

# HPLC 测定大黄、黄连药对提取物中 10 种成分的含量

杨超, 张振秋\*, 侯学智, 尤春雪, 谢剑琳, 暴凤伟, 梁朔  
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 建立高效液相色谱法测定大黄、黄连药对提取物中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱 10 种成分的含量。方法: 采用 Phenomil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸 (65:35), 检测波长 254 nm; 乙腈-水 (37:63, 内含磷酸二氢钾 0.34 g, 十二烷基硫酸钠 0.17 g), 检测波长 345 nm, 柱温 25 °C。结果: 大黄中 5 种有效成分完全分离; 黄连中 5 种有效成分完全分离; 峰面积与其质量浓度呈良好的线性; 加样回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 100.79%, 99.38%, 99.83%, 98.94%, 98.86%, 100.20%, 99.53%, 99.76%, 100.07%, 100.37%。RSD 分别为 1.3%, 1.8%, 1.6%, 0.5%, 1.6%, 1.2%, 1.6%, 1.8%, 2.0%, 1.6%。结论: 该方法准确可靠、重复性好, 可用于大黄、黄连药对提取物的质量控制。

**[关键词]** 大黄; 黄连; 大黄黄连泻心汤; 高效液相色谱; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0098-05

**[doi]** 10.11653/zgsyfyjzz2013070098

## Determination of 10 Indicative Components in Combination Extracts of Rhubarb and Coptis chinensis by HPLC

YANG Chao, ZHANG Zhen-qiu\*, HOU Xue-zhi, YOU Chun-xue, XIE Jian-lin, BAO Feng-wei, LIANG Shuo  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for determination of 10 indicative components (aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion, jatrorrhizine, epiberberine, coptisine, palmatine, berberine) in Rhubarb and Coptis chinensis. **Method:** Phenomil BDS C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted; the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid (65:35). The detection wavelength was set at 254 nm; the other mobile phase was acetonitrile-water (37:63) with 0.34 g potassium phosphate and 0.17 g SDS; the detection wavelength was set at 345. The column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** The complete separation was obtained for the five compounds of Rhubarb. The complete separation was obtained for the five compounds of Coptis chinensis. Ten regression equation showing linear relationships between peak area and content of each compound were obtained. The average recoveries ( $n = 6$ ) of the compounds listed above were 100.79%, 99.38%, 99.83%, 98.94%, 98.86%, 100.20%, 99.53%, 99.76%, 100.07%, 100.37% and RSDs were 1.3%, 1.8%, 1.6%, 0.5%, 1.6%, 1.2%, 1.6%, 1.8%, 2.0%, 1.6%, respectively. **Conclusion:** This method is dependable, simple and practical, and may be used to control quality of Rhubarb and Coptis chinensis.

**[Key words]** Rhubarb; Coptis chinensis; Dahuang Huanglian Xiexintang; HPLC; assay

**[收稿日期]** 20120313(016)

**[基金项目]** 辽宁省教育厅课题(2008S145)

**[第一作者]** 杨超, 在读硕士, 从事药物分析研究, Tel:18626549258, E-mail:wosiking0502@163.com

**[通讯作者]** \* 张振秋, 博士, 教授, 从事药物分析研究, 博士生导师, Tel:0411-87586058, E-mail:zhangzhenqiu@sina.com

大黄、黄连药对始见于汉·张仲景《伤寒论》的大黄黄连泻心汤,由大黄、黄连两味药组成,主治“心下痞。按之濡,脉关上浮者”<sup>[1]</sup>。现代临床多与其与其他药配伍使用,治疗火毒上攻病,药理研究具有抗菌、增强机体免疫功能、抗消化性溃疡等作用<sup>[11]</sup>。本文运用HPLC建立测定大黄、黄连药对提取物中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱10种成分的高效液相色谱法<sup>[2-7]</sup>,多指标综合评价大黄、黄连药对提取物质量<sup>[8-10]</sup>,为建立全面可控的质量标准提供有效的方法。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, METTLER AB135-S 型 1/10 万电子天平(瑞士); AS3120A 型超声提取器,日立 U-3010 型紫外可见双光束扫描分光光度计。

