

2.8 回收率试验:取含莪术醇 0.752 mg/g 的莪术油微纳囊样品(批号 20041021) 0.1 g,平行 6 份,分别加入莪术醇对照品贮备液 0.8、1.0、1.2 mL,依法制备供试品溶液,分别测定莪术醇的质量分数,计算回收率,结果平均回收率为 99.52%,RSD 为 1.51%($n=6$)。

2.9 样品的测定:取莪术油微纳囊样品 5 批,分别制备供试品溶液,注入气相色谱仪,测定各样品中莪术醇和内标物的色谱峰峰面积,内标法计算样品中莪术醇的质量分数,结果见表 1。

表 1 莪术油微纳囊中莪术醇的测定结果($n=4$)

Table 1 Determination of curcumol in *Oleum Curcumae* Micro/nano Capsules ($n=4$)

批号	莪术醇/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
050101	0.750	0.81
050102	0.761	1.23
050103	0.721	1.07
050104	0.752	0.91
050105	0.749	1.10

3 讨论

莪术油微纳囊是通过选用可生物降解的聚乳酸包覆莪术油而制得的粒径分布在 100~200 nm 的纳米微胶囊,微纳囊化改变莪术油的水溶性,提高了其稳定性与溶解速率。因此,其测定与单纯莪术油不

同,需要经过二氯甲烷溶解聚乳酸,除去二氯甲烷,再用无水乙醇萃取莪术油,醋酸乙酯定容。如果微纳囊直接用醋酸乙酯萃取定容,则由于聚乳酸微溶于醋酸乙酯,造成微纳囊破壁不彻底,莪术油萃取不完全,引起损失,造成误差。另外,由于聚乳酸是高分子物质,在用气相色谱分析时,被滞留在柱内堵塞毛细管柱,降低柱效。

文献报道^[1]以氧杂蒽为内标测定莪术醇,但是在本实验中以氧杂蒽为内标未达到基线分离。以联苯为内标,通过对样品的适当处理,在程序升温条件下,莪术油微纳囊溶液中莪术醇的出峰时间为 10.45 min,内标物联苯出峰时间为 7.8 min,二者都达到基线分离,对称性也很好。

References:

- [1] Wang J Z, Jiang Y F, Lu J F, et al. Gas chromatographic determination of curcumol on the microcapsules of combination *Curcuma* oil[J]. *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志), 2001,10(2):107-109.
- [2] Gong K M, Ren J, Tang S H, et al. Determination of curcumol in Compound Ezhu Oil Soft Capsules by CGC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005,36(9):1330-1332.
- [3] Wu Y C, Liu T Y, Jiang L G, et al. Determination of curcumol and germacrone in *Curcuma* oil by RP-HPLC [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2004,21(4):64-65.
- [4] You J, Yu Y W, Li Q P, et al. Determination of *Curcuma* oil microcapsules [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005,27(1):25-28.

HPLC 法测定灌胃虎杖提取物大鼠粪便及尿液中大黄素和大黄素甲醚

蒋 晔, 郝晓花, 刘红菊

(河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017)

蒽醌类化合物具有消炎、抗菌、致泻、利尿以及抗肿瘤、抗病毒等作用,是大黄、虎杖、何首乌、决明子等中药的主要活性成分。蒽醌类化合物有游离型和结合型两种存在形式。结合型蒽醌不吸收,在肠道内被细菌代谢后产生泻下作用^[1],因此结合型蒽醌在肠道内的吸收、代谢与其药动学有关。已有的药动学研究均为测定血清或血浆中的蒽醌类成分^[2,3],由于代谢物中成分复杂,干扰较多,因此本实验建立了测定大鼠灌胃虎杖提取物后的粪便和尿液中的游离型和结合型大黄素总量的非水反相液相色谱法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:SP-8810 高压泵、SP-8450 紫外检测器(美国光谱物理公司),千谱色谱工作站(南京千谱软件有限公司)。

