

## 大黄中蒽醌类成分配伍前后的量变规律

秦云, 李祥\*, 陈建伟, 吴天舟  
(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] 目的: 研究大黄分别与甘草、黄芩、赤芍、当归、黄连、木香、栀子配伍前后蒽醌类成分的含量变化。方法: 以大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为指标, 采用 HPLC 法测定大黄配伍前后游离和结合蒽醌类成分的含量。结果: 配伍后游离蒽醌和结合蒽醌的总量有不同程度的降低, 其中以与黄连配伍降低幅度最大; 且大黄经配伍用药后, 各蒽醌类成分含量均发生规律性变化。结论: 大黄经配伍用药后, 蒽醌含量发生变化, 推测对降低其毒副作用有一定的贡献, 该研究为临床合理运用提供一定的依据。

[关键词] 大黄; 配伍; 高效液相色谱; 蒽醌

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0094-05

## Content Variation of Anthraquinones in Rhubarb Before and After Compatibilities

QIN Yun, LI Xiang\*, CHEN Jian-wei, WU Tian-zhou

(Pharmacology College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing Jiangsu 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study content variation of anthraquinones in Rhubarb before and after compatibilities with liquorice root, baikal skullcap root, red peony root, Chinese angelica, Chinese goldthread rhizome, costusroot and gardenia. **Method:** An HPLC method was established to determine the contents of free and glycoside-combined anthraquinones namely aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion in rhubarb before and after compatibility. **Result:** The total anthraquinones were decreased after compatibility, especially when it was compatible with Chinese goldthread rhizome. Besides, the content of various anthraquinones was changed regularly after compatibility. **Conclusion:** The content of the five different anthraquinones was influenced by different compatibilities, which may contribute to decrease the toxicity of rhubarb. The study provides the basis when

[收稿日期] 2009-10-26

[通讯作者] \* 李祥, Tel: 13913925677; E-mail: lixiang\_8182@163.com

别出来, 出现这种情况的原因: 可能含量在药材中相对含量较低, 或者是川芎、杭黄菊两种药材合提, 使某些成分产生相互作用, 导致未能检测出来。因此, 在实验中药材的单独提取与复方合提其挥发性成分有较大区别。

合提物挥发油中发现有伞花烃, 伞花烃为杜鹃花科植物宽叶杜鹃和苍耳植物中也有发现。本次实验在单味药中伞花烃成分未检出来, 可能是单味药材中的含量太少, 未检出来, 或者两种药材合提时, 使某些成分产生了相互作用。

### [参考文献]

- [1] 李慧, 王一涛. 不同方法提取川芎挥发油的比较分析 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 379.
- [2] 吴琦, 杨秀伟. 国家中药材 GAP 基地产川芎挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 276.
- [3] 陈友鸿, 莫尚志, 李洁仪, 等. 川芎挥发油成分研究 [J]. 中药材, 2004, 27(8): 580.

rhubarb is used in clinic.

**[Key words]** Rhubarb; Compatibility; HPLC; Anthraquinones

大黄性味苦寒, 是一味泻火、破积、行瘀的要药, 药用历史悠久, 临床应用广泛。但是大黄的不良反应是近来关注的一个热点, 美国“国家毒理学规划”研究<sup>[1]</sup>显示大黄蒽醌类成分具有潜在的肝肾毒性和致癌性; 国内学者王青秀<sup>[2]</sup>、张陆勇<sup>[3]</sup>等实验表明大黄素等游离蒽醌对肾小管上皮细胞 HK-2 和肝癌细胞 HepG2 增殖抑制。但在临床应用中大黄与其他药物配伍后并未见肝肾毒性, 已有的研究也初步显示大黄经炮制配伍后能降低毒性<sup>[4]</sup>。为进一步探讨大黄导致肝肾毒性的物质基础, 本研究以大黄配伍前后蒽醌类成分的变化为切入点, 旨在探讨配伍减毒的可行性, 从而为大黄的临床应用提供依据。

实验以《中医方剂大辞典》为依据, 收集含大黄的方剂七千多首, 按配伍频率高低将药物排序, 并对之进行分析, 找出与大黄配伍频率高、在中医理论上或经现代临床、实验室证明能够对肝肾损害有治疗或改善作用的 7 味中药, 即甘草、黄芩、赤芍、当归、黄连、木香、栀子, 分别与大黄组成对药; 另外选择临床广泛应用的泻心汤和茵陈蒿汤, 利用高效液相色谱法测定汤液中大黄蒽醌类成分的含量, 分析其在配伍前后的变化。

