

环糊精修饰混合胶束电动色谱法测定大黄中 6 种有效成分

尚小玉, 袁倬斌*

(中国科学技术大学研究生院应用化学研究所, 北京 100039)

摘要: 目的 分离 测定大黄样品中 6 种有效成分。方法 用 20 mmol·L⁻¹ 硼砂缓冲溶液(含 20 mmol·L⁻¹ 脱氧胆酸钠 20 mmol·L⁻¹ 牛磺胆酸钠和 15 mmol·L⁻¹ β-环糊精), 通过环糊精修饰的混合胶束电动色谱内标定量法测定。结果 在 25 min 内分离出芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、土大黄苷、大黄素甲醚和大黄酚, 对缓冲溶液 pH、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠和 β-环糊精浓度等分离条件进行了优化。考察了方法的线性行为、精密度和回收率, 并对生大黄和蒙古大黄样品进行了测定。结论 本法可作为鉴别大黄优劣的有效方法之一。

关键词: 大黄; 土大黄苷; 大黄素; 大黄酸; 大黄素甲醚; 大黄酚; 芦荟大黄素; 环糊精修饰胶束电动色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)10 - 0798 - 04

大黄是常用中药, 有将军和黄良的美称。大黄有泻下、通淤导滞、抗菌消炎、止痛止血、抗肿瘤和抗突变等作用。大黄中重要的活性成分是蒽醌类化合物及其衍生物, 包括大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚及其葡萄糖苷。土大黄苷是二苯乙烯的衍生物, 只存在于劣质大黄中, 正品大黄中不含土大黄苷。TLC^[1]和 HPLC^[2]是常用的分离测定大黄中有效成分的方法。近年来, 各种 CE 方法应用于蒽醌类化合物的分离测定, 如胶束电动毛细管色谱(MECC)^[3,4]、微乳胶电动色谱(MEEKC)^[5]和毛细管电色谱(CEC)^[6]等方法。用 CE 方法对土大黄苷的分离尚未见报道。环糊精修饰胶束电动色谱(CD-MEKC)的比较新的领域是混合胶束的使用, 两种或两种以上有不同性质的胶束混合在一起提高分离的选择性和分离度。本文用环糊精修饰的混合胶束电动色谱法对大黄中 6 种成分进行了分离, 得出最佳分离条件。在此条件下, 对生大黄、蒙古大黄和

一种正品大黄唐古特大黄样品进行了分析。

材料与 方法

药品与仪器 芦荟大黄素(aloe-emodin)、大黄酸(rhein)、大黄素(emodin)、土大黄苷(rhaponticin)、大黄素甲醚(phycion)和大黄酚(chrysophanol)均购自中国药品生物制品检定所, 经测定含量均在 95% 以上, 各物质的结构见图 1。脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate, SDC)购自北京市海淀区微生物培养基制品厂; 牛磺胆酸钠(sodium taurocholate, STC)购自北京怀柔生化研究所。β-环糊精(β-cyclodextrin, β-CD)购自华北地区特种试剂开发中心。邻-苯二甲酸(纯度 99.8%)购自北京化工厂。生大黄、蒙古大黄样品购于河北安国药材市场, 并由王治民教授鉴定。硼砂、无水乙醇、H₂SO₄、氯仿和 NaH₂PO₄ 均为分析纯。二次蒸馏水配制缓冲溶液。

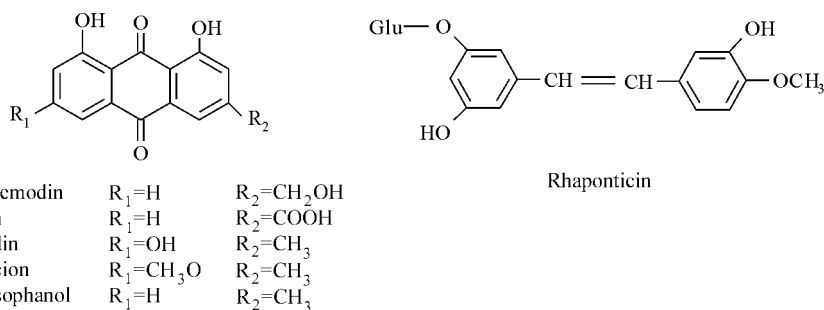


Figure 1 Structures of the six components in Rhubarb

收稿日期: 2001-10-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20175025, 29875027); 国家“九五”科技攻关重点项目(96-A23-01-06); 电分析化学国家重点实验室基金.

