

HPLC-UV 与 HPLC-FLED 对比分析大黄药材中蒽醌类成分的含量

冯素香*, 李晓玉, 周悌强, 白燕, 吴兆宇, 王蒙蒙, 李建生
(河南中医学院呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046)

[摘要] 目的:比较 HPLC-UV 与 HPLC-FLED 测定大黄药材中 5 种蒽醌苷元的含量。方法:采用 HPLC-UV 和 HPLC-FLED 测定, Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(80:20), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 紫外检测波长 254 nm, 荧光检测器激发波长 435 nm, 发射波长 515 nm。结果:紫外检测器下芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量在 14.64~146.40, 39.0~390.4, 36.8~368.0, 17.0~170.4, 19.2~192.0 ng 与其峰面积呈良好线性关系, 相关系数分别为 0.999 7, 0.999 7, 0.999 4, 0.999 4, 0.999 4; 荧光检测器下芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量在 3.7~292.8, 9.8~780.8, 9.2~736.0, 4.3~340.8, 4.8~384.0 ng 与其峰面积呈良好线性关系, 相关系数分别为 0.999 4, 0.999 5, 0.999 4, 0.999 7, 0.999 6。紫外检测器的检测限(LOD)分别为 0.32, 0.84, 0.61, 1.28, 2.88 ng, 定量限(LOQ)为 1.05, 2.79, 2.04, 4.26, 9.60 ng; 荧光检测器的检测限(LOD)为 0.03, 0.12, 0.18, 0.09, 0.07 ng, 定量限(LOQ)为 0.09, 0.39, 0.61, 0.28, 0.24 ng。结论:HPLC-荧光检测法比 HPLC-紫外检测法方法简单准确, 无干扰, 更适合大黄药材的含量测定及其质量标准的建立。

[关键词] 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 高效液相色谱-紫外检测; 高效液相色谱-荧光检测

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0070-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030070

Comparison on Determination of Five Anthraquinones in Chinese Rhubarb by HPLC-UV and HPLC-FLED
FENG Su-xiang*, LI Xiao-yu, ZHOU Ti-qiang, BAI Yan, WU Zhao-yu, WANG Meng-meng, LI Jian-sheng
(Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** Using HPLC-UV and HPLC-FLED methods to determine the content of five anthraquinones in Chinese rhubarb. **Method:** HPLC-UV and HPLC-FLED were used to determine the concentrations of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion in the rhubarb. The separation was performed on a Venusil XBP-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with methanol-0.1% phosphoric acid (80:20) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength for UV detector was 254 nm. The excitation wavelength and emission wavelength for fluorescence detector were 435 nm and 515 nm, respectively. **Result:** Aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion determined by HPLC-UV were in good linearity over the ranges of 14.6-146.4 ng ($r = 0.999 7$), 39.0-390.4 ng ($r = 0.999 7$), 36.8-368.0 ng ($r = 0.999 4$), 17.0-170.4 ng ($r = 0.999 4$), and 19.2-192.0 ng ($r = 0.999 4$), respectively, and that determined by HPLC-FLED were in good linearity over the ranges of 3.7-292.8 ($r = 0.999 4$), 9.8-780.8 ($r = 0.999 5$), 9.2-736.0 ($r = 0.999 4$), 4.3-340.8 ($r = 0.999 7$), and 4.8-384.0 ng ($r = 0.999 6$), respectively. Under UV detector, the limits of detection (LOD) were 0.32, 0.84, 0.61, 1.28, 2.88 ng, respectively, the limits of quantification (LOQ) were 1.05, 2.79, 2.04, 4.26, 9.60 ng, respectively. Under fluorescence detector, the limits of detection (LOD) were 0.03, 0.12, 0.18, 0.09, 0.07 ng, respectively, the limits of quantification (LOQ) were 0.09, 0.39, 0.61, 0.28, 0.24 ng, respectively. **Conclusion:** HPLC-FLED without interference from endogenous substances is simpler and more accurate than HPLC-UV, and it is more

[收稿日期] 20140704(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81130062)

[通讯作者] * 冯素香, 博士, 副教授, 从事中药质量分析与新药研究, Tel: 13526403080, E-mail: fengsx221@163.com

suitable for quantitative determination and quality control of Chinese rhubarb.

