

HPLC 测定 2 种大黄中 4 类功效组分含量

刘娟, 魏胜利*, 刘春生*, 张媛
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:建立用高效液相色谱法快速测定 2 种大黄游离型蒽醌、结合型蒽醌、番泻苷、鞣质单体 4 类 14 种与功效紧密相关组分含量方法,为全面评价大黄药材质量提供依据。方法:采用高效液相色谱法测定,Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相Ⅰ:0.1% 磷酸水-甲醇梯度洗脱,流动相Ⅱ:四氢呋喃-水-冰醋酸(2:80:1.5)与乙腈梯度洗脱,流动相Ⅲ:0.5% 冰醋酸水-甲醇梯度洗脱;流速分别为 1.0,0.8,1.0 mL·min⁻¹,检测波长分别为 254,350,270 nm,柱温 25℃。结果:测定了两种大黄的 4 类功效组分含量,各组分均在 30 min 内均得到良好分离;不同成分在各自的线性范围内线性关系良好,平均回收率均在 97.09%~103.2%,RSD 均在 0.15%~3.0%(n=6)。结论:方法简便、准确、重复性好,可作为大黄全面质量控制。

[关键词] 大黄; 游离及结合型蒽醌; 番泻苷; 儿茶素; 没食子酸; 高效液相色谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0157-05
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0915.013.html>
[网络出版时间] 2012-10-12 9:15

Determination of Contents of Four Types of Active Constituents
in Rhei Radix ex Rhizoma by HPLC

LIU Juan, WEI Sheng-li*, LIU Chun-sheng*, ZHANG Yuan

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quantification methods for determination of four types of active constituents in two sorts of Rhei Radix ex Rhizoma by HPLC, including free anthraquinone, anthraquinone glycoside, sennoside, catechin and gallic acid, in order to evaluate the quality of Rhei Radix ex Rhizoma all-around. **Method:** HPLC was applied on the determination of four types of active constituents with Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). Mobile phase I was 0.1% phosphoric acid-methanol by gradient elution, mobile phase II was THF-water-acetic acid (2:80:1.5)-acetonitrile by gradient elution, and mobile phase III was 0.5% acetic acid-methanol by gradient elution; the three kinds of flow rate were 1.0, 0.8, 1.0 mL·min⁻¹; the wavelengths were set at 254, 350, 270 nm; the column temperature were all set at 25℃. **Result:** Determine of four types of active constituents in two different sorts of Rhei Radix ex Rhizoma. These components were separated completely within 30 minutes under this chromatographic condition. The average recoveries were from 97.09% to 103.2%, its relative standard deviations were from 0.15% to 3.0%(n=6). **Conclusion:** The methods with good reproducibility are simple and accurate; it can be used as quality control methods for Rhei Radix ex Rhizoma.

[Key words] Rhei Radix ex Rhizoma; free anthraquinone glycoside; sennoside; catechin; gallic acid; HPLC

[收稿日期] 20120728(005)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973880, 31170307);教育部留学回国人员科研启动基金;科技基础性工作专项重点项目(2007FY110600)
[第一作者] 刘娟, 硕士, 从事中药分子鉴定和分子生药学研究, Tel:010-57833359, E-mail:moonriver24@yahoo.cn
[通讯作者] * 魏胜利, 博士, 副教授, 从事中药资源学与分子生药学研究, Tel:13683336930, E-mail:ws17491@126.com;
* 刘春生, 博士, 教授, 从事药用植物与分子生药学研究, Tel:010-84738624, E-mail:max_liucs@263.net

大黄作为传统大宗药材有 3 个来源,分别是唐古特大黄、掌叶大黄、药用大黄的干燥根与根茎,具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀痛经、利湿退黄的功效^[1]。大黄主要包括游离及结合型蒽醌类成分、双蒽酮类成分及儿茶素与没食子酸^[2]。脂溶性比较强的游离蒽醌是具有抗菌、抗炎作用的主要活性成分^[3-4],水溶性比较强的结合型蒽醌及双蒽酮类成分是致泻的主要活性成分^[5-6],鞣质单体儿茶素及没食子酸是止血活血的主要活性成分^[7-8]。目前已有^[9]采用 HPLC 指纹图谱的方法对大黄多种有效成分进行测定,但存在测定时间长、所需对照品多、测定的指标成分往往只针对某类功效等问题。本文就是针对大黄 4 类与传统功效相关的关键成分,参考已有的报道^[10-16],探索一种少用对照品且快速测定这 4 类功效组分含量的方法,为大黄全面准确的质量评价提供依据。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(配有 G1314A 紫外检测器、1315B DAD 检测器、G1311A 四元梯度泵、G1322A 在线脱气装置、G1316A 柱温箱),Agilent 1100 化学工作站, Sartorius BS110S 1/万、BP211D 1/10 万电子分析天平, KL3120D 型超声清洗机, KQ-500DE 型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司), 0.45 μm 针筒式微孔滤膜过滤器, FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

