

HPLC 法同时测定大黄中芦荟大黄素等 11 种成分的量

毛春芳¹, 施忠², 罗琳³, 候金燕⁴, 窦志华^{2*}, 陈智娴¹, 陈霞², 乔进²

1. 江苏省南通卫生高等职业技术学校, 江苏 南通 226007

2. 南通大学附属南通第三医院, 江苏 南通 226006

3. 南通大学, 江苏 南通 226001

4. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定大黄中 5 种游离型蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚)、4 种结合型蒽醌(芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷和大黄素-8-*O*-葡萄糖苷)及没食子酸、儿茶素共计 11 种成分的定量方法。方法 采用 Symmetry C₁₈ 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1%磷酸水梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 254 nm。结果 没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚分别在 0.062 4~1.560 0、0.180 0~4.500 0、0.041 2~1.030 0、0.030 6~0.765 0、0.051 0~1.275 0、0.028 8~0.720 0、0.019 8~0.495 0、0.050 5~1.262 5、0.063 7~1.592 5、0.098 0~2.450 0 和 0.163 0~4.075 0 μg 进样量与峰面积积分值线性关系良好($r \geq 0.999 5$), 平均加样回收率为 95.37%~98.93%, RSD<2.36%。结论 该法简便、准确、专属性强, 可用于大黄中 11 种成分的测定。

关键词: 大黄; 游离型蒽醌; 结合型蒽醌; 没食子酸; 儿茶素; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)16-2400-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.023

Simultaneous determination of 11 constituents in *Rhei Radix et Rhizoma* by HPLC

MAO Chun-fang¹, SHI Zhong², LUO Lin³, HOU Jin-yan⁴, DOU Zhi-hua², CHEN Zhi-xian¹, CHEN Xia², QIAO Jin²

1. Nantong Health College of Jiangsu Province, Nantong 226007, China

2. Third Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China

3. Nantong University, Nantong 226001, China

4. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of five free anthraquinones (aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion), four bound anthraquinones (aloe-emodin-8-*O*-glucopyranoside, emodin-1-glucoside, chrysophanol-1-glucoside, and emodin-8-glucoside), gallic acid, and catechin in *Rhei Radix et Rhizome*. **Methods** The analysis was achieved with a Symmetry C₁₈ column by gradient elution of methanol-0.1% phosphoric acid in water at 30 ℃. The flow rate was 1 mL/min, and the detection wavelength was set at 254 nm. **Results** The calibration curves of all eleven constituents showed good linearity ($r \geq 0.999 5$) in a relatively wide concentration range. The linear ranges of gallic acid, catechin, aloe-emodin-8-*O*-glucopyranoside, emodin-1-*O*-glucoside, chrysophanol-1-*O*-glucoside, emodin-8-*O*-glucoside, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion were 0.062 4—1.560 0, 0.180 0—4.500 0, 0.041 2—1.030 0, 0.030 6—0.765 0, 0.051 0—1.275 0, 0.028 8—0.720 0, 0.019 8—0.495 0, 0.050 5—1.262 5, 0.063 7—1.592 5, 0.098 0—2.450 0, and 0.163 0—4.075 0 μg ($r \geq 0.999 5$), respectively. The mean recovery of these eleven components was 95.37%—98.93%, RSD < 2.36%. **Conclusion** This method is simple, accurate, and specific, and can be used for the determination of eleven constituents in *Rhei Radix et Rhizome*.

Key words: *Rhei Radix et Rhizome*; free anthraquinone; bound anthraquinone; gallic acid; catechin; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 江苏省第 4 期“333 工程”资助科研项目(BRA2013090); 江苏省中医药局科技项目(LZ13168); 江苏省南通市应用研究计划项目(BK2013013)