[Key words] rhubarb; anthraquinone; HPLC-UV; HPLC-FLED

大黄为蓼科植物掌叶大黄、唐古特大黄或药用大黄的干燥根及根茎,是临床常用的泻下药^[1],具有攻积导滞、活血化瘀、泻火凉血及利胆退黄等功效^[2],其主要有效成分为蒽醌类化合物,因此大黄药材的质量控制多以蒽醌类化合物的含量为标准^[3],目前文献报道中多采用 HPLC-UV 法对大黄药材中所含 5 种蒽醌类成分的含量进行测定^[4-7],而大黄药材中 5 种苷元(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)均为蒽醌结构化合物,结构上的特异性导致其具有较强的荧光性质。因此本研究采用 HPLC-荧光-紫外检测法测定大黄药材中 5 种蒽醌苷元的含量,比较 HPLC-荧光检测法和 HPLC-紫外检测法的含量测定结果,从而选择更加准确、有效的检测法,为大黄药材的含量测定提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 e2695 型高效液相色谱仪(包括 2998 型紫外检测器,2475 型荧光检测器,美国 Waters),XS105 型电子分析天平(瑞士梅特勒仪器有限公司)。

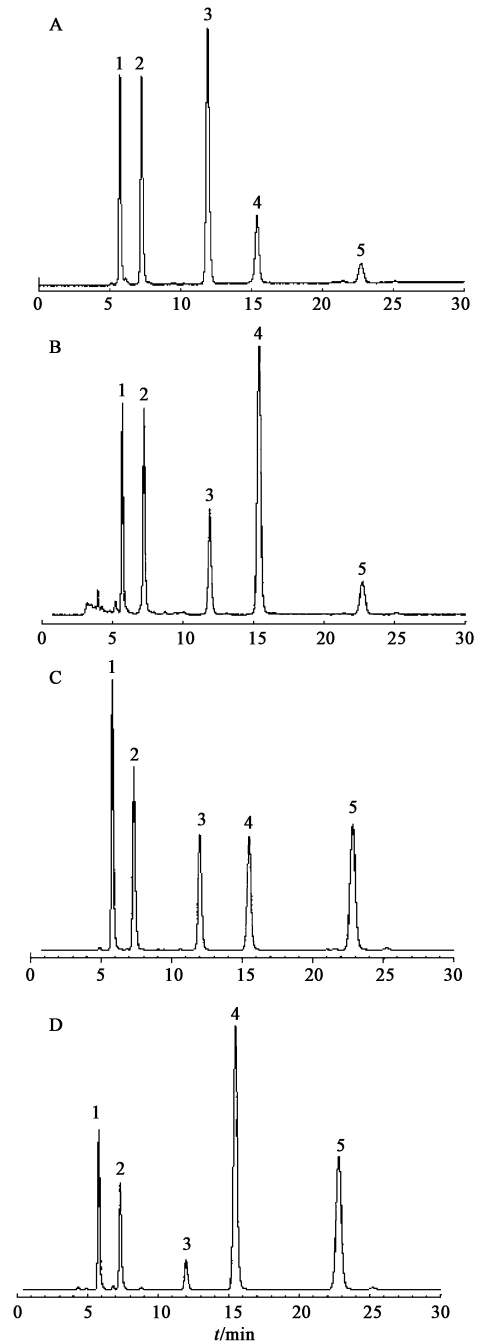
1.2 试药 芦荟大黄素(批号 110795-201007)、大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄酚(批号 110796-201118)、大黄素甲醚(批号 110758-201013)对照品均购自中国食品药品检定研究院。大黄药材采自四川,由河南中医学院药学院陈随清教授鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum*。甲醇(色谱纯, Fisher Scientific),磷酸(色谱纯, Grace Company INC),娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液(80:20),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,紫外检测波长 254 nm,荧光检测器的激发波长 435 nm,发射波长 515 nm。

2.2 对照品溶液的制备 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,精密称定,用甲醇溶解并定容,制得混合对照溶液(每 1 mL 中含芦荟大黄素 7.32 μg,大黄酸 19.52 μg,大黄素 18.4 μg,大黄酚 8.52 μg,含大黄素甲醚 9.6 μg)。

2.3 供试品溶液的制备 取大黄药材粉末(过 40 目筛)约 0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续



1. 芦荟大黄素;2. 大黄酸;3. 大黄素;4. 大黄酚;5. 大黄素甲醚
A, C. 对照品;B, D. 大黄样品

图 1 大黄样品 HPLC-UV(A, B) 和 HPLC-FLED(C, D) 色谱
Fig. 1 HPLC-UV chromatograms of mixed reference substance(A), sample(B), HPLC-FLED chromatograms of mixed reference substance(C), sample(D)