* 通讯作者 Tel: (010)68224596, Fax: (010)68210501, E-mail: xiaoyushang@eyou.com

实验在北京新技术所 1229 型 Analyser HPCE 上进行。未涂层的熔融石英毛细管, 购于河北永年光纤厂, 内径 50 μm , 有效长度 45 cm。柱上紫外检测 (254 nm), 恒压 15 kV, 电进样 5 s。

样品制备 称取大黄样品粉末 0.5 g 置于 Soxhlet 提取器中, 加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 15 mL 和氯仿 70 mL, 加热回流, 提取至水相无色。氯仿相在水浴中蒸干。残渣用无水乙醇溶解, 加 NaH_2PO_4 溶液稀释到 5 mL。取此液 1 mL, 加入内标溶液 (邻-苯二甲酸) 50 μL 待用。在进样前所有溶液都通过 0.45 μm 滤膜过滤。

结果和讨论

1 缓冲溶液 pH 对分离的影响

6 种物质均有酚羟基具弱酸性, 较高 pH 对分离有利。在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂缓冲液 (含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDC, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ STC 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \beta\text{-CD}$) 中, 于 pH 9 ~ 11.1 考察了缓冲溶液对分离选择性的影响, 结果见图 2。随着 pH 的增大, 各物质的迁移时间缩短。在此 pH 范围内, 6 种组分都不同程度的带有负电荷, 电泳过程中向阳极方向迁移; 另一方面, 随着 pH 的增大, 电渗流增大, 导致各组分迁移时间变短。在 pH 10.5 ~ 11.1 各组分能很好的分开且有较短的迁移时间。

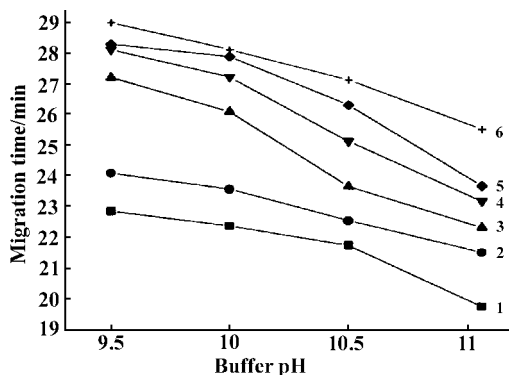


Figure 2 Effect of buffer pH on migration time
1. Aloe-emodin; 2. Rhein; 3. Emodin; 4. Rhaponticin; 5. Physcion; 6. Chrysophanol

2 SDC 和 STC 浓度的影响

分别考察了 CD-MEKC 的单一胶束系统对分离的影响。两种单胶束系统均未能将 6 种成分完全分开。在 SDC 系统中, 5 种物质得到分离, 大黄素甲醚和大黄酚一起流出; 在 STC 系统中, 只有 4 种成分被分开, 土大黄苷、大黄素甲醚和大黄酚 3 个峰重叠在

一起。为了提高分离的选择性, 将两种胶束混合, 在浓度 $20 \sim 40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别考察了 SDC 和 STC 浓度对迁移时间的影响, 结果见图 3。由图中可见, 两种胶束对迁移时间的影响有着相似的规律, 随着浓度的增加, 各组分的迁移时间变长。由于 6 种组分都是亲油性物质, 随着胶束浓度的增大, 在胶束相中的溶解度增大, 导致迁移时间增加。当两种胶束浓度均在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 6 种组分有较短的迁移时间和较高分辨率。