作者简介: 毛春芳, 女, 副教授, 主要从事中药药效物质基础研究。Tel: (0513)85228514 E-mail: ntmcf@163.com

*通信作者 窦志华, 博士, 主任中药师, 硕士生导师。Tel: (0513)85116027 E-mail: zhihuadou@163.com

大黄为蓼科植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.、掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎。大黄主要含有蒽醌类、鞣质类、二苯乙烯类、苯丁酮类等多种化学成分,其中蒽醌类成分又分单蒽核类和双蒽核类,单蒽核类中游离型占 10%~20%,研究最多的有芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚等 5 种,双蒽核类有番泻苷 A~D 等^[1]。大黄中所有化学成分几乎均具有多种药理活性^[2-3],但目前的大部分研究仅围绕上述 5 种游离型蒽醌类成分,总蒽醌的测定也是基于酸解后这 5 种游离型蒽醌类的总和,《中国药典》2010 年版对该药材的质量控制也是如此^[4]。目前分别见有同时测定大黄中上述 5 个游离型蒽醌和番泻苷 A、番泻苷 B 量及这 7 个成分加没食子酸、儿茶素合计 9 种成分量的报道等^[5-6],但测定结合型蒽醌量的报道较少。本研究建立了 HPLC 法同时测定大黄中 5 种游离型蒽醌、4 种结合型蒽醌及没食子酸、儿茶素共计 11 种成分量的方法,旨在为较客观评价大黄药材的质量及其药效物质基础研究提供参考。

1 仪器与试药

Waters Alliance 高效液相色谱系统,包括 e2695 分离单元、2998 二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);SK5200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);Sartorius BT 25S 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

对照品没食子酸(批号 110831-201204,质量分数 89.9%)、儿茶素(批号 110877-201203,质量分数 97.2%)、芦荟大黄素(批号 110795-201007,质量分数 98%)、大黄酸(批号 110757-200206,质量分数≥98%)、大黄素(批号 110756-200110,质量分数≥98%)、大黄酚(批号 110796-201118,质量分数 99.5%)、大黄素甲醚(批号 110758-201013,质量分数 99.8%)购自中国食品药品检定研究院,芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(批号 2012072301,质量分数≥98%)、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷(批号 2012072301,质量分数≥98%)、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷(批号 2012072301,质量分数≥98%)、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(批号 2012072301,质量分数≥98%)购自鼎瑞化工(上海)有限公司。

大黄药材(1号,批号 121249-201003)购自中国食品药品检定研究院,大黄药材(2号,批号 130703)购自南通三越中药饮片公司,大黄饮片(3~

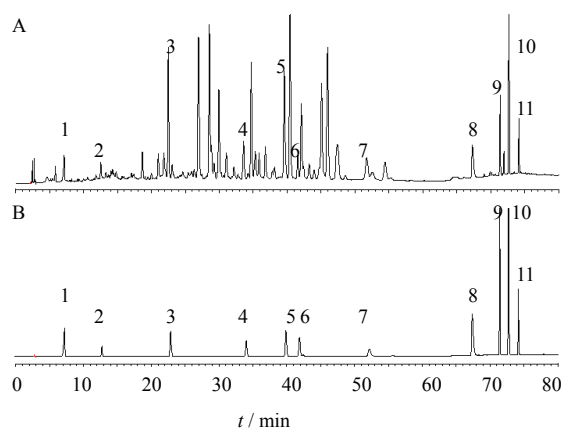
12号)购自江苏省内 10 家医院中药房,经南通市药品检验所龚旭东主任中药师鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.。

甲醇均为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱:0~10 min, 5%~30% A; 10~40 min, 30%~60% A; 40~60 min, 60% A; 60~70 min: 60%~100% A; 70~80 min, 100% A。体积流量 1 mL/min;柱温 30 °C;检测波长 254 nm。以上色谱条件下的样品及混合对照品色谱图见图 1。



1-没食子酸 2-儿茶素 3-芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 4-大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 5-大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷 6-大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 7-芦荟大黄素 8-大黄酸 9-大黄素 10-大黄酚 11-大黄素甲醚
1-gallic acid 2-catechin 3-aloe-emodin-8-*O*-glucopyranoside 4-emodin-1-*O*-glucoside 5-chrysophanol-1-*O*-glucoside 6-emodin-8-*O*-glucoside 7-aloe-emodin 8-rhein 9-emodin 10-chrysophanol 11-phycion

图 1 样品(A)及混合对照品(B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of sample (A) and mixed reference substances (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取没食子酸 5.20 mg、儿茶素 9.00 mg、大黄酚 4.90 mg、大黄素甲醚 8.15 mg 分别置 5 mL 量瓶中,芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 1.03 mg、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 1.02 mg、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷 2.04 mg、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 1.92 mg、芦荟大黄素 1.98 mg、大黄酸 2.02 mg、大黄素 1.96 mg,分别置 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,分别配成 11 个对照品储备液。精密吸取儿茶素、大黄酚、大黄素甲醚储备液各