供含量测定用的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品(供含量测定用,纯度 > 98%,批号分别为 110795-200605, 110757-200206, 110756-200110, 110796-201017, 110758-200610, 110878-200102)购自中国药品生物制品检定所;没食子酸、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B(供含量测定用,纯度 > 98%)购自成都普瑞法有限公司。高效液相用的甲醇、乙腈、四氢呋喃为色谱纯,水为屈臣氏蒸馏水,三氯甲烷、浓盐酸、甲醇、磷酸、碳酸氢钠、醋酸均为分析纯。

唐古特大黄、掌叶大黄均采于 2010 年,经北京中医药大学中药学院生药系魏胜利副教授鉴定为蓼科植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Reg(产自青海省泽库县和日乡,野生品)、掌叶大黄 *R. Palmatum* L.(产自四川省甘孜州康定县,栽培品)。将药材洗净切制后,于 40 ℃烘箱中烘干至恒重,粉碎,过 60 目筛,备用。

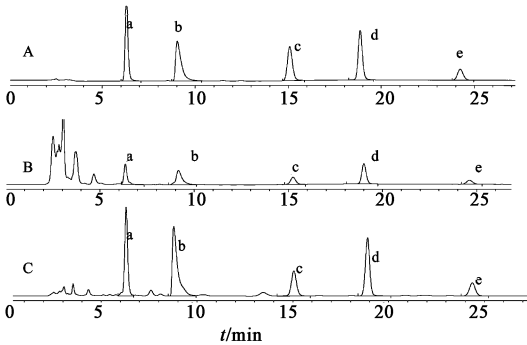
2 方法与结果

2.1 色谱条件的建立

2.1.1 蒽醌类成分的色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 液相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25 ℃,流动相 A 为 0.1% 磷酸水, B 为甲醇,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。梯度程序见表 1。在测定条件的选择上,根据文献报道,比较了多种流动相,结果所选系统分离效果较好,分离度较高,出峰时间稳定。见图 1。

表 1 流动相梯度条件

t/min	B 甲醇/%	流速/mL·min ⁻¹	检测波长/nm
0.0	80.0	1.0	254
10.0	80.0	1.0	254
15.0	85.0	1.0	254
30.0	85.0	1.0	254



A. 5 种混合对照品; B. 大黄样品 5 种游离蒽醌;
C. 大黄样品 5 种结合蒽醌; a. 芦荟大黄素;
b. 大黄酸; c. 大黄素; d. 大黄酚; e. 大黄素甲醚

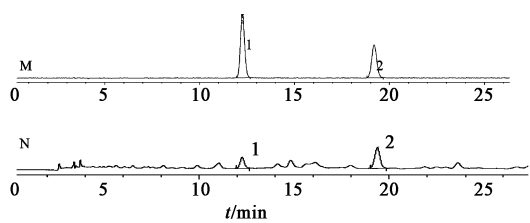
图 1 5 种游离蒽醌与结合蒽醌含量测定色谱

2.1.2 双蒽酮类成分的色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 液相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25 ℃,流动相 A 为四氢呋喃-水-冰醋酸(2:80:1.5), B 为乙腈,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 350 nm,进样量 10 μL。梯度程序见表 2。在测定条件的选择上,比较了多种流动相,结果所选系统分离效果较好,分离度较高,出峰时间稳定。见图 2。

表 2 流动相梯度条件

t/min	B 乙腈/%	流速/mL·min ⁻¹	检测波长/nm
0.0	15.0	0.8	350
30.0	20.0	0.8	350

2.1.3 儿茶素及没食子酸的色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 液相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25 ℃,流动相 A 为 0.5% 冰醋酸水, B 为



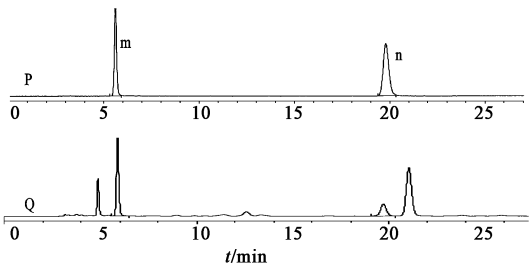
M. 番泻苷 A,B 对照品;N. 大黄样品;
1. 番泻苷 B; 2. 番泻苷 A

图2 番泻苷 A,B 含量测定色谱

甲醇,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 270 nm,进样量 10 μL。梯度程序见表 2。在测定条件的选择上,比较了多种流动相,结果所选系统分离效果较好,分离度较高,出峰时间稳定。见图 3。

表2 流动相梯度条件

t/min	B 甲醇/%	流速/mL·min ⁻¹	检测波长/nm
0.0	15.0	1.0	270
10.0	15.0	1.0	270
40.0	25.0	1.0	270



P. 没食子酸、儿茶素对照品;Q. 大黄样品;
m. 没食子酸;n. 儿茶素

图3 没食子酸、儿茶素含量测定

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,用甲醇分别配成 20.00,18.24,15.04,18.88,8.16 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液 1 和 360.00,180.00,220.00,360.00,200.00 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液 2。

精密称取番泻苷 A、番泻苷 B 对照品适量,用 0.1% NaHCO₃ 溶液制成含番泻苷 A 为 78.00 g·L⁻¹,番泻苷 B 为 96.00 g·L⁻¹ 的对照品溶液 3。

精密称取儿茶素、没食子酸对照品适量,用 30% 甲醇配成质量浓度分别为 68.14,13.41 g·L⁻¹ 混合对照品 4 和质量浓度为 30.60,28.11 g·L⁻¹ 混合对照品 5。

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 蒽醌类成分样品溶液的制备 取药材粉末 0.20 g,精密称定,置于 50 mL 具塞三角瓶,精密加入甲醇溶液 50 mL,精密称定质量,超声提取

30 min,取出,放冷,称质量,用甲醇溶液补足减失质量,混匀,过滤,残留物再用甲醇 5 mL 洗涤 2 次,合并滤液。滤液蒸干,加入 10 mL 水使之溶解,分别用 10 mL 三氯甲烷萃取 3 次,合并萃取后的三氯甲烷,蒸干,加入 5 mL 甲醇溶解定容,用微孔滤膜过滤,即得游离型蒽醌的供试品溶液。余下水层加浓盐酸 1.0 mL 和三氯甲烷 10 mL 在 70~80 ℃ 的水浴中回流水解 2 h,冷却后取三氯甲烷层。水层再分别用 10 mL 氯仿萃取 3 次,合并氯仿萃取液,蒸干,加入 5 mL 甲醇溶解定容,用微孔滤膜过滤,即得结合型蒽醌的供试品溶液。

2.3.2 双蒽酮类成分样品溶液的制备 取药材粉末 0.1 g,精密称定,置于 50 mL 三角瓶,精密加入 0.1% NaHCO₃ 溶液 25 mL,精密称定质量,超声提取 30 min,取出,放冷,称质量,用 0.1% NaHCO₃ 溶液补足减失质量,混匀,滤过,取续滤液,即为蒽酮类成分的供试品溶液。

2.3.3 儿茶素及没食子酸样品溶液的制备 取药材粉末 0.1 g,精密称定,置于 50 mL 三角瓶,精密加入 30% 甲醇溶液 20 mL,精密称定质量,密塞,称质量,摇匀,静置浸提 15 h 后,超声提取 20 min,取出,放冷,称质量,用 30% 甲醇溶液补足减失质量,混匀,滤过,取续滤液,即为儿茶素及没食子酸的供试品溶液。

2.4 线性关系考察

2.4.1 蒽醌类成分线性关系的考察 在预设的色谱条件下,对照品溶液 1 稀释 4 倍进样 3 μL,对照品溶液 1 稀释 2 倍进样 2,3,5 μL,混合对照品溶液 1 进样 3,5,10,15,20 μL,混合对照品溶液 2 进样 3,5,10,15 μL 记录各自的峰面积,以峰面积积分为纵坐标(Y),对照品进样量(μg)为横坐标(X),绘制标准曲线,回归方程见表 3。

表3 回归方程与线性范围(n=10)

测定成分	回归方程	r	线性范围 /μg
芦荟大黄素	Y=4 943.4X+35.459	0.999 6	0.015~5.4
大黄酸	Y=5 464.7X-84.56	0.999 5	0.014~2.7
大黄素	Y=4 435.0X+10.052	0.999 8	0.11~3.3
大黄酚	Y=5 170.9X-37.414	0.999 4	0.014~5.4
大黄素甲醚	Y=3 167.5X-12.006	0.999 6	0.006 1~3.0