甲醇为色谱纯,冰醋酸、氯仿、盐酸、硫酸等均为分析纯;大黄素(批号 0756-200110)、大黄素甲醚对照品(批号 758-200006)均由中国药品生物制品检定所提供;虎杖提取物为自制,HPLC 测得大黄素的质量分数为 51.25 mg/g、大黄素甲醚的质量分数为 40.57 mg/g,其中结合大黄素与游离大黄素的比基本一致(1:1.08);SD 大鼠由河北医科大学实验动物中心提供。

收稿日期:2006-04-18

作者简介:蒋 晔(1961—),上海人,教授,博士生导师,主要从事药物的质量研究与质量控制。

Tel:(0311)86266069 E-mail:jiangye@hebm. edu. cn

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5.0 μm);柱温:室温;流动相:甲醇-冰醋酸(99.9:0.1);检测波长:254 nm;体积流量:1.0 mL/min;进样量:20 μL。

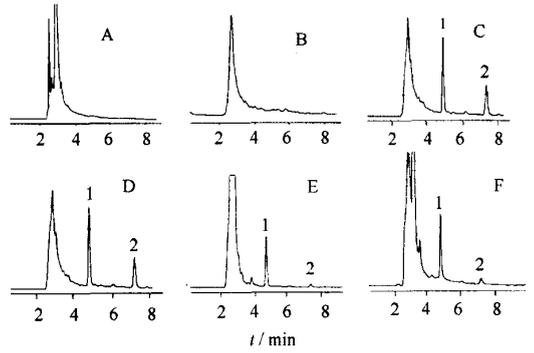
2.2 对照品溶液的配制:精密称定大黄素、大黄素甲醚对照品适量,分别置 50 mL 量瓶中,用少量氯仿溶解后用甲醇稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.140 mg/mL 的大黄素储备液和质量浓度为 0.210 mg/mL 的大黄素甲醚储备液。临用时,分别吸取大黄素和大黄素甲醚的储备液各 10 mL 置于同一 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即得大黄素、大黄素甲醚的混合对照品溶液。取混合对照品溶液按倍比稀释法配制不同质量浓度的系列对照品溶液,与混合对照品溶液共同作为系列对照品溶液。

2.3 大鼠粪便的预处理方法:取大鼠粪便样品,混匀,精密称取约 0.5 g,置锥形瓶中,精密加乙醇 25 mL,置水浴上加热回流 1 h,放冷,滤过,取全部滤液,置烧瓶中,水浴蒸干,加 30%乙醇-盐酸(10:1)溶液 15 mL,置水浴中加热水解 1 h,立即冷却,用氯仿强力振摇提取 3 次,每次 15 mL,合并氯仿液,置水浴上蒸干,残渣用甲醇 2.5 mL 溶解,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 大鼠尿样的预处理方法:取大鼠尿样 3 mL,加入 30%盐酸 3 mL,旋涡混匀,(70±2) °C 水浴水解 30 min。冷却,用氯仿强力振摇提取 3 次,每次 5 mL,合并氯仿液,挥干氯仿,残渣用甲醇 2.5 mL 溶解,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.5 干扰试验:在选定的色谱条件下以空白大鼠粪便、尿液,空白大鼠粪便、尿液中加入大黄素、大黄素甲醚对照品,灌胃虎杖提取物后的大鼠粪便、尿液样品经处理后进样,色谱图见图 1。结果表明粪便和尿液中的其他组分不干扰大黄素和大黄素甲醚的测定,其分离度均大于 2.0,理论塔板数以大黄素计不低于 13 200,以大黄素甲醚计不低于 18 600。