**1.2 试剂和药品** 黄连碱(批号 201011)、表小檗碱(批号 201103)均由四川维克奇生物科技有限公司提供;小檗碱(批号 201104)由上海源叶生物科技有限公司提供;盐酸巴马汀(批号 110732-200907)、盐酸药根碱(110733-200806)、大黄酸(110757-200206)、芦荟大黄素(110795-201007)、大黄酚(110796-201017)、大黄素(110756-200110)、大黄素甲醚(110758-201013)均由中国食品药品检定研究院提供;大黄、黄连药材购自河北安国,经辽宁中医药大学李峰教授鉴定,大黄为蓼科植物掌叶大黄的干燥根和根茎,黄连为毛茛科植物黄连的干燥根茎。甲醇、乙腈均为色谱纯,水为重蒸馏水,磷酸为分析纯。

**1.3 药对提取物的制备** 取大黄粗粉加 8 倍量的 90% 乙醇回流提取 3 次,每次 3 h,过滤,合并滤液,减压干燥得大黄提取物。取黄连粗粉加 8 倍量的 50% 乙醇回流提取 3 次,每次 3 h,过滤,合并滤液,减压干燥得黄连提取物。按大黄、黄连药材比例 1:5 取大黄提取物和黄连提取物混合均匀,即得大黄、黄连药对提取物。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Phenomsil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);条件 1:检测大黄指标性成分流动相为甲醇-0.1% 磷酸(65:35),检测波长 254 nm,条件 2:检测黄连指标性成分流动相为乙腈-水(37:63,内含磷酸二氢钾 0.34 g,十二烷基硫酸钠 0.17 g),检测波长 345 nm,流速均为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 ℃。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取对照品芦荟大

黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚加甲醇制成浓度分别为 0.056 40,0.083 0,0.181 6,0.126 4,0.035 20 g·L<sup>-1</sup>的大黄混合对照品溶液;精密称取对照品药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱适量,加甲醇制成质量浓度分别为 0.258 5,0.262 0,0.575 0,0.272 5,0.593 0 g·L<sup>-1</sup>的黄连混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 称取大黄、黄连药对提取物约 0.05 g,精密称定,加入甲醇 5 mL,称定质量,超声处理 40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得供试品溶液。

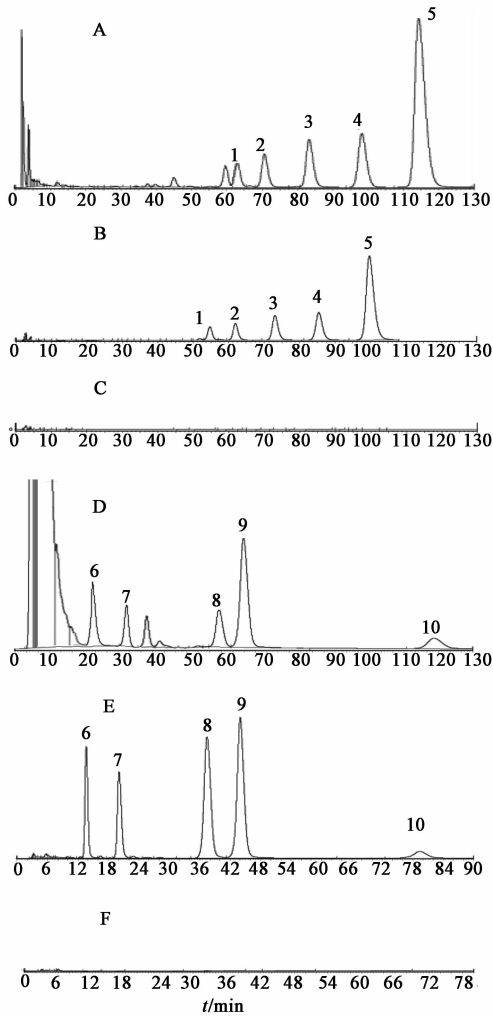
**2.4 阴性对照液制备** 分别取大黄提取物、黄连提取物约 0.05 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备,分别得黄连阴性液、大黄阴性液。

**2.5 方法专属性考察** 分别吸取药对提取物供试品溶液 5 μL、黄连混合对照品溶液 10 μL、黄连阴性溶液 5 μL、药对提取物供试品溶液 20 μL、大黄混合对照品溶液 15 μL、大黄阴性溶液 20 μL。按 2.1 项下色谱条件进样测定,药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱与其他峰分离度均 > 1.5,理论塔板数按小檗碱峰计算不低于 7 000。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚与其他峰分离度均 > 1.5,理论塔板数按大黄素峰计算不低于 4 000。结果见图 1。

**2.6 线性关系考察** 精密吸取大黄混合对照品溶液各 1,5,10,15,20 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件 1 进样测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归。精密吸取黄连混合对照品溶液各 2,5,10,15,20 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件 2 进样测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程,见表 1。

**2.7 精密度试验** 精密吸取供试品溶液 20 μL,按 2.1 项下色谱条件 1 进样测定,重复进样 6 次,测得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.5%,1.7%,1.9%,2.0%,0.8%;精密吸取供试品溶液 5 μL,按 2.1 项下色谱条件 2 进样测定,重复进样 6 次,测得药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.4%,1.1%,0.6%,1.0%,1.1%。结果表明仪器精密度良好。

**2.8 稳定性试验** 取供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件 1 进样 20 μL,分别在 0,2,4,8,12,24 h 测得样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.2%,1.5%,1.6%,



A. 药对提取物供试品溶液; B. 黄连混合对照品溶液;  
C. 黄连阴性液; D. 药对提取物供试品溶液;  
E. 大黄混合对照品溶液; F. 大黄阴性液;  
1. 药根碱; 2. 表小檗碱; 3. 黄连碱; 4. 巴马汀;  
5. 小檗碱; 6. 芦荟大黄素; 7. 大黄酸; 8. 大黄素;  
9. 大黄酚; 10. 大黄素甲醚

图 1 大黄-黄连药对提取物 HPLC

2.1%, 1.2%; 取供试品溶液, 在 2.1 项下色谱条件

2 进样 5  $\mu\text{L}$ , 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测得样品中  
药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱峰面积的  
RSD 分别为 0.9%, 1.3%, 2.1%, 1.9%, 1.2%。表  
明供试品溶液与室温条件下放置 24 h 稳定性良好。

**2.9 重复性试验** 精密称取药对提取物 6 份按  
2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色  
谱条件 1 进样 20  $\mu\text{L}$ , 测得样品中芦荟大黄素、大黄  
酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的 RSD 分别为  
2.0%, 1.6%, 1.0%, 2.1%, 1.4%; 取上述 6 份供试  
品溶液, 按 2.1 项下色谱条件 2 进样 5  $\mu\text{L}$ , 测得样  
品中药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的含  
量的 RSD 分别为 2.1%, 2.6%, 1.5%, 2.0%,  
1.1%。均符合规定, 表明该方法重复性良好。

**2.10 加样回收率试验** 取已知准确含量的样品六  
份, 每份约 0.035 g, 精密称定, 加入大黄混合对照品  
溶液(芦荟大黄素为 0.035 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、大黄酸 0.041  
10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、大黄素 0.056 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、大黄酚 0.014 81  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、  
大黄素甲醚 0.052 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1 mL, 黄连混合对  
照品溶液(药根碱 0.045 18  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、表小檗碱 0.105 2  
 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄连碱 0.301 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、巴马汀 0.139 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、  
小檗碱 0.615 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 10 mL, 按 2.3 项下的方  
法操作, 制备供试溶液, 在上述色谱条件下分别进样  
20  $\mu\text{L}$  进行测定, 计算回收率。结果见表 2。

**2.11 药对提取物测定** 称取药对提取物, 按 2.3  
项下方法制备供试品溶液并进样分析, 分别精密吸  
取对照品和供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,  
按 2.1 项下色谱条件 1 测定供试品中芦荟大黄素、  
大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚, 结果见表 3;  
精密吸取对照品 20  $\mu\text{L}$  和供试品溶液 5  $\mu\text{L}$  注入液  
相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件 2 测定供试品中药  
根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱的含量, 结  
果见表 3。

