 40℃~80℃,每隔 10℃ 萃取一个点,结果见



A-压力 B-温度 C-改性剂量 D-静态萃取时间 E-动态萃取量 1-大黄素甲醚 2-大黄酸 3-大黄素

图 1 各因素对萃取率的影响

2.2.6 动态萃取体积的选择:动态萃取体积对萃取效率影响很大,固定其它四种萃取条件,改变萃取体积 3、5、7 mL,结果见图 1-E。我们选择了 5 mL 为动态萃取体积。

2.2.7 SFE 萃取工艺:经系统法考察,我们选择了以下萃取条件:萃取压力为 42 MPa,温度 70℃,改性剂量 0.4 mL,静态萃取时间 5 min,动态萃取体积 5 mL。

2.3 标准曲线绘制:精密吸取各对照品适量,用甲醇配制定容,使每 1 mL 含大黄素 30 μg、大黄酚 32 μg、大黄素甲醚 22 μg 及大黄酸 32 μg 的甲醇混合溶液。精密吸取 0.5、1、2、4、8 mL 置 10 mL 容量瓶中,甲醇定容后依次进样,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,对照品进样量为横坐标绘制标准曲线,其回归方程为:

$$Y_{\text{大黄素}} = 2970971.42X + 29015.62, r = 0.9997$$

图 1-B。从图可见,选择萃取温度为 70℃ 较好。

2.2.4 改性剂量的选择:加入一定量的极性改性剂可提高萃取量,但过高的改性剂量将使萃取状态在一种非临界状态下进行,往往达不到理想的萃取效果。我们选择了 0.2、0.3、0.4、0.5 mL 甲醇作为改性剂萃取效果良好。

2.2.5 静态萃取时间的选择:整个超临界流体萃取过程既包含转运、又存在扩散,体质一定的静态萃取时间可提高萃取效率。我们选择了 3、5、7 min 三个时间,结果见图 1-D。由图可见,静态萃取时间 5 min 较好。

$$Y_{\text{大黄素}} = 4357216.14X + 28261.46, r = 0.9996$$

$$Y_{\text{大黄酚}} = 3619466.72X + 32043.76, r = 0.9996$$

$$Y_{\text{大黄素甲醚}} = 2164933.67X + 2292.77, r = 0.9992$$

2.4 精密度实验:取样品测定项下对照品混合溶液,重复进样 5 次,每次 10 μL,对照品峰面积积分值的 RSD 值分别为大黄酸 1.2%、大黄素 1.7%、大黄酚 0.9%、大黄素甲醚 1.3%。

2.5 加样回收率试验:取已知含量的何首乌药材 0.5 g,分别加入对照品溶液适量,挥干,按样品方法萃取及测定,5 次测得平均回收率分别为大黄酸 99.1%(RSD 2.6%)、大黄素 98.2%(RSD 1.1%)、大黄酚 100.7%(RSD 2.6%)和大黄素甲醚 99.5%(RSD 0.9%)。

2.6 样品测定:取何首乌药材粗粉 0.5 g,精密称定,以上述最佳萃取条件进行萃取,定容 10 mL,精取 10 μ L 直接进样,结果是大黄酸为 0.0089 mg/g,大黄素为 0.0735 mg/g,大黄素甲醚为 0.0893 mg/g,大黄酚未检测到,见图 2。



A-对照 B-何首乌

1-大黄酸 2-大黄素 3-大黄酚 4-大黄素甲醚

图 2 对照品与样品色谱图

3 讨论

本文考察了 SFE 与文献报道^[5]的提取方法的提取效率,其结果见表 1,经 *t* 检验,*P* 值皆小于 0.05,说明两种方法无显著性差异,但 SFE 时间短,效率高,后处理简单。

表 1 提取方法比较(*n*=3)

提取方法	溶剂	提取时间 (min)	大黄酸 (mg/g)	大黄素 (mg/g)	大黄素甲醚 (mg/g)
SFE	CO ₂	20	0.0089	0.0735	0.0893
超声波	甲醇 氯仿	180	0.0087	0.0740	0.0824

本文建立的 HPLC 法使蒽醌类成分得到很好的分离,并对何首乌中大黄酸作了定量分析。本文的固定相采用 C₈ 柱,柱的极性强于 C₁₈ 柱,而大黄酸极性较强,经 C₈ 柱出峰时间较为合适,分离效果良好。蒽醌类属弱酸性成分,流动相呈弱酸性条件下其保留行为得到改善。本文考察了以磷酸甲醇水溶液分离得到的峰形对称,分离效果良好。

参考文献

1 姚桂根,等. 中成药研究,1982,4(4):12
2 孙彤云,等. 中成药研究,1985,7(11):8
3 姚桂根,等. 中成药研究,1984,6(3):8
4 徐凯健,等. 中国医院药学杂志,1989,9(11):544
5 大岛俊幸,等. 药物分析杂志,1996,16(4):219
6 吴振洁,等. 中国药科大学学报,1997,28(2):123
7 Gawdzik J, et al. J High Resolution Chromatogr, 1995, 18:781

(1998-08-10 收稿)

Determination of Rhein, Emodin and Physcion in Tuber Fleeceflower
(*Polygonum multiflorum*) by Supercritical Fluid Extraction-HPLC

Yuan Hailong, Zhang Chun, Li Xianyi, et al. (Pharmaceutical College of the Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Supercritical fluid extraction (SFE) was used to extract anthraquinones in *Polygonum multiflorum* Thunb. and contents of rhein, emodin and physcion in the extract were determined by RP-HPLC. SFE conditions: pressure 42 MPa, temperature 70°C, 0.4 mL methanol as modifier, static extraction 5 min and dynamic extraction volume 5 mL. HPLC conditions: the HPLC column was packed with C₈ (5 μ m); the mobile phase was methanol; 0.2% phosphoric acid (70 : 30); the detection wave-length was 437 nm. The method was accurate and reliable. The mean recovery was 99.1% (RSD 2.0%) for rhein, 98.2% (RSD 1.1%) for emodin, 100.7% (RSD 2.6%) for chrysophanol and 99.5% (RSD 0.9%) for physcion.

Key words *Polygonum multiflorum* Thunb. supercritical fluid extraction (SFE) HPLC anthraquinones

欢迎投稿 欢迎订阅