RP-HPLC-DAD 同时测定大黄中 9 种有效成分的含量

程小丽[1,2], 魏胜利[1*] 刘春生[1*], 张媛[1], 刘娟[1], 刘凤波[1], 张晓芹[1]
(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 重庆市九龙坡区第一人民医院, 重庆 400050)

[摘要] **目的**: 建立 RP-HPLC-DAD 同时测定大黄中 5 种游离蒽醌类成分(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚), 2 种双蒽酮类成分(番泻苷 A、番泻苷 B), 以及没食子酸、儿茶素合计 9 种成分含量的方法。**方法**: 采用 Agilent Zorbax SB-C_{18}(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相 0.05% 磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min^{-1}, 检测波长 280 nm, 柱温 40 ℃, 进样量 10 μL。**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、没食子酸和儿茶素 9 种成分分别在 4.56 ~ 45.6, 16.3 ~ 163, 7.38 ~ 73.8, 7.44 ~ 74.4, 1.82 ~ 18.2, 57.6 ~ 576, 28.2 ~ 282, 3.27 ~ 32.7, 118 ~ 1.18 × 10^3 mg·L^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系($r \geq 0.9995$), 平均加样回收率为 96.4% ~ 101.4%, RSD < 3.15%。不同来源的 6 批大黄样品中 9 种有效成分的含量差别较大。**结论**: 该方法简单、重复性良好, 准确可靠, 可用于大黄药材的快速质量评价。

[关键词] 反相高效液相色谱-二级管阵列检测; 大黄; 含量测定
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)18-0099-04
[doi] 10.11653/syfj2013180099

RP-HPLC-DAD Method for Simultaneous Determination of Nine Active Constituents in Rhubarb

CHENG Xiao-li[1,2], *WEI Sheng-li*[1*], *LIU Chun-sheng*[1*], *ZHANG Yuan*[1], *LIU Juan*[1], *LIU Feng-bo*[1], *ZHANG Xiao-qin*[1]
(1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing* 100102, *China*;
2. *Chongqing Jiulongpo District First People's Hospital*, *Chongqing* 400050, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish the method for simultaneous determination of five free anthraquinones (including aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion), two dianthrones (including sennoside A and sennoside B), gallic acid and catechin from rhubarb. **Method**: The analysis was achieved with an Agilent Zorbax SB-C_{18} analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution of 0.05% phosphoric acid in water and acetonitrile at 40 ℃. The flow rate was 1 mL·min^{-1}, injection volume was 10 μL, and detection wave length was set at 280 nm. **Result**: All the active constituents' calibration curves showed a good linearity ($r \geq 0.9995$) in a relatively wide concentration range. The liner range of the active constituents was 4.56-45.6, 16.3-163, 7.38-73.8, 7.44-74.4, 1.82-18.2, 57.6-576, 28.2-282, 3.27-32.7, 118-1.18 × 10^3 mg·L^{-1}, respectively. And the average recovery was 96.4%-101.4%, RSD < 3.15%. Furthermore, contents of the Nine active constituents of rhubarb samples from different sources differ significantly. **Conclusion**: This method is simple, good reproducibility, accuracy and reliability, it can be used for rapid quality evaluation of rhubarb.

[**Key words**] RP-HPLC-DAD; Radix et Rhizoma Rhet; determination

[收稿日期] 20121210(028)
[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(03291/537)
[第一作者] 程小丽, 在读硕士, 从事中药分子鉴定和分子生药学研究, E-mail: 7676508@qq.com
[通讯作者] * 魏胜利, 副教授, 从事中药资源定向培育及中药资源综合开发方面的研究, Tel: 010-84738334, E-mail: WSL7491@126.com; * 刘春生, Tel: 010-84738624, E-mail: max_liucs@263.net

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎，具泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄的功效[1]，为临床常用的中药。现代药理研究表明，大黄的抑菌成分主要为游离蒽醌类化合物[2-4]，泻下成分主要为结合蒽醌类和双蒽酮类化合物[5-6]，抗凝血成分主要为黄酮类衍生物——黄烷-3-醇类化合物[7]，而收敛止血类成分主要为鞣质类化合物。2010 年版《中国药典》对大黄质量控制的指标成分为总蒽醌含量（酸水解处理后 5 种游离蒽醌含量不少于 1.5%），而《日本药局方》（相当于日本药典）对大黄质量控制的指标成分为番泻苷 A（含量不少于 0.25%）[8]。由上可见，《中国药典》强调的是抑菌类成分和微泻下成分，而日本药典强调的是强泻下成分，二者规定的化学指标成分对于大黄药材质量的评价均具有片面性。因此，有必要基于现有的药理活性报道建立更为全面的质量评价方法。本文旨在建立同时测定大黄中 9 种（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、没食子酸和儿茶素）有效成分含量的 RP-HPLC-DAD 简易方法，以期从功效组分的角度来指导大黄的临床用药，并为客观评价大黄药材的质量提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪，包括四元泵、真空脱气泵、自动进样器、柱温箱、DAD 二极管阵列检测器；Sartorius BS110S（1/万）型电子分析天平（上海赛多利斯仪器有限公司）、METTLER AE240 型（1/10 万）电子分析天平（上海梅特勒-托利多仪器有限公司），KQ5200D 型超声清洗器（江苏省昆山市超声仪器有限公司），FW100 型高速万能粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）。