2.6 线性关系的考察:精密量取系列混合对照品溶液各 0.5 mL,分别加至空白大鼠粪便(0.5 g)和尿液(3 mL)样品中,使粪便样品中的大黄素质量分数分别相当于 0.420、0.840、1.68、3.36、6.72、13.44、33.6 μg/g;大黄素甲醚的质量分数分别为 0.525、1.05、2.10、4.20、8.40、16.8、42.0 μg/g。尿液样品中大黄素质量浓度分别相当于 0.084、0.168、0.336、0.672、1.344、2.69、6.72 μg/mL;大黄素甲



1-大黄素 2-大黄素甲醚
1-emodin 2-physcion

图 1 空白大鼠粪便(A)、空白大鼠尿液(B)、空白大鼠粪便样品加入大黄素、大黄素甲醚对照品(C)、空白大鼠尿液样品加入大黄素、大黄素甲醚对照品(D)、灌胃虎杖提取物后的大鼠粪便样品(E)和灌胃虎杖提取物后的大鼠尿样(F)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank rat feces (A), blank rat urine (B), blank rat feces with emodin and physcion references substance (C), blank rat urine with emodin and physcion references substance (D), rat feces sample after ig administered with *Rhizoma Polygontum Cuspidatum* extract (E), and rat urine sample after ig administered with *Rhizoma Polygontum Cuspidatum* extract (F)

醚的质量浓度分别为 0.0875、0.175、0.350、0.700、1.40、2.80、7.00 μg/mL。按大鼠粪便和尿液样品的处理方法进行处理,测定大黄素、大黄素甲醚。以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度或者质量分数为横坐标,绘制标准曲线,拟合线性方程,结果见表 1。

表 1 线性范围和回归方程

Table 1 Linear ranges and regression equations

生物样品	成分	回归方程	相关系数	线性范围
粪便	大黄素	$A=1.07 \times 10^6 C - 1.98 \times 10^4$	0.999 9	0.420~33.6 μg/g
	大黄素甲醚	$A=2.2 \times 10^6 C - 2.32 \times 10^4$	0.999 6	0.525~42.0 μg/g
尿液	大黄素	$A=1.76 \times 10^6 C - 134$	0.999 6	0.084~6.72 μg/mL
	大黄素甲醚	$A=1.65 \times 10^6 C - 1.22 \times 10^4$	0.999 1	0.087 5~7.00 μg/mL

2.7 精密度试验:分别精密吸取含大黄素和大黄素甲醚的大鼠粪便和尿液样品,进样 20 μL,连续进样 5 次,测定峰面积。结果大黄素在粪便样品和尿样中峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.9%;大黄素甲醚在粪便样品和尿样中峰面积的 RSD 分别为 0.9%、1.1%。

2.8 回收率试验:于空白大鼠粪便样品中分别加入低、中、高 3 种质量浓度的大黄素、大黄素甲醚混合对照品溶液(使之质量分数分别相当于含大黄素

0.840、3.36、13.44 $\mu\text{g/g}$ ；大黄素甲醚 1.05、4.20、16.8 $\mu\text{g/g}$ ，空白尿液样品中分别加入低、中、高 3 种质量浓度的大黄素、大黄素甲醚混合对照品溶液（使之质量浓度分别相当于含大黄素 0.168、0.672、2.69 $\mu\text{g/mL}$ ；大黄素甲醚 0.175、0.700、2.80 $\mu\text{g/mL}$ ），每个质量浓度平行 5 份，按大鼠粪便样品和尿液样品的处理方法进行处理，记录峰面积。以测得量与加入量之比计算回收率，结果粪便样品中大黄素、大黄素甲醚的平均回收率分别为 98.2%、97.6%，RSD 分别为 1.2%、1.4%。尿液样品中大黄素、大黄素甲醚的平均回收率分别为 98.4%、97.1%，RSD 分别为 1.1%、1.5%。