1 mL, 芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷储备液 0.8 mL, 大黄素储备液 0.65 mL, 没食子酸、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷储备液各 0.6 mL, 大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酸储备液各 0.5 mL, 大黄素-8-*O*-葡萄糖苷储备液 0.3 mL, 芦荟大黄素 0.2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成混合对照品溶液。将上述对照品储备液、混合对照品溶液于 4 °C 保存, 备用。

2.2.2 供试品溶液制备 取样品粉末(过 3 号筛)

各约 0.5 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入甲醇 24 mL, 超声提取 30 min, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20、25 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定其峰面积值, 以峰面积(*Y*)对进样量(*X*)进行回归处理, 得 11 种成分的回归方程及线性范围, 见表 1。

表 1 11 种成分回归方程及线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of 11 constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / μg
没食子酸	$Y=1.55 \times 10^6 X - 5.79 \times 10^4$	0.999 5	0.062 4~1.560 0
儿茶素	$Y=1.49 \times 10^5 X - 1.33 \times 10^4$	0.999 8	0.180 0~4.500 0
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=2.14 \times 10^6 X - 4.48 \times 10^4$	0.999 9	0.041 2~1.030 0
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=2.13 \times 10^6 X - 3.37 \times 10^4$	0.999 9	0.030 6~0.765 0
大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=2.13 \times 10^6 X - 6.42 \times 10^4$	0.999 9	0.051 0~1.275 0
大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1.86 \times 10^6 X - 3.21 \times 10^4$	0.999 9	0.028 8~0.720 0
芦荟大黄素	$Y=2.75 \times 10^6 X - 3.53 \times 10^4$	0.999 9	0.019 8~0.495 0
大黄酸	$Y=4.34 \times 10^6 X - 1.31 \times 10^5$	0.999 9	0.050 5~1.262 5
大黄素	$Y=4.57 \times 10^6 X - 1.58 \times 10^5$	0.999 9	0.063 7~1.592 5
大黄酚	$Y=4.55 \times 10^6 X - 2.31 \times 10^5$	0.999 9	0.098 0~2.450 0
大黄素甲醚	$Y=6.95 \times 10^5 X - 6.33 \times 10^4$	0.999 9	0.163 0~4.075 0

2.3.2 精密度试验 精密吸取 7 号样品供试品溶液 10 μL 连续进样 6 次, 记录没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积积分值, 计算 RSD, 分别为 0.86%、1.73%、3.59%、4.20%、4.10%、2.10%、3.32%、0.66%、2.11%、0.32%和 0.26%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取 7 号样品供试品溶液 10 μL, 分别于制备后的 0、3、6、9、12、24 h 进样测定, 记录没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积积分值, 计算 RSD, 分别为 1.61%、1.58%、4.48%、4.37%、4.29%、4.62%、3.61%、1.48%、2.05%、0.50%和 1.28%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 称取 7 号样品粉末(过 3 号筛)各约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.2”项方法制备 6 份

供试品溶液, 进样分析, 计算没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均质量分数的 RSD, 结果分别为 4.83%、4.05%、4.11%、3.78%、4.23%、4.55%、3.81%、4.05%、4.27%、3.63%和 3.44%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.5 回收率试验 称取 7 号样品粉末(过 3 号筛)各约 0.1 g 6 份, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 分别精密添加一定体积 11 种对照品储备液, 加甲醇至 9.5 mL, 按“2.2.2”项下方法制成 10 mL 供试品溶液, 测定并计算各成分的加样回收率以及 RSD。结果没食子酸、儿茶素、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的平均回收率分别为 97.38%、96.43%、95.74%、96.42%、96.38%、96.92%、96.08%、96.91%、98.93%、95.52%和 95.37%, RSD 分别为 2.08%、2.17%、1.09%、0.91%、0.43%、1.50%、1.79%、

2.36%、1.08%、1.49%和 1.82%。

2.4 样品测定

分别精密吸取 1~12 号样品供试品溶液 10

μL, 注入高效液相色谱仪, 测定各成分峰面积, 代入回归方程, 计算各成分在样品中的质量分数。结果见表 2。

表 2 12 批大黄样品中 11 种成分的测定结果

Table 2 Determination of 11 constituents in 12 batches of *Rhei Radix et Rhizome*