1.2 试剂 对照品：芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚（中国药品生物制品检定所，纯度 > 98%，批号分别为 110795-200605，110757-200206，110756-200110，110796-201017，110758-200610）；没食子酸、儿茶素、番泻苷 B（成都曼斯特生物科技有限公司，纯度 >98%，批号分别为 MUST-11122813，MUST-12050702，MUST-10081501）；番泻苷 A（成都普瑞法科技开发有限公司，经 HPLC 归一化法检验测定，纯度 >98%）。乙腈、甲醇为美国 Fisher 进口色谱纯，甲醇、磷酸为分析纯，水为屈臣氏蒸馏水。

1.3 样品 6 批大黄药材，分别从四川、宁夏、甘肃和青海 4 个地区采集所得，所有样品经北京中医药大学魏胜利副教授鉴定为正品大黄，鉴定结果及样品信息见表 1。

表 1 6 份测试样品的来源信息

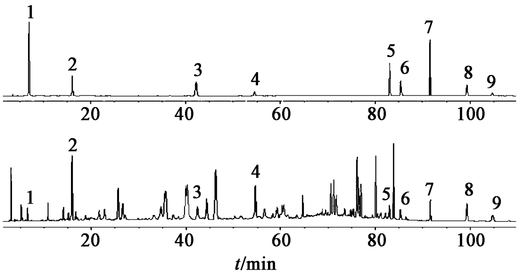
材料	植物名	资源类型	采集地点	海拔/m	经纬度	采集日期
S1	药用大黄 *R. officinale* Baill.	野生	四川理县	2 247	103°16′47″E 31°59′21″N	2011-08-01
S2	药用大黄 *R. officinale* Baill.	野生	四川平武县	1 050	101°50′74″E 31°59′21″N	2011-07-30
S3	掌叶大黄 *R. palmatum* L.	野生	宁夏隆德县	2 798	106°12′31″E 35°61′81″N	2011-07-20
S4	掌叶大黄 *R. palmatum* L.	野生	四川越西县	3 446	102°44′38 E 28o33′16″N	2011-07-26
S5	唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf	野生	青海达日县	4 015	99°36′25″E 33°44′12″N	2011-07-25
S6	唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf	野生	甘肃卓尼县	2 650	104°17′22″E 33°47′08″N	2011-08-13

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C_{18}色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm），流动相 0.05% 磷酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0 ~ 10 min，3% ~ 11% B；10 ~ 30 min，11% ~ 15% B；30 ~ 45 min，15% ~ 17% B；45 ~ 60 min，17% ~ 22% B；60 ~ 75 min，22% ~ 36% B；75 ~ 90 min，36% ~ 60% B；90 ~ 105 min，60% B；105 ~ 110 min，60% ~ 3% B），流速 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 280 nm，柱温 40 ℃；进样量 10 μL。

应用所建立的方法，供试品溶液中的 9 种有效成分得到了很好的分离，其色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品没食子酸 2.18 mg、儿茶素 3.92 mg，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，即得对照品储备液。精密称取对照品番泻苷 A 1.92 mg、番泻苷 B 1.88 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，用适量 *N*，*N*-二甲基甲酰胺溶解后甲醇定容至刻度，即得对照品储备液。精密称取对照品芦荟大黄素 1.52 mg，大黄酸 2.71 mg，大黄素 2.46 mg，大黄酚 2.48 mg、大黄素甲醚 1.21 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，用适量氯仿溶解后甲醇定容至刻度，即得对照品储备液。除儿茶素、番泻苷 A 2 种对照品外，取剩下的 7 种对照品储备液适



1. 没食子酸(gallic acid)；2. 儿茶素(catechin)；
3. 番泻苷 B(sennoside B)；4. 番泻苷 A(sennoside A)；
5. 芦荟大黄素(aloe-emodin)；6. 大黄酸(rhein)；
7. 大黄素(emodin)；8. 大黄酚(chrysophanol)；
9. 大黄素甲醚(physcion)