2.9 药动学测定结果：实验 SD 大鼠 12 只，体重 180~200 g，雌雄各半。给药前禁食 12 h，自由饮水，以 1.0 mL/100 g 剂量 ig 给予虎杖提取物的 10% 阿拉伯胶混悬液，相当于大黄素 8.0 mg/kg，收集给药后 0~36 h 粪便和尿液，按大鼠粪便样品和尿液样品的处理方法进行处理，以外标法测定大黄素和大黄素甲醚的量，结果见表 2。大鼠粪便中大黄素的量 16.4~28.5 μg ，大鼠尿样中大黄素的量 5.60~11.5 μg 。虽然大黄素甲醚在大鼠粪便及尿样中都有检出，但其量较低，无实际意义，故未在结果中列出。

表 2 大鼠灌胃虎杖提取物后粪便和尿液中大黄素的量
Table 2 Content of emodin in feces and urine of rats after ig administered with *Rhizoma Polygontum Cuspidatum* extract

编号	粪便中大黄素/ μg	尿液中大黄素/ μg
1	18.5	9.64
2	21.4	8.32
3	24.8	6.35
4	16.4	5.60
5	19.6	9.67
6	25.7	6.59
7	27.9	11.5
8	23.6	10.8
9	22.3	7.84
10	28.5	8.56
11	19.8	5.78
12	24.5	11.1
$\bar{x} \pm s$	22.8 \pm 3.8	8.48 \pm 2.10

3 讨论

本实验采用非水反相液相色谱法测定大鼠排泄物中大黄素，结果表明粪便样品中游离和结合大黄素的总量(16.4~28.5 μg)远低于 ig 给予大鼠的虎杖提取物中结合大黄素的量(约每只 1 mg)，与文献报道的结合蒽醌在肠道被代谢后具泻下作用^[1]相一致，同时可看到蒽醌类化合物以原形形式排泄较少。

测定总蒽醌时，样品通常经提取、水解、萃取后进行测定^[4]。水解时一般采用稀盐酸或稀硫酸，萃取一般采用氯仿、乙醚等有机溶剂。考虑到氯仿对大黄素和大黄素甲醚的溶解度大，且氯仿比水密度大，操作易进行，本实验的样品经水解后均采用氯仿进行萃取，同时氯仿萃取使极性大的内源性成分对测定的干扰减小。

测定蒽醌类成分的方法有薄层色谱法^[3]、反相高效液相色谱法^[5]等。最常用的是含水的反相高效液相色谱法，其流动相中均含极性大的水分子，故大黄素、大黄素甲醚的保留时间长且柱效低，而采用非水反相液相色谱法时，分离时间短、峰对称性好且柱效高^[6]。在生物样品的测定中干扰成分较多，由于非水反相液相色谱法的柱效高，故样品峰能和杂质峰得到较好的分离。

References:

[1] Guo W X. The pharmacology survey of emodin and chryso-phanol in rabbits [J]. *J Jiangnan Univ* (江汉大学学报), 2002, 30(2): 60-61.
 [2] Zhou J H, Yuan Y S, Yang J W. HPTLC Determination of three anthraquinone derivatives of Chinese rhubarb in plasma [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(6): 36-39.
 [3] Jiang X H, Zhang D. Study on determination method of rhubarb anthraquinones in biological samples [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23(4): 279-284.
 [4] *Ch P* (中国药典)[S]. Vol 1. 2005.
 [5] Oshima T, Hirayama F, Wang K, et al. The analysis of anthraquinones in *Polygonum multiflorum* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(4): 219-222.
 [6] Jiang S H, Jiang Y, Hao X H. Determination of emodin and physcion in Zhiganning Capsules by nonaqueous reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23(6): 437-439.

《中草药》投稿特别注意事项

1. 实验性论文需要单位介绍信(注明:论文内容真实,作者排名无争议,无一稿两投,无泄密)。
2. 创新性论文优先发表,新化合物免收版面费。
3. 图题、表题、图注、表注需中英文双语表示。
4. 文后参考文献译成英文。
5. 本刊不收审稿费,但刊用稿件要收取版面费。
6. 投稿时请留下联系方式(电话和 E-mail)。