表 1 10 种成分的回归方程、相关系数和线性范围

对照品溶储液	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}$
芦荟大黄素	$Y = 2.29 \times 10^6 X + 4.00 \times 10^4$	0.999 3	$5.64 \times 10^{-2} \sim 1.28 \times 10^{-1}$
大黄酸	$Y = 1.45 \times 10^6 X + 1.88 \times 10^4$	0.999 8	$8.30 \times 10^{-2} \sim 1.66$
大黄素	$Y = 1.78 \times 10^6 X + 9.36 \times 10^4$	0.999 1	$1.82 \times 10^{-1} \sim 3.63$
大黄酚	$Y = 2.11 \times 10^6 X + 1.37 \times 10^5$	0.999 5	$1.26 \times 10^{-1} \sim 2.53$
大黄素甲醚	$Y = 1.15 \times 10^6 X - 4.00 \times 10^3$	0.999 4	$3.52 \times 10^{-2} \sim 7.04 \times 10^{-1}$
药根碱	$Y = 2.16 \times 10^6 X + 1.02 \times 10^5$	0.999 5	$5.17 \times 10^{-1} \sim 5.17$
表小檗碱	$Y = 1.46 \times 10^6 X + 2.24 \times 10^5$	0.999 2	$5.24 \times 10^{-1} \sim 5.24$
黄连碱	$Y = 7.90 \times 10^5 X - 1.03 \times 10^5$	0.999 2	$1.15 \sim 1.15 \times 10^1$
巴马汀	$Y = 2.26 \times 10^6 X - 4.21 \times 10^5$	0.999 2	$5.45 \times 10^{-1} \sim 5.45$
小檗碱	$Y = 2.10 \times 10^6 X - 1.45 \times 10^5$	0.999 3	$1.19 \sim 1.19 \times 10^1$

表 2 10 种成分加样回收率考察

成分	称样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	实测总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芦荟大黄素	0.035 21	0.035 17	0.035 10	0.070 81	101.53	100.79	1.3
	0.033 72	0.033 68	0.035 10	0.068 59	99.45		
	0.035 86	0.035 82	0.035 10	0.071 12	100.57		
	0.036 22	0.036 18	0.035 10	0.071 21	99.80		
	0.034 84	0.034 80	0.035 10	0.070 82	102.61		
大黄酸	0.035 22	0.041 70	0.041 10	0.081 97	97.98	99.38	1.8
	0.033 74	0.039 95	0.041 10	0.081 32	100.66		
	0.035 86	0.042 46	0.041 10	0.082 79	98.13		
	0.036 23	0.042 86	0.041 10	0.083 24	101.08		
	0.034 81	0.041 20	0.041 10	0.083 12	98.11		
大黄素	0.035 22	0.055 68	0.056 20	0.112 3	100.75	99.83	1.6
	0.033 72	0.053 31	0.056 20	0.110 1	101.05		
	0.035 83	0.056 64	0.056 20	0.111 8	98.14		
	0.036 24	0.057 29	0.056 20	0.114 1	101.08		
	0.034 83	0.055 06	0.056 20	0.110 2	98.11		
大黄酚	0.035 22	0.147 8	0.148 1	0.293 3	98.21	98.94	0.5
	0.033 71	0.141 5	0.148 1	0.287 6	98.64		
	0.035 82	0.150 4	0.148 1	0.297 9	99.62		
	0.036 25	0.152 2	0.148 1	0.298 8	99.00		
	0.034 84	0.146 2	0.148 1	0.293 2	99.22		
大黄素甲醚	0.035 23	0.053 45	0.052 40	0.105 2	98.76	98.86	1.6
	0.033 75	0.051 21	0.052 40	0.104 5	101.71		
	0.035 82	0.054 35	0.052 40	0.105 7	98.00		
	0.036 21	0.054 94	0.052 40	0.106 2	97.83		
	0.034 83	0.052 84	0.052 40	0.104 2	98.01		
药根碱	0.035 25	0.454 5	0.451 8	0.904	99.45	100.20	1.2
	0.033 77	0.435 4	0.451 8	0.890	102.17		
	0.035 83	0.461 9	0.451 8	0.910	98.20		
	0.036 25	0.467 3	0.451 8	0.917	98.59		
	0.034 87	0.449 6	0.451 8	0.911	99.48		
表小檗碱	0.035 23	1.032	1.052	2.075	99.12	99.53	1.6
	0.033 76	0.989 1	1.052	2.064	102.17		
	0.035 87	1.051	1.052	2.084	98.20		
	0.036 24	1.062	1.052	2.099	98.59		
	0.034 87	1.020	1.052	2.067	99.48		
黄连碱	0.035 25	3.116	3.012	6.074	98.21	99.76	1.8
	0.033 74	2.982	3.012	5.953	98.62		
	0.035 84	3.165	3.012	6.159	99.39		
	0.036 23	3.206	3.012	6.301	102.95		
	0.034 84	3.078	3.012	6.084	99.80		
巴马汀	0.035 23	1.435	1.395	2.799	97.80	100.07	2.0
	0.033 74	1.374	1.395	2.772	100.21		
	0.035 84	1.460	1.395	2.880	101.82		
	0.036 23	1.475	1.395	2.847	98.32		
	0.034 84	1.419	1.395	2.845	102.23		
小檗碱	0.035 26	6.400	6.151	12.49	99.00	100.37	1.6
	0.033 74	6.124	6.151	12.38	101.70		
	0.035 82	6.502	6.151	12.75	101.58		
	0.036 25	6.580	6.151	12.63	98.36		
	0.034 84	6.324	6.151	12.55	101.21		