图 1　对照品(A)及大黄样品(B)色谱

量，用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.010 9，0.094 0，0.015 2，0.054 2，0.024 6，0.024 8，0.006 05 $g \cdot L^{-1}$的对照品溶液，储存于 4 ℃冰箱中。

2.3　供试品溶液的制备　将干燥的大黄药材粉碎，过 60 目标准筛，精密称取本品粉末 1 g，置于具塞三角瓶中，精密加入 60% 甲醇 50 mL，称定质量，超声(200 W，40 kHz)提取 1 h，放冷，称质量，用 60% 甲醇补足损失的质量，摇匀，过滤(0.22 μm 微孔滤膜)，取续滤液作为供试品溶液。

2.4　线性关系考察　分别取上述 9 种对照品溶液，进样 3，5，10，20，30 μL，按上述色谱条件测定，以进样量(μL)为横坐标(X)，色谱峰峰面积积分值为纵坐标(Y)，进行回归分析，所得各回归方程(表 2)，9 条标准曲线在检测范围内均呈良好线($r \geq 0.999\ 5$)。

表 2　9 种化合物的线性回归方程及检测范围

化合物	线性回归数据		
	回归方程	线性范围 /$mg \cdot L^{-1}$	r
没食子酸	$Y = 2.511\ 4 \times 10^1 X + 1.057\ 3 \times 10^1$	3.27 ~ 32.7	0.999 7
儿茶素	$Y = 2.544\ 7 \times 10^2 X - 47.192$	118 ~ 1.18 × 10^3	0.999 9
番泻苷 A	$Y = 1.408\ 6 \times 10^2 X - 7.433\ 1$	57.6 ~ 576	0.999 7
番泻苷 B	$Y = 8.3211 \times 10^1 X + 2.3694$	28.2 ~ 282	0.999 5
芦荟大黄素	$Y = 3.395\ 8 \times 10^1 X - 6.633\ 7$	4.56 ~ 45.6	0.999 7
大黄酸	$Y = 8.472\ 3 \times 10^1 X - 1.349\ 4 \times 10^1$	16.3 ~ 163	0.999 8
大黄素	$Y = 8.775\ 3 \times 10^1 X - 9.264\ 3$	7.38 ~ 73.8	0.999 8
大黄酚	$Y = 6.049\ 2 \times 10^1 X - 1.025\ 0 \times 10^1$	7.44 ~ 74.4	0.999 8
大黄素甲醚	$Y = 2.281\ 4 \times 10^1 X - 0.513\ 9$	1.82 ~ 18.2	0.999 8

2.5　精密度试验　精密吸取同一供试品溶液，按上述色谱条件重复进样 6 次，记录没食子酸、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的峰面积，计算 RSD 分别为 1.45%，1.04%，1.77%，0.93%，0.36%，2.86%，2.00%，0.89%，0.82%，结果表明仪器精密度良好。

2.6　稳定性试验　取供试品溶液，室温放置，按照上述色谱条件，分别于 0，2，6，12，24 h 进行测定，记录没食子酸、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的峰面积，计算 RSD 分别为 1.29%，0.97%，1.16%，0.68%，0.49%，2.85%，1.45%，0.15%，0.75%，表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

2.7　重复性试验　取同一批大黄药材，按照 **2.3** 项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定。计算 6 份供试品中没食子酸、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的平均含量分别为 1.05，19.9，9.11，16.5，2.17，2.68，1.13，3.19，0.930 $mg \cdot g^{-1}$；RSD 分别为 2.09%，1.84%，2.39%，2.97%，2.86%，2.36%，2.51%，2.06%，2.92%。

2.8　加样回收率试验　精密称定已知含量的大黄供试品粉末 6 份，每份 0.5 g，分别精密加入等同于药材样品含量一半的 9 种对照品。按照 **2.3** 项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，分别计算没食子酸、儿茶素、番泻苷 A、番泻苷 B、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为 100.0%，96.4%，100.8%，101.4%，98.2%，97.5%，99.2%，100.6%，101.3%，RSD 为 3.15%，1.38%，2.49%，1.40%，2.87%，1.54%，2.41%，1.17%，3.04%。

2.9　样品测定　取不同产地 6 批大黄干燥粉末 1 g，精密称定，按照 **2.3** 项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样测定，每批样品均平行提取 3 份后进样，6 批样品的含量测定结果见表 3，4。