## 1 仪器与试药

Agilent1200 色谱工作站系统, G1315D 型 DAD 检测器, G1316A 恒温柱箱, G1312A 二元泵, G1322A 在线脱气机, G1329A 自动进样器; Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm ×150 mm, 5 μm); 超声清洗器 KQ-100(昆山市超声仪器有限公司)。

中药材均购于安徽丰原铜陵中药饮片有限公司, 经南京中医药大学药学院中药鉴定教研室陈建伟教授鉴定。

供含量测定用对照品大黄酸(批号 110756-200110)、大黄素甲醚(批号 110758-200611) 购自中国药品生物制品检定所, 大黄素、大黄酚和芦荟大黄素由本中药化学教研室从大黄药材中分离鉴定, 纯度均为 98% 以上; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水; 其他试剂为分析纯。

## 2 实验方法

**2.1 药味配伍及煎煮方式** 大黄与生甘草设 1:1 和 4:1 两个剂量组; 大黄与炙甘草、赤芍、当归、木香

各药配比皆为等量; 大黄分别与黄芩、黄连配伍的比例为 2:1(泻心汤中的组方配比); 大黄与栀子配比为 2:3(茵陈蒿汤中的组方配比); 复方泻心汤与茵陈蒿汤组方比例遵循经方。

依据中药临床用药形式, 各组方均以水煎煮。精密称取 1 g 大黄饮片, 其他药材按上述配比取药。各组加 150 mL 水煮沸, 保持微沸 40 min, 趁热过滤, 药渣加 75 mL 水复煎 10 min, 合并滤液, 定容至 100 mL 量瓶, 得各对药及复方水煎液(茵陈蒿汤中茵陈蒿先煎)。

**2.2 对照品溶液制备** 精密称取大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、芦荟大黄素和大黄酸对照品, 加甲醇, 分别制成每 1 mL 含大黄素 0.126 mg, 大黄素甲醚 0.113 mg, 大黄酚 0.133 mg, 芦荟大黄素 0.123 mg, 大黄酸 0.092 mg 的对照品溶液, 精密量取芦荟大黄素溶液 1.5 mL, 大黄酸溶液 2.5 mL, 大黄素溶液 2.5 mL, 大黄酚溶液 1.5 mL, 大黄素甲醚溶液 1.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 为混合对照品溶液。

## 2.3 供试品溶液的制备<sup>[5]</sup>

**2.3.1 游离蒽醌** 分别精密吸取各样品液 5.0 mL, 置分液漏斗中, 加入三氯甲烷 20 mL 萃取, 分取三氯甲烷层, 水层再用三氯甲烷萃取 2 次, 每次 15 mL, 合并萃取液, 回收三氯甲烷, 残渣加甲醇溶解, 稀释至 2 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

**2.3.2 结合蒽醌** 三氯甲烷萃取后的水层加 8% 盐酸 15 mL, 摇匀, 加三氯甲烷 20 mL, 水浴加热回流 1 h, 取出, 冷却, 置分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 水层再用三氯甲烷萃取 2 次, 每次 15 mL, 合并萃取液, 回收三氯甲烷, 残渣加甲醇溶解, 稀释至 2 mL 量瓶中, 摇匀, 既得。

**2.4 色谱条件** 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm ×150 mm, 5 μm); 流动相: A-甲醇, B-0.4% 磷酸水, 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~15 min: 60% A~40% B; 15~25 min: 60% A~85% A, 40% B~15% B; 25~38 min: 85% A~90% A, 15% B~10% B; 38~40 min: 90% A~60% A, 10% B~40% B; 40~45 min: 60% A~40% B; 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25℃, 紫外检测波长 450 nm。对照品、供试品色谱图

见图 1。

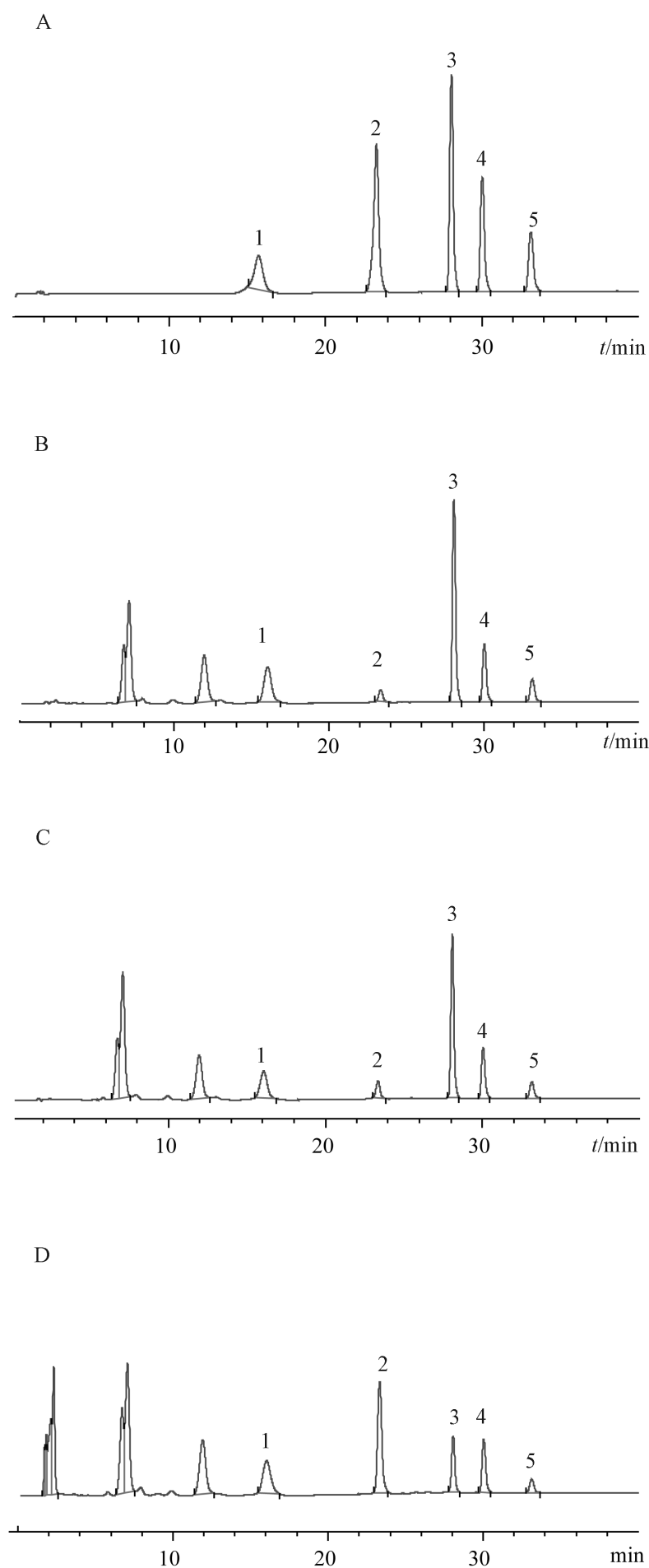


图 1 混合对照品(1)及供试品(2~4)色谱图

A. 对照品; B. 大黄; C. 大黄-甘草 1:1; D. 泻心汤; 1-芦荟大黄素; 2-大黄酸; 3-大黄素; 4-大黄酚; 5-大黄素甲醚

**2.5 标准曲线的建立** 精密吸取混合对照品溶液 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 0.45 μm 微滤膜过滤, 进样量 20 μL, 按色谱条件测定峰面积, 以进样量(μg)对峰面积(A)进行线性回归, 求得回归方程分别为:

芦荟大黄素  $Y=2.39 \times 10^3 X-6.7288$ , 线性范围为: 0.0092 ~ 0.1848 μg, 相关系数  $r=0.9999$ ; 大黄酸  $Y=3.85 \times 10^3 X-5.5883$ , 线性范围为: 0.0115 ~ 0.23 μg 相关系数  $r=0.9998$ ; 大黄素  $Y=2.74 \times 10^3 X-0.0112$ , 线性范围为: 0.0158 ~ 0.315 μg, 相关系数  $r=0.9999$ ; 大黄酚  $Y=2.66 \times 10^3 X+1.1479$ , 线性范围为: 0.00996 ~ 0.1992 μg, 相关系数  $r=0.9999$ ; 大黄素甲醚  $Y=2.87 \times 10^3 X+0.7579$ , 线性范围为: 0.0057 ~ 0.1132 μg, 相关系数  $r=0.9999$ 。

表 1 加样回收率试验

化合物	样品量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均值 / %	RSD / %
芦荟大黄素	15.53	6.16	22.06	106.03	102.54	2.68
		6.16	21.96	104.39		
		12.32	28.22	103.00		
		12.32	27.78	99.43		
		24.64	39.95	99.12		
		24.64	40.97	103.26		
大黄酸	3.59	4.60	8.21	100.59	97.82	2.19
		4.60	8.05	97.10		
		9.20	12.43	96.15		
		9.20	12.83	100.51		
		18.40	21.26	96.04		
		18.40	21.35	96.56		
大黄素	26.86	12.60	39.21	98.05	98.74	2.86
		12.60	38.70	93.99		
		25.20	51.86	99.22		
		25.20	52.75	102.74		
		50.40	76.74	98.97		
		50.40	77.01	99.50		
大黄酚	12.53	6.64	19.18	100.06	97.53	2.51
		6.64	18.92	96.15		
		13.28	25.14	94.91		
		13.28	25.39	96.78		
		26.56	38.08	96.21		
		26.56	39.37	101.05		
大黄素甲醚	4.54	2.83	7.48	103.95	102.56	2.40
		2.83	7.36	99.50		
		5.66	10.48	104.91		
		5.66	10.18	99.72		
		11.32	16.41	104.87		
		11.32	16.13	102.40		

**2.6 精密度试验** 取混合对照品溶液, 连续进样 6

次,测定得各峰峰面积值,其 RSD 值分别为:芦荟大黄素 0.25%、大黄酸 0.07%、大黄素 0.05%、大黄酚 0.05%、大黄素甲醚 0.08%。

**2.7 稳定性试验** 取同一份大黄游离蒽醌型供试品溶液,分别在制备后 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 h 进样分析,测定各成分峰面积,计算得其 RSD 值分别为:芦荟大黄素 2.19%、大黄酸 2.78%、大黄素 1.21%、大黄酚 1.30%、大黄素甲醚 1.00%。结果表明供试品溶液中 5 个蒽醌类成分在 24 h 内稳定。

**2.8 重复性试验** 取同一批大黄样品 5 份,分别制备游离型蒽醌供试品溶液,测定各成分峰面积,计算得其 RSD 值分别为:芦荟大黄素 2.74%、大黄酸 2.34%、大黄素 2.37%、大黄酚 2.65%、大黄素甲醚 2.67%。

**2.9 加样回收率试验** 精密吸取 0.5 g 大黄煎煮

药液 5.0 mL 共 6 份,分别加入高、中、低 3 个浓度的大黄对照品混合溶液,按“供试品溶液的制备”制备游离蒽醌溶液,各取 10  $\mu$ L 进样分析,计算各成分的加样回收率。芦荟大黄素平均回收率值为 102.54%, RSD = 2.68%; 大黄酸平均回收率值为 97.82%, RSD = 2.19%; 大黄素平均回收率值为 98.74%, RSD = 2.86%; 大黄酚平均回收率值为 97.53%, RSD = 2.51%; 大黄素甲醚平均回收率值为 102.56%, RSD = 2.40%。表明本法回收率较好,方法可行。结果见表 1。

**3 测定结果**

供试品溶液 0.45  $\mu$ m 微滤膜过滤,进样量 5  $\mu$ L,测定峰面积,按每克大黄生药计,各组供试品液中游离蒽醌、结合蒽醌测定结果见表 2 ~3。

表 2 游离蒽醌质量分数

[ $\mu$ g·g<sup>-1</sup>(%)]

No.	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	总和
1	313.98	58.69	511.66	142.89	86.38	1113.59
2	200.99(-35.99)	68.05(+15.95)	388.55(-24.06)	178.35(+24.82)	55.10(-36.21)	891.04(-19.99)
3	368.92(+17.50)	50.08(-14.66)	521.61(+1.94)	192.23(+34.53)	62.42(-27.73)	1195.26(+7.33)
4	190.34(-39.38)	61.83(+5.36)	462.21(-9.67)	148.48(+3.91)	52.42(-39.32)	915.28(-81.15)
5	262.54(-16.38)	111.33(+89.70)	355.57(-30.51)	106.43(-25.51)	42.31(-51.02)	878.18(-21.14)
6	282.17(-10.13)	327.06(+457.29)	451.29(-11.80)	116.02(-18.81)	49.72(-42.45)	1226.25(+10.12)
7	545.71(+73.80)	471.13(+702.79)	670.02(+30.95)	350.26(+145.13)	87.82(+1.67)	2124.94(+90.82)
8	174.98(-44.27)	43.38(-26.07)	438.72(-14.26)	138.74(-2.90)	58.94(-31.77)	854.76(-23.24)
9	76.85(-75.52)	88.91(+51.49)	43.94(-91.41)	41.79(-70.75)	13.19(-84.73)	264.68(-76.23)
10	152.13(-51.55)	200.02(+240.83)	88.31(-82.74)	103.64(-27.47)	28.48(-67.03)	572.57(-48.58)
11	332.49(+5.90)	131.12(+123.42)	382.25(-25.29)	183.07(+28.12)	57.05(-33.95)	1085.97(-2.48)
12	119.03(-62.09)	88.69(+51.12)	94.73(-81.49)	46.68(-67.33)	13.54(-84.32)	362.67(-67.43)

表 3 结合蒽醌质量分数

[ $\mu$ g·g<sup>-1</sup>(%)]

No.	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	总和
1	1 105.83	1 608.43	1 466.93	871.62	211.45	5 264.25
2	1 138.80(+2.98)	1 267.62(-21.19)	1 754.55(+19.61)	974.18(+11.77)	192.82(-8.81)	5 327.96(+1.21)
3	671.60(-39.27)	1 138.33(-29.23)	1 085.26(-26.02)	550.11(-36.89)	118.53(-43.94)	3 563.83(-32.30)
4	788.61(-28.69)	933.52(-41.96)	1 111.00(-24.26)	756.84(-13.17)	159.05(-24.78)	3 749.02(-28.78)
5	557.48(-49.59)	1 000.67(-37.79)	1 045.49(-28.73)	570.56(-34.54)	134.16(-36.55)	3 308.36(-37.15)
6	815.16(-26.29)	870.62(-45.87)	1 061.61(-27.63)	792.11(-9.12)	164.53(-22.19)	3 704.04(-29.64)
7	776.39(-29.79)	677.18(-57.90)	1 111.71(-24.22)	781.64(-10.32)	124.83(-40.96)	3 471.75(-34.05)
8	618.50(-44.07)	915.18(-43.10)	1 203.21(-17.98)	613.10(-29.66)	116.49(-44.91)	3 466.47(-34.15)
9	621.28(-43.82)	617.61(-61.60)	617.86(-57.88)	378.38(-56.59)	78.74(-62.76)	2 313.87(-56.05)
10	985.50(-10.88)	1 231.33(-23.45)	934.96(-36.26)	731.59(-16.07)	140.73(-33.44)	4 024.10(-23.56)
11	522.75(-52.73)	865.69(-46.18)	860.45(-41.34)	513.03(-41.14)	120.56(-42.98)	2 882.49(-45.24)
12	814.11(-26.38)	671.25(-58.27)	859.36(-41.42)	475.35(-45.46)	106.54(-49.62)	2 926.60(-44.41)

注:1. 大黄 2. 大黄-生甘草 1 1 3. 大黄-生甘草 4 1 4. 大黄-炙甘草 5. 大黄-赤芍 6. 大黄-当归 7. 大黄-木香 8. 大黄-黄芩 9. 大黄-黄连 10. 泻心汤 11. 大黄-栀子 12. 茵陈蒿汤

#### 4 结果与讨论

蒽醌类成分的检测波长通常用 254 nm, 实验中发现 254 nm 波长时, 杂质的干扰较大, 在 450 nm 时杂质干扰较小, 并能满足测定要求, 故选用 450 nm 为检测波长。

中药中所含的苷类成分在肠道菌群的作用下, 通常会转变为相应的苷元。蒽醌类糖苷在肠菌作用下亦可转化为其相应的苷元。有研究<sup>[6]</sup>表明给大鼠的灌胃样品无论是大黄游离蒽醌还是结合蒽醌提取物, 存在于大鼠血清中化学成分是相似的, 均以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚的游离形式为主, 故本文对大黄中结合蒽醌的含量测定以游离蒽醌的形式体现。

大黄经配伍后, 总蒽醌及结合蒽醌的量均有不同程度地降低, 游离蒽醌则降低较少, 而游离大黄酸在 9 种配伍中含量有所增加。推测是由于在煎煮过程中, 部分结合蒽醌水解成游离蒽醌从而使结合蒽醌类化合物降低较多。而游离蒽醌未呈现明显增加的趋势, 可能是由于成分间的相互影响; 游离大黄酸的增多是部分游离蒽醌的氧化之故。

新版方剂大辞典中大黄方多达七千余, 甘草与大黄的配伍机率达 35%, 位列第一, 而大黄与甘草配伍以等量用药为多。本实验选择大黄分别与生甘草和炙甘草等量配比; 另外还选择具有治疗慢性肾功能不全作用的复方大黄甘草汤<sup>[7]</sup> (大黄与生甘草 4:1 配伍) 进行研究比较。实验结果显示大黄与生甘草 1:1 配伍对大黄蒽醌类含量影响不大; 而大黄与甘草 4:1 配伍后总蒽醌含量则与大黄炙甘草组相当, 均显著降低。从药性上看, 大黄性寒苦泻, 以甘草之甘平缓和其苦寒峻下伤胃之弊; 从化学成分上看, 甘草中主要含有三萜、黄酮类成分, 各类成分的相互影响也使得蒽醌含量有所变化。

大黄与黄连配伍后, 蒽醌含量降低幅度最大, 这是由于碱性成分 (黄连中的盐酸小檗碱等) 对酸性成分 (大黄中的游离蒽醌类) 的影响<sup>[8]</sup>; 而泻心汤中蒽醌含量变化不大, 由于黄连生物碱对黄芩中黄酮类成分的影响远大于其对大黄游离蒽醌类的影响, 因为黄酮类的含量远大于游离蒽醌类, 黄连生物碱对黄酮类成分的反应选择性要大于其对大黄游离蒽

醌类的选择性。

木香主要含有挥发油, 主要为木香内酯类成分。大黄配伍木香后各游离蒽醌类均有所增加, 游离大黄酸增加幅度最大, 说明木香能增加大黄游离蒽醌的溶出, 或者增强结合蒽醌向游离蒽醌的转化。

茵陈蒿汤总蒽醌含量较大黄栀子组有明显降低, 主要由于茵陈蒿的加入使得游离蒽醌的降低幅度很大。说明配伍对茵陈蒿汤对主要成分的溶出有一定的影响, 各成分间可能存在一定的有效比例。

从上述讨论可以看出, 大黄与多数药物配伍之后总蒽醌类成分的含量都呈现不同程度的降低, 已有文献研究表明大黄蒽醌类成分具有潜在的肝肾毒性, 本实验初步推测大黄配伍后总蒽醌含量的减少可能对减轻大黄毒性有一定的作用。蒽醌含量变化与大黄潜在肝肾毒性的相关性有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of emodin feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2001, 493: 1.
- [2] 王青秀, 廖明阳, 吴纯启. 大黄及其主要成分的毒性毒理研究 [D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2007 届博士学位论文.
- [3] 张陆勇, 江振洲, 濮存海, 等. 大黄总蒽醌对大鼠灌胃给药的长期毒性研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25 (4): 206.
- [4] 孙玉琦, 肖小河. 大黄炮制与配伍的化学变化及生物活性表征 [D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2006 届硕士学位论文.
- [5] 曾元儿, 陈丰连, 喻良文. 大黄蒽醌类在大承气汤复方配伍中的量变规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (1): 6.
- [6] 邓翀, 吴怡, 孟宪丽, 等. 大黄抗内毒素有效组分血清药物化学研究 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24 (2): 33.
- [7] 张永利, 文小静. 大黄甘草汤为主治疗慢性肾功能衰竭疗效观察 [J]. 临床医药, 2005, 12: 64.
- [8] 冯有龙, 胡浩彬, 余伯阳. 泻心汤不同配伍情况下黄酮类、蒽醌类和生物碱类成分的含量比较 [J]. 中国天然药物, 2007, 5 (4): 281.