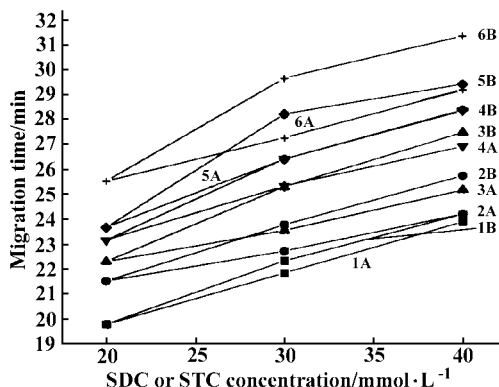


Figure 3 Effect of sodium deoxycholate (SDC) or sodium taurocholate (STC) concentration on migration time

1. Aloe-emodin; 2. Rhein; 3. Emodin; 4. Rhaponticin; 5. Physcion; 6. Chrysophanol. A: SDC; $\beta\text{-CD}$ and STC concentrations were 10 and $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; B: STC; $\beta\text{-CD}$ and SDC concentrations were 10 and $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

3 $\beta\text{-CD}$ 浓度的影响

在此混合胶束体系中, 存在着 3 种假固定相, 2 种是阴离子胶束, 另 1 种是电中性的 $\beta\text{-CD}$ 。汪宝琪等^[7]曾用 $\beta\text{-CD}$ 单分子胶束荧光薄层色谱法测定了大黄中蒽醌衍生物, 指出蒽醌衍生物可以进入 $\beta\text{-CD}$ 空腔, 形成包络物。因此, 在这个两相系统中, 6 种组分既可在混合胶束相中分配, 又可与 $\beta\text{-CD}$ 形成包络物。形成的包络物不同, 其稳定性也不同, 导致分离的选择性不同。在含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDC 和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ STC 的缓冲溶液中, 考察了 $\beta\text{-CD}$ 在 $10 \sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对组分迁移时间的影响, 结果见图 4。随着 $\beta\text{-CD}$ 浓度的增大, 各组分迁移时间变短。由于各组分与 $\beta\text{-CD}$ 形成包络物后体积变大, 因此向阳极的电泳淌度降低, 迁移时间缩短。在 $\beta\text{-CD}$ 浓度大于 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 分辨率变差。

4 缓冲溶液浓度和分离电压对分离的影响

高缓冲溶液浓度使迁移时间延长, 改善了分离

度。但当硼砂浓度高于 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,电流变大,使分离电压降低,从而降低了分离效率。因此, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是适宜的缓冲溶液浓度。

低电压使分析时间增加,高电压产生大量的焦耳热,在 15 kV 时,能得到高的分离效率又不会产生过多的焦耳热。

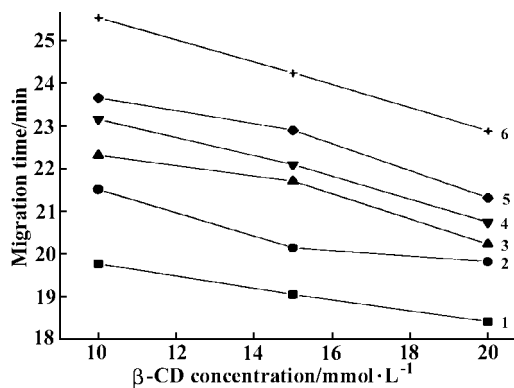


Figure 4 Effect of β -CD concentration on migration time

1. Aloë-emodin; 2. Rhein; 3. Emodin; 4. Rhaponticin; 5. Physcion; 6. Chrysophanol

5 标准曲线的绘制,方法的精密度和加样回收率实验

芦荟大黄素 $4 \sim 34 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄酸 $5 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄素 $4 \sim 60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、土大黄苷 $5 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄素甲醚 $6 \sim 90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和大黄酚 $5 \sim 85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在 5 个不同的浓度下,对 6 组分的标准曲线进行了绘制。浓度 $Y(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$,对内标的峰面积比 X ,线性方程和相关系数分别为:

芦荟大黄素: $Y=10.23 X - 0.11 \quad r=0.9991$

大黄酸: $Y=12.11 X - 0.01 \quad r=0.9990$

大黄素: $Y=13.25 X + 0.17 \quad r=0.9994$

土大黄苷: $Y=9.86 X + 0.38 \quad r=0.9985$

大黄素甲醚: $Y=11.72 X + 0.64 \quad r=0.9983$

大黄酚: $Y=10.57 X + 0.29 \quad r=0.9981$

在 3 个不同浓度下,分别重复进样 8 次和 6 次测得日间和日内精密度。日间和日内相对标准偏差值:芦荟大黄素为 1.0%和 1.1%;大黄酸为 1.4%和 1.9%;大黄素为 1.1%和 1.4%;土大黄苷为 1.6%和 2.0%;大黄素甲醚为 1.6%和 2.0%;大黄酚为 1.6%和 2.2%。

精密称取各标准品不同量,分别加到已知含量的生大黄样品中,按样品制备方法进行提取、测定,计算回收率:芦荟大黄素 100.0%,大黄酸 98.3%,

大黄素 100.4%,土大黄苷 94.6%,大黄素甲醚 95.2%,大黄酚 93.8%。

6 大黄样品中蒽醌衍生物和土大黄苷含量测定

在选定的最佳操作条件下: $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂缓冲液含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDC, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ STC 和 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -CD,对生大黄、蒙古大黄和唐古特大黄样品进行了分析测定。电泳图见图 5,各组分含量列于表 1。从谱图上可以看出,两种劣质大黄样品中土大黄苷峰型明显,而正品大黄中不含土大黄苷。因此,从电泳谱图可看出大黄样品品质的优劣。从测定结果看出,正品大黄中芦荟大黄素、大黄酸和大黄素的含量远高于劣质大黄。此方法为大黄的质量控制提供了新的定性定量方法。

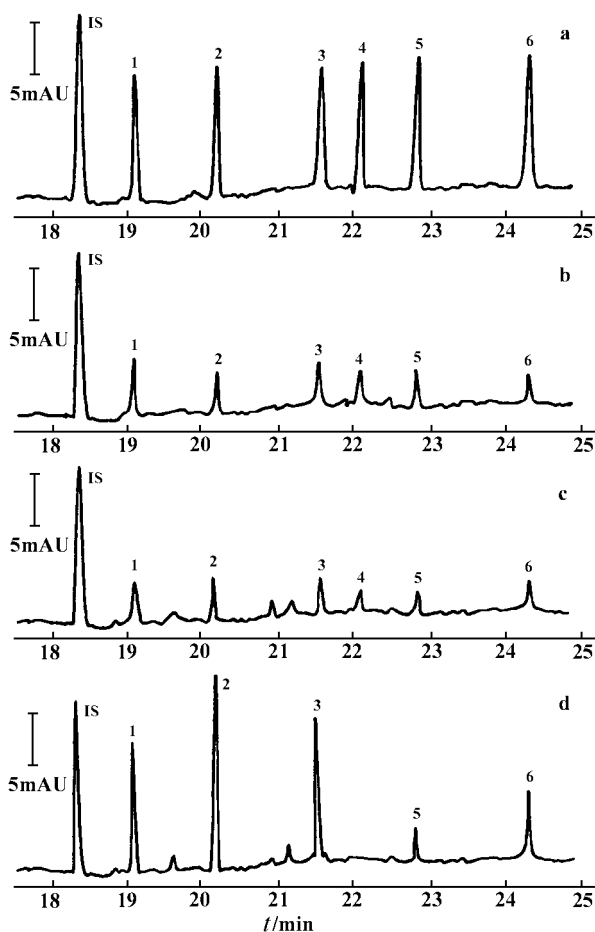


Figure 5 Typical chromatograms of standard sample and *Rheum* samples

a: Standard sample; b: Raw *Rheum*; c: Mongolian *Rheum*; d: *Rheum tanguticum*. 1. Aloë-emodin; 2. Rhein; 3. Emodin; 4. Rhaponticin; 5. Physcion; 6. Chrysophanol; IS. Internal standard (*O* phthalic acid)