3　讨论

3.1　本定量方法的特点和实用性　本实验对提取溶剂、溶剂量、提取方法及时间进行了单因素考察，得到最佳提取工艺为 60% 甲醇 50 mL 超声提取 1 h。同时，为了保证大黄中的 9 种有效成分的定量分析准确、可靠，并在最短的时间内达到基线分离，本文对磷酸浓度、色谱柱、流动相的梯度洗脱程序、柱温和检测波长进行了单因素考察，通过综合考虑诸多因素对色谱峰的分离效果，最终确立 0.05% 磷酸水-乙腈为流动相，采用 Agilent Zorbax SB-C_{18} 色谱柱，在 **2.1** 项的梯度洗脱程序下对样品进行含量测定，柱温为 40 ℃，检测波长 280 nm。有关同时测定大黄多组分已有报道[9]，比较而言本实验建立的方法锁定了《中国药典》和《日本药局方》中规定，且与

表 3　6 份样品 5 种游离蒽醌类成分含量测定($\bar{x} \pm s, n = 3$)　$mg \cdot g^{-1}$

样品	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
S1	2. 25 ± 0. 117	5. 38 ± 0. 301	3. 66 ± 0. 069	3. 63 ± 0. 140	0. 869 ± 0. 016
S2	0. 484 ± 0. 007	0. 624 ± 0. 000	0. 177 ± 0. 000	0. 523 ± 0. 001	0. 120 ± 0. 003
S3	0. 536 ± 0. 045	0. 805 ± 0. 042	0. 402 ± 0. 002	1. 37 ± 0. 008	0. 282 ± 0. 002
S4	0. 588 ± 0. 040	0. 414 ± 0. 042	0. 353 ± 0. 012	0. 974 ± 0. 013	0. 636 ± 0. 032
S5	2. 15 ± 0. 384	8. 02 ± 1. 049	1. 26 ± 0. 069	2. 99 ± 0. 120	0. 658 ± 0. 024
S6	1. 05 ± 0. 077	0. 380 ± 0. 090	0. 547 ± 0. 008	2. 73 ± 0. 053	0. 646 ± 0. 007

表 4　6 份样品的双蒽酮类及儿茶素和没食子酸含量测定($\bar{x} \pm s, n = 3$)　$mg \cdot g^{-1}$

样品	没食子酸	儿茶素	番泻苷 A	番泻苷 B
S1	1. 25 ± 0. 024	30. 9 ± 0. 161	28. 8 ± 0. 608	14. 0 ± 0. 441
S2	0. 378 ± 0. 017	6. 80 ± 0. 055	16. 0 ± 0. 038	6. 21 ± 0. 596
S3	0. 975 ± 0. 008	15. 2 ± 0. 053	7. 60 ± 0. 325	2. 60 ± 0. 121
S4	0. 353 ± 0. 003	58. 7 ± 1. 474	28. 3 ± 1. 025	11. 5 ± 0. 407
S5	1. 44 ± 0. 328	25. 9 ± 1. 646	20. 2 ± 1. 830	8. 55 ± 1. 785
S6	0. 182 ± 0. 004	25. 4 ± 0. 057	6. 29 ± 0. 115	3. 74 ± 0. 016

大黄主要功效密切相关的成分,并且成分的减少可以获得更好的分离度并减少出峰时间,因此,本方法可以作为一种简便、可靠、实用的大黄质量评价方法。

3. 2　不同种大黄样品含量测定结果　本实验采用的 3 种药用大黄基原的 6 份样品在不同功效组分含量上,不同种之间没有显示出明显的规律性,这与样品数量有限有关,但是可以看到,不同样品间各类功效成分的含量却存在明显的差异,也就是说药材质量存在严重的不稳定性,为了保证药材质量的优质稳定,今后有必要增加样本,对不同种、不同种内的变异个体,以及不同栽培产地和栽培措施下大黄的质量特征进行细致的解析。

[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]　藤村一. 大黄の薬理—瀉下作用について—[J]. 現代東洋医学,1963,4(4):44.

[3]　松本司,清玄寛章. 大黄、センナの抗 Bacteroides fragilis 活性成分[J]. 和漢医薬学会誌,1985,2(1):248.

[4]　Harima S, Matsuda H, Kubo M. Study of various rhubarbs regarding the cathartic effect and endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation[J]. Biol Pharm Bull, 1994,17(11):1522.

[5]　江文君,毛淑杰,应钶. 炮制对大黄抑菌作用与成分的影响[J]. 中药通报,1983,8(3):18.

[6]　Tegos G, Stermitz F R, Lomovskaya O, et al. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(10):3133.

[7]　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 Bull, 1985,33:1503.

[8]　日本药局方编辑委员会. 日本药局方 JP-15[S]. 东京:日本厚生省,2006:1344.

[9]　Katsuko K, Yorinobu N. Development of a high performance liquid chromatographic method for systematic quantitative analysis of chemical constituents in rhubarb[J]. Chem Pharm Bull,2006, 54:941.

[责任编辑　邹晓翠]