2.4.2 双蒽酮类成分线性关系的考察 在预设的色谱条件下,对照品溶液 3 稀释 10 倍进样 3,5 μL,对照品溶液 3 进样 1,3,5,10,20 μL,分别记录各自

的峰面积,以峰面积积分值为纵坐标(Y),对照品进样量(μg)为横坐标(X),绘制标准曲线。其回归方程为 $Y_{\text{番泻苷 A}} = 864.47X - 2.5209 (r = 1)$,线性范围为 $0.023 \sim 1.6 \mu\text{g}$; $Y_{\text{番泻苷 B}} = 1059.5X - 0.777 (r = 1)$,线性范围为 $0.029 \sim 1.9 \mu\text{g}$ 。

2.4.3 儿茶素类成分线性关系的考察 在预设的色谱条件下,将对照品 **4** 溶液稀释 30 倍,进样 $3 \mu\text{L}$;将对照品 **4** 溶液稀释 10 倍,进样 $5 \mu\text{L}$;对照品 **4** 溶液进样 3,5,10,15,20,30 μL ;混合对照品 **5** 溶液进样 20 μL 。记录各自的峰面积,计算求回归方程,以峰面积 - 进样量(μg)作曲线。其回归方程为: $Y_{\text{没食子酸}} = 3300.8X - 30.586 (r = 0.9967)$,线性范围为 $0.0013 \sim 0.57 \mu\text{g}$; $Y_{\text{儿茶素}} = 502.56X + 0.6769 (r = 0.9999)$,线性范围为 $0.013 \sim 3.8 \mu\text{g}$ 。

2.5 精密度考察 取对照品溶液 **1,2,3**,按色谱条件,重复进针 5 次,测定峰面积,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、番泻苷 A、番泻苷 B、没食子酸、儿茶素的 RSD 分别为 1.5%, 2.0%, 1.4%, 1.6%, 1.5%, 0.088%, 0.42%, 0.89%, 0.74%,说明仪器的精密度良好。

2.6 重复性考察 分别按 **2.3** 供试品制备的方法,精密称取同一样品 5 份按供试品的制备方法制备样品,记录芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、番泻苷 A 和 B、儿茶素、没食子酸的峰面积,计算 RSD 分别为 2.1%, 1.3%, 1.8%, 2.0%, 2.0%, 0.25%, 0.49%, 0.18%, 1.8%,该方法重复性良好。

2.7 稳定性考察 精密称取样品,按上述供试品溶液制备方法制备,进样 $10 \mu\text{L}$,蒽醌类成分分别于 0, 3,6,12,24 h,测定 5 种蒽醌色谱峰面积,其 RSD 均 $<5\%$,说明样品常温放置在 24 h 内基本稳定;番泻苷 A 和 B、没食子酸、儿茶素分别于 0,2,4,6,8, 12 h,测定色谱峰面积,计算 RSD 均 $<5\%$,说明样品常温放置在 12 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率 采用加样回收法,取已知含量的大黄样品,精密称取 6 份,精密加入相应标准品后按样品提取方法提取并测定含量,计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、番泻苷 A、番泻苷 B、没食子酸、儿茶素平均回收率与 RSD,结果见表 5。

2.9 样品含量测定 按 **2.3** 样品溶液的制备方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,分别进样 $10 \mu\text{L}$,同时取相应浓度的对照品溶液 $10 \mu\text{L}$ 进样测定,按外标法分别测定两种大黄样品游离及结合蒽

醌类、双蒽酮类与儿茶素和没食子酸的含量,平行进样 3 次,RSD 均 $<3\%$ 。含测结果见表 6~7。

表 5 加样回收率测定($n = 6$)		
成分	平均回收率	RSD
芦荟大黄素	99.03	1.5
大黄酸	103.2	2.4
大黄素	101.4	1.4
大黄酚	101.6	1.4
大黄素甲醚	97.09	2.7
番泻苷 A	99.90	0.15
番泻苷 B	99.91	0.60
没食子酸	102.5	3.0
儿茶素	100.6	2.4