样品 编号	质量分数 / (mg·g ⁻¹)										
	没食 子酸	儿茶素	芦荟大黄素-8- O-葡萄糖苷	大黄素-1-O- 葡萄糖苷	大黄酚-1-O- 葡萄糖苷	大黄素-8-O- 葡萄糖苷	芦荟大 黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素 甲醚
1	0.534	22.984	7.833	1.737	4.553	1.385	0.566	0.446	0.330	0.841	1.465
2	1.008	3.132	3.445	1.266	3.175	6.302	0.394	0.773	0.777	1.768	2.535
3	6.246	9.408	0.513	0.254	0.627	1.763	2.920	4.263	2.846	8.869	9.880
4	3.217	5.456	2.188	1.109	3.049	1.813	1.550	0.628	1.192	8.736	12.979
5	3.351	8.229	0.679	0.505	0.739	2.028	1.555	1.907	1.551	4.779	4.763
6	4.297	5.396	0.518	0.359	0.728	1.746	1.812	2.119	1.690	7.135	7.757
7	3.020	6.184	0.777	0.548	1.001	2.659	1.207	1.670	1.412	4.002	3.719
8	4.642	5.978	0.508	0.290	0.773	1.059	2.780	3.158	2.715	8.971	11.007
9	4.761	10.315	0.863	0.595	1.126	1.132	2.149	3.542	2.425	7.239	8.268
10	2.348	5.451	0.564	0.368	0.704	2.106	0.721	1.192	1.123	2.843	2.849
11	3.500	4.660	0.385	0.344	0.539	1.680	1.616	1.900	1.706	6.916	7.850
12	4.062	5.367	0.570	0.357	0.800	0.566	2.494	2.289	2.088	9.132	9.723

3 讨论

以 11 种成分的提取率为指标, 考察了甲醇和乙醇两种提取溶剂, 结果表明前者优于后者; 考察了甲醇超声和回流 2 种提取方法, 结果表明两者无明显差异; 考察了甲醇超声提取 30、45、60 min 3 种提取时间, 结果表明三者也无明显差异。故提取方法最终确定为甲醇超声 30 min。

供试品溶液制备方法为称样量 0.5 g 定容至 25 mL, 按回收率试验应该称取 0.25 g 样品加含量相当的对照品储备液定容至 25 mL, 考虑到对照品比较昂贵, 所以称样量减至 0.1 g, 定容体积相应减少为 10 mL, 实际两者是一致的。

从测定结果看, 1 号和 2 号样品 (均为药材) 游离型蒽醌量占总蒽醌量的比例分别为 19.04% 和 30.57%, 较其他 10 批样品 (均为饮片, 游离型蒽醌量占总蒽醌量的比例在 69.99%~91.82%) 的比例明显偏低, 这与前期本课题组对分别以大黄药材和饮片组成的茵陈蒿汤中蒽醌类成分的测定结果一致^[7], 另有文献报道, 与生大黄相比, 熟大黄和大黄炭游离型蒽醌总量分别增加了 75% 和 46%^[8], 其原因可能是饮片生产特别是浸润过程中导致部分结合型蒽醌水解为游离型。游离型蒽醌极性较小, 难溶于水,

而中药基本采用水煎煮服用, 在总蒽醌量相近的情况下, 游离型蒽醌占比偏高可能会影响疗效。而目前《中国药典》2010 年版对大黄的质量控制主要是测定总蒽醌的量^[4], 建议增加游离型蒽醌的测定。

参考文献

- [1] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [2] 谭玉柱, 童婷婷, 赵高琼, 等. 基于一测多评法对大地上部位提取物的质量控制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1190-1194.
- [3] 乔振奎, 张卓然, 田立志, 等. 大黄素对犬自体肾移植缺血再灌注损伤的保护作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 131-134.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [5] 王 哲, 许利嘉, 何春年, 等. HPLC 测定不同来源大黄中蒽醌和二蒽酮类成分 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1114-1118.
- [6] 程小丽, 魏胜利, 刘春生, 等. RP-HPLC-DAD 同时测定大黄中 9 种有效成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 99-102.
- [7] 葛建华, 窦志华, 罗 琳, 等. 高效液相色谱法测定茵陈蒿汤中 5 种蒽醌类成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(7): 590-592.
- [8] 李 丽, 肖永庆. 大黄饮片炮制前后物质基础变化规律研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 803-813.