表 3 大黄、黄连药对提取物中  
10 种指标性成分含量测定 (n = 3) mg·g<sup>-1</sup>

成分	样品 1	样品 2	样品 3
芦荟大黄素	1.003	1.009	1.025
大黄酸	1.186	1.203	1.215
大黄素	1.579	1.582	1.618
大黄酚	4.167	4.216	4.242
大黄素甲醚	1.522	1.559	1.577
药根碱	13.08	13.60	13.66
表小檗碱	28.68	29.21	28.99
黄连碱	90.8	91.6	93.2
巴马汀	41.07	42.07	41.55
小檗碱	180.4	182.6	184.6

### 3 讨论

**3.1 供试品溶液制备方法的选择** 供试品溶液的制备比较了超声和回流提取法,结果超声提取结果明显且超声提取简单方便,提取时间较短,故采用超声提取法。经过甲醇、乙醇、甲醇-盐酸(100~1)不用溶剂实验和不同超声时间的考察,结果表明各指标性成分在甲醇中超声 40 min 提取率较高。

**3.2 检测波长的选择** 由于大黄 5 种有效成分均属于蒽醌类物质,最大吸收波长相近,先取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品溶液分别于 200~400 nm 进行 UV 全波长扫描,测定最大吸收波长均为(250±5)nm,参考有关文献确定 254 nm 为大黄 5 种有效成分的测定波长<sup>[3]</sup>。黄连中 5 种有效成分均为生物碱类物质,最大吸收波长也相近,同法得黄连 5 种生物碱类最大吸收波长为(350±10)nm,最终确定 354 nm 为黄连有效成分的检测波长<sup>[3]</sup>。

**3.3 多指标综合评价** 本文采用 HPLC 测定大黄、黄连药对提取物中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱 10 个成分的含量,选取了 10 个指标性成分来考察大黄、黄连药对的质量。多组分测定是中药质量控制的重要方法,同时也为中药指标成分与临床疗效间的相关性研究提供了一种科学方法。随着科学技术的不断发展,中药质量控制模式已经从

单一成分的鉴别和评价向多指标成分分析迈进。综上所述,多指标分析不仅能全面反映中药整体质量的信息,且能确保临床用药的安全、有效。建立多指标分析方法对中药质量控制意义重大,这就要求我们要结合现代化的分析手段,提高中药复杂成分的分析水平,确保中药的质量及其疗效的可控。本文的方法具有操作简单、结果准确等优点,为大黄、黄连药对提取物的质量综合评价(质量、临床疗效等)提供了科学依据。

### [参考文献]

[1] 张薛光. 谈谈对《金匱要略》泻心汤出出、方名的理解[J]. 中医文献杂志, 2007(3):9.

[2] 张红梅, 王长虹, 王峥涛. 黄连标准提取物的制备与质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):56.

[3] 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, 2010:285.

[4] 刘峰, 张振秋, 赖静怡, 等. HPLC 法测定黄连及炮制品中四种生物碱的含量[J]. 中成药, 2010, 32(11):1925.

[5] 李玉恒, 张振秋, 赖静怡, 等. HPLC 波长切换技术同时测定黄连片中 7 种成分含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2):371.

[6] 李兆翌, 黄真. 黄连质量控制技术与评价的研究进展[J]. 抗感染药物, 2010, 7(3):160.

[7] 吴安国, 曾宝, 林乔, 等. 黄连厚朴配伍在不同提取工艺中主要成分含量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):19.

[8] 许舜军, 李鸿燕, 曾元儿, 等. 反相高效液相色谱法测定大黄药材 5 种蒽醌类成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2010, 17(7):1201.

[9] 张依清, 王玉, 张兰兰, 等. 大黄的质量评价方法研究进展与展望[J]. 中药材, 2010, 33(10):1663.

[10] 李鑫健, 方翠芬, 祝明. HPLC 法同时测定利胆排石片中大黄素、大黄酚及大黄素甲醚[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):82.

[11] 王健, 孙秀梅, 张兆旺. 大黄黄连泻心汤的研究[J]. 中国现代医药, 2005, 4(6):16.

[责任编辑 顾雪竹]