表 6 样品游离型及结合型蒽醌含量 %					
蒽醌种类	编号	游离型	RSD	结合型	RSD
芦荟大黄素	1	0.0092	2.2	0.44	2.1
	2	0.025	0.93	0.36	1.1
大黄酸	1	0.027	1.6	0.71	1.8
	2	0.020	1.8	0.18	0.96
大黄素	1	0.019	1.3	0.19	1.9
	2	0.035	0.68	0.23	0.72
大黄酚	1	0.023	0.99	0.38	1.5
	2	0.055	0.25	0.53	0.95
大黄素甲醚	1	0.0090	3.0	0.048	3.0
	2	0.015	2.1	0.12	1.2

表 7 样品番泻苷 A,B,没食子酸,儿茶素含量 %			
成分	编号	含量	RSD
番泻苷 A	1	2.2	1.1
	2	0.60	1.8
番泻苷 B	1	0.81	0.81
	2	0.25	0.25
没食子酸	1	0.060	1.8
	2	0.036	2.4
儿茶素	1	3.6	0.7
	2	2.5	2.8

3 讨论

本文在参考文献报道^[10-16]的基础上,比较了多种流动相系统及提取方法,其所选的流动相体系分离度好、重复性高,所选的提取方法较为简便,且能够在 30 min 内完成 14 种四大类功效成分的含量测定。此外,芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-

葡萄糖苷等5种蒽醌糖苷类成分具有明显的泻下药理活性^[17-19],对其进行定量分析对于综合评价大黄在泻下攻积功效具有重要参考价值。由于蒽醌苷类成分由于极性大,难以分离纯化对照品,市面也很难买到对照品,本研究使用经典的酸水解法测定结合蒽醌,实现了在不使用5种蒽醌苷对照品的前提下对5种结合蒽醌类成分的间接含量测定。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:22.
- [2] 刘娟,魏胜利,刘春生. 大黄药效成分及其药理活性研究进展[C]. 青岛:中华中医药学会第十届中药鉴定学术会议,2010:374.
- [3] AGARWALSK, SINGH S S, VERMA S, et al. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from rheum emodi [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72(1/2):43.
- [4] WANG J, ZHAO H, KONG W, et al. Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis* [J]. Phytomedicine, 2010, 17(8/9):684.
- [5] 林永成. 大黄治热结便秘的机理研究[J]. 中山大学学报, 1996, 35(2):75.
- [6] 闫美娟,隋峰,林娜. 大黄调节胃肠功能的作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4):181.
- [7] 庄江能. 大黄的主要成分及其临床药理研究进展[J]. 西南军医, 2009, 11(5):931.
- [8] Kosuge T, Ishida H. Studies on active substances in the herbs used for oketsu ('stagnant blood') in Chinese medicine. IV. On the anticoagulative principle in Rhei Rhizoma[J]. Chem Pharm Bul, 1985, 33:1503.
- [9] Katsuko KoMATSU, Yorinobu NAGAYAMA, Ken TANAKA, et al. Development of a high performance liquid chromatographic method for systematic quantitative analysis of chemical constituents in rhubarb [J]. Chem Pharm Bul, 2006, 54(7):941.
- [10] 王钰莹,冯伟红,杨菲,等. “一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2):212.
- [11] 张丹,蒋心惠. 反相高效液相色谱法测定大黄药材中游离及结合型蒽醌类衍生物的含量[J]. 分析化学, 2003, 31(4):459.
- [12] 王云,李丽,张村,等. 大黄5种饮片中没食子酸和儿茶素的含量比较研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17):2267.
- [13] 孙佩,李敏,杨小多,等. HPLC法测定大黄药材和饮片中番泻苷A和番泻苷B的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2008, 31(3):51.
- [14] Xiao-Yan Gao, Jian-qiu Lub, Peng-Fei Tua, et al. One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection[J]. J Chromatography A, 2009, 1216:2118.
- [15] Wei Jin, Peng-Fei Tu. Preparative isolation and purification of trans-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-O-β-D-glucopyranoside and (+) catechin from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. using high-speed counter-current chromatography by stepwise elution and stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase [J]. J Chromatography A, 2005, 1092:241.
- [16] 大岛俊幸,平山总良,王珂,等. 高效液相色谱法测定何首乌和夜交藤蒽醌成分的含量[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(4):219.
- [17] 李曼玲,李铁林,冯伟红,等. 含大黄复方制剂中没食子酸的定性定量方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(6):12.
- [18] 王家葵,李傲,王慧,等. 正品大黄不同品种间泻下效价强度比较研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1978.
- [19] 魏凤玲,常明,原国强. 大黄中结合蒽醌的致泻作用及药动学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(6):53.

[责任编辑 邹晓翠]