滤液 5 mL,置烧瓶中,挥去溶剂,加 8% 盐酸溶液 10 mL,超声处理 2 min,再加三氯甲烷 10 mL,加热

回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液用三氯甲烷提取 5 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过,

即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液注入液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标, 进行线性回归分析, 结果见表 1。

表 1 HPLC-UV 和 HPLC-FLED 方法 5 种成分的标准曲线及线性范围

Table 1 Standard curves and linear ranges of five components by HPLC-UV and HPLC-FLED

成分	紫外检测器			荧光检测器		
	线性范围/ng	回归方程	r	线性范围/ng	回归方程	r
芦荟大黄素	14.6 ~ 146.4	$Y = 3\ 239.6X - 1\ 060.4$	0.999 7	3.7 ~ 292.8	$Y = 124\ 214X - 408\ 414$	0.999 4
大黄酸	39.0 ~ 390.4	$Y = 1\ 582X - 1\ 107.8$	0.999 7	9.8 ~ 780.8	$Y = 29\ 033X + 512\ 864$	0.999 5
大黄素	36.8 ~ 368.0	$Y = 2\ 833.8X - 8\ 481$	0.999 4	9.2 ~ 736.0	$Y = 29\ 606X - 116\ 750$	0.999 4
大黄酚	17.0 ~ 170.4	$Y = 2\ 164.7X - 1\ 310.9$	0.999 4	4.3 ~ 340.8	$Y = 63\ 068X + 141\ 372$	0.999 7
大黄素甲醚	19.2 ~ 192.0	$Y = 844.6X - 635.49$	0.999 4	4.8 ~ 384.0	$Y = 93\ 036X - 110\ 648$	0.999 6

2.5 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μ L, 按 2.1 项下色谱条件进行重复进样 6 次, 按峰面积计算 RSD。紫外检测器下测定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 2.3%、2.0%、2.5%、2.0%、2.4%。荧光检测器下测定的 RSD 分别为 1.3%、0.9%、1.2%、1.6%、2.1%。

1.4%、0.8%、0.5%、0.7%、1.0%。

2.5 稳定性试验 取一份样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别在 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时精密吸取 10 μ L 进样, 以各峰面积分别计算, 结果紫外检测器下测定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 2.1%、1.8%、2.0%、2.0%、2.0%, 荧光检测器下测定的 RSD 分别为

2.6 重复性试验 取同一批大黄药材 6 份, 精密称定, 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 紫外检测器下计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 2.0%、2.6%、1.9%、2.8%、2.1%, 荧光检测器下计算的 RSD 分别为 1.0%、2.1%、1.0%、1.4%、2.6%。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的同一批样品(批号 121026) 6 份, 分别置量瓶中, 再加入一定量的混合对照品溶液, 按照 2.3 项下方法进行样品处理, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 在紫外和荧光检测器下分别计算回收率, 结果见表 2。

表 2 大黄中 5 种成分的加样回收率试验

Table 2 Recovery test of five components in Chinese Rhubarb

成分	称量量/g	加入量/mg	紫外检测器				荧光检测器			
			样品中量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值(RSD)/%	样品中量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值(RSD)/%
芦荟大黄素	0.074 2	0.43	0.39	0.83	101.36	99.64(2.4)	0.40	0.84	101.67	100.72(1.4)
	0.075 3	0.43	0.40	0.82	98.21		0.40	0.83	100.17	
	0.075 2	0.43	0.40	0.84	102.19		0.40	0.84	101.68	
	0.075 9	0.43	0.40	0.84	101.84		0.40	0.85	102.35	
	0.076 5	0.43	0.41	0.83	96.87		0.41	0.84	99.34	
	0.075 8	0.43	0.40	0.82	97.36		0.40	0.83	99.09	
大黄酸	0.074 2	1.27	1.05	2.29	97.77	97.37(1.3)	1.14	2.42	100.53	99.40(0.9)
	0.075 3	1.27	1.07	2.29	96.39		1.16	2.43	99.76	
	0.075 2	1.27	1.06	2.31	98.44		1.16	2.41	98.35	
	0.075 9	1.27	1.07	2.29	95.96		1.17	2.44	99.53	

续表 2

成分	称量量 /g	加入量 /mg	紫外检测器				荧光检测器			
			样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%
大黄素	0.076 5	1.27	1.08	2.31	96.47		1.18	2.45	99.98	
	0.075 8	1.27	1.07	2.33	99.19		1.17	2.42	98.21	
	0.074 2	0.51	0.45	0.98	104.75	102.36(2.56)	0.47	0.99	102.74	100.24(1.7)
	0.075 3	0.51	0.46	0.96	99.46		0.47	0.98	98.35	
	0.075 2	0.51	0.46	0.98	102.99		0.47	0.99	101.86	
	0.075 9	0.51	0.46	0.99	103.88		0.48	0.98	99.21	
大黄酚	0.076 5	0.51	0.46	0.97	98.66		0.48	0.99	99.08	
	0.075 8	0.51	0.46	0.99	104.45		0.48	0.99	100.22	
	0.074 2	1.57	1.62	3.22	102.47	100.89(1.5)	1.91	3.52	102.82	100.70(1.2)
	0.075 3	1.57	1.64	3.19	98.49		1.94	3.51	99.83	
	0.075 2	1.57	1.64	3.25	102.40		1.94	3.50	99.31	
	0.075 9	1.57	1.65	3.23	100.68		1.95	3.53	100.59	
大黄素甲醚	0.076 5	1.57	1.67	3.24	100.07		1.97	3.56	101.10	
	0.075 8	1.57	1.65	3.24	101.22		1.95	3.53	100.53	
	0.074 2	0.81	0.76	1.55	98.09	100.35(2.5)	1.01	1.78	95.37	98.53(1.7)
	0.075 3	0.81	0.77	1.55	97.00		1.02	1.83	100.17	
	0.075 2	0.81	0.77	1.58	100.11		1.02	1.83	99.36	
	0.075 9	0.81	0.77	1.61	103.49		1.03	1.83	98.59	
	0.076 5	0.81	0.78	1.59	100.99		1.04	1.84	98.63	
	0.075 8	0.81	0.77	1.60	102.42		1.03	1.83	99.05	

2.8 样品含量测定 取 3 批样品(批号 121105, 121112, 121120), 每批 3 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 外标法计算, 测定结果见表 3, 4。

表 3 紫外检测器下 3 批大黄样品 5 种成分含量测定

Table 3 Content determination of three samples by HPLC-UV
mg·g⁻¹

样品批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
121105	5.31	14.15	6.07	21.78	10.21
121112	5.05	13.44	5.73	20.69	9.78
121120	5.18	13.65	5.59	21.04	9.93

表 4 荧光检测器下 3 批大黄样品 5 种成分含量测定

Table 4 Content determination of samples by HPLC-FLED
mg·g⁻¹

样品批号	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
121105	5.33	15.43	6.29	25.75	13.59
121112	5.21	14.38	5.98	25.21	13.12
121120	5.25	14.61	5.99	25.62	13.27

3 讨论

3.1 检测器参数的设定 在 2010 年版《中国药典》中, 采用紫外检测器, 在波长 254 nm 处对大黄药材中 5 种蒽醌苷元进行测定, 本文采用紫外检测器对大黄药材中 5 种蒽醌苷元测定, 参考 2010 年版《中国药典》中的紫外检测器参数。而对荧光检测器的参数进行考察中, 分别对芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的最佳激发波长和发射波长进行了扫描, 综合考虑 5 种成分峰形均较好且均能有较大吸收, 最终确定激发波长为 435 nm, 发射波长为 515 nm。

3.2 线性范围的比较 紫外检测器下芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量在 14.64 ~ 146.40, 39.0 ~ 390.4, 36.8 ~ 368.0, 17.0 ~ 170.4, 19.2 ~ 192.0 ng 与其峰面积呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.999; 而荧光检测器下芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量在 3.7 ~ 292.8, 9.8 ~ 780.8, 9.2 ~ 736.0, 4.3 ~ 340.8, 4.8 ~ 384.0 ng 与其峰面积呈良好线性关系, 相关系

数也均 > 0.999, 两者的线性均符合方法学要求, 但相比之下, 荧光检测器下 5 种大黄苷元的线性范围更宽, 相当于紫外检测器的 8 倍, 可操作性更强, 更适合大黄苷元的含量测定。

3.3 不同检测结果的比较 目前文献中多采用 HPLC-紫外检测法测定大黄药材中 5 种蒽醌类成分, 也有文献报道采用 HPLC-荧光检测法进行测定, 如韩媛媛等^[9]采用 HPLC-荧光检测法测定东乐膏中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量, 所得结果显示线性范围及平均回收率均符合要求; 贾宝秀等^[10]采用荧光分光光度法测大黄中总蒽醌的含量, 荧光检测器参数为最大激发波长为 440 nm, 最大发射波长为 521 nm; 另外, 近年来大黄苷元单体成分在动物体内的药物代谢研究中, 也有采用荧光检测器进行定性定量测定, 如张锦雯等^[11]采用 HPLC-荧光检测法测定大鼠血浆中大黄酸的浓度及其药代动力学; 万萍等^[12]采用 HPLC-荧光检测对大黄酸在人体药代动力学的情况。基于上述研究报道, 本文比较紫外检测法和荧光检测法的优缺点。

从本文图谱显示可知, 紫外检测器下的图谱, 5 种蒽醌类成分虽然能分离, 但是干扰峰较多, 对于大黄药材或大黄相关制剂精准的定性、定量分析有一定的影响, 而从荧光检测器下的图谱分析, 5 种蒽醌类成分均具有荧光, 内源物质干扰较少, 图谱峰比较干净, 既能实现各组分有效地分离, 也能准确地对各组分进行定性、定量分析。从样品的含量测定结果比较, 荧光检测器的结果更加的稳定, 含量更加准确。

3.4 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 将信噪比 (S/N) 分别设定为 3 和 10, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的进样量得到检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)^[13]。紫外检测器的检测限 (LOD) 分别为 0.32, 0.84, 0.61, 1.28, 2.88 ng, 定量限 (LOQ) 为 1.05, 2.79, 2.04, 4.26, 9.60 ng, 荧光检测器的检测限 (LOD) 为 0.03, 0.12, 0.18, 0.09, 0.07 ng, 定量限 (LOQ) 为 0.09, 0.39, 0.61, 0.28, 0.24 ng。结果显示, 荧光检测器的 LOD 和 LOQ 均低于紫外检测器的。

综上所述, HPLC-荧光检测法比 HPLC-紫外检测法更适合测定大黄药材中所含 5 种蒽醌类成分的含量, 主要体现在大黄 5 种蒽醌类成分具有荧光, 内源物质干扰较小, 图谱显示干扰峰少, 准确可靠, 分

离度好, 更适合大黄药材的含量测定及其质量标准的建立。

[参考文献]

[1] 徐庆, 覃永俊, 苏小建, 等. 掌叶大黄化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 533-536.

[2] 高晓燕, 卢建秋. HPLC-DAD 法同时测定大黄中 7 个蒽醌类化合物的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1636-1641.

[3] 陈广通, 汪冬庚, 李玉琴. 王氏保赤丸中大黄 5 种成分的 HPLC 测定 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(1): 20-21.

[4] 许乾丽, 茅向军, 宋晓宁. HPLC 法同时测定六味安消胶囊中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(10): 1841-1844.

[5] 薛小平, 鹿燕敏, 王倩, 等. HPLC 法测定清热解毒方芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 6-8.

[6] 贺凡珍, 蔡学莹, 彭维, 等. HPLC 法同时测定酒大黄中 5 种蒽醌的含量 [J]. 中药材, 2011, 34(9): 1384-1385.

[7] 冯素香, 吴加, 李建生, 等. 大黄 5 个蒽醌类成分与大鼠血浆蛋白结合率的测定 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(1): 1-5.

[8] 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: 17.

[9] 韩媛媛, 王利勇, 杜光玲, 等. HPLC-荧光检测法测定东乐膏中大黄酸、大黄素、大黄酚的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1016-1018.

[10] 贾宝秀, 李玉琴, 冀海伟. 荧光分光光度法测大黄中总蒽醌的含量 [J]. 泰山医学院学报, 2008, 29(1): 36-40.

[11] 张锦雯, 王广基, 孙建国, 等. HPLC-荧光检测法测定大鼠血浆中大黄酸的浓度及其药代动力学 [J]. 中国天然药物, 2005(4): 238-241.

[12] 万萍, 孙建国, 郝刚, 等. 大黄酸的 HPLC-荧光检测及其在人体药代动力学中的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(1): 73-76.

[13] Chen X J, Ji H, Zhang Q W, et al. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography [J]. Pharmaceut Biomed, 46(2): 226-235.

[责任编辑 顾雪竹]