Table 1 Contents of the six components in *Rheum* samples ($n = 3$)

Sample	Content / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$					
	Alc α -emodin	Rhein	Emodin	Rhaponticin	Physcion	Chrysophanol
Raw <i>Rheum</i>	1.158	1.013	1.254	0.846	0.961	0.835
Mongolian <i>Rheum</i>	1.027	1.168	1.292	0.763	0.857	0.979
<i>Rheum tanguticum</i>	2.365	7.612	3.214	-	0.413	1.647

致谢：中国中医研究院中药研究所王治民教授对所有生药进行鉴定。

REFERENCES :

- [1] He LY, Luo SR. Analytical method of anthraquinone derivatives in Chinese herbal medicine [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1980, **15**(9) :555 - 562 .
- [2] Liu CL, Zhu PL, Liu MC. Computer-aided development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of hydroxyanthraquinone derivatives in Chinese herb medicine rhubarb [J]. *J Chromatogr A*, 1999, **857**:167 - 174 .
- [3] Sheu S, Chen HR. Determination of five anthraquinoids in Chinese herbal preparations by micellar electrokinetic capillary electrophoresis [J]. *Anal Chim Acta*, 1995, **309** : 361 - 367 .
- [4] Zong YY, Yu MT, Zhu ZQ, *et al.* Separation and determination of several Rhubarb samples by micellar electrokinetic chromatography [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1995, **30**(8) :594 - 598 .
- [5] Li GB, Chen XG, Liu MC, *et al.* Separation and identification of active components in the extract of *Rheum* natural products by microemulsion electrokinetic chromatography [J]. *Analyst*, 1998, **123**:1501 - 1505 .
- [6] Li Y, Liu HW, Ji XH, *et al.* Optimized separation of pharmacologically active anthraquinones in Rhubarb by capillary electrochromatography [J]. *Electrophoresis*, 2000, **21**:3109 - 3115 .
- [7] Wang BQ, Pang ZG, Li SY. Determination of anthraquinone derivatives in Rhubarb by TLC-micelle fluorescence [J]. *J China Pharm Univ* (中 国 药 科 大 学 学 报), 1991, **22**(6) : 375 - 378 .

DETERMINATION OF SIX EFFECTIVE COMPONENTS IN *RHEUM* BY CYCLODEXTRIN MODIFIED MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

SHANG Xiao-yu, YUAN Zhuo-bin

(Institute of Applied Chemistry, Graduate School of the University of Science and
Technology of China, Beijing 100039, China)

ABSTRACT: **AIM** To determine six effective components (alc α -emodin, rhein, emodin, rhaponticin, physcion and chrysophanol) in *Rheum*. **METHODS** Using buffer solution containing $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ borax, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium deoxycholate (SDC), $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium taurocholate (STC), $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -cyclodextrin (β -CD) and ϕ -phthalic acid as the internal standard, the six components were determined by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography. **RESULTS** In less than 25 min, alc α -emodin, rhein, emodin, rhaponticin, physcion and chrysophanol were separated. The separation conditions were optimized by adjusting buffer pH, concentrations of SDC, STC and β -CD. The linearity ranges of alc α -emodin, rhein, emodin, rhaponticin, physcion and chrysophanol were 4 ~ 34, 5 ~ 40, 4 ~ 60, 5 ~ 80, 6 ~ 90 and 5 ~ 85 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. Relative standard deviation (RSD) of the method was less than 2.2%. The recoveries of alc α -emodin, rhein, emodin, rhaponticin, physcion and chrysophanol were 100.0%, 98.3%, 100.4%, 94.6%, 95.2% and 93.8% respectively. Raw *Rheum*, Mongolian *Rheum* and *Rheum tanguticum* samples were analyzed. **CONCLUSION** This method can be an effective one for identification of Rhubarb.

KEY WORDS: *Rheum*; rhaponticin; emodin; rhein; physcion; chrysophanol; alc α -